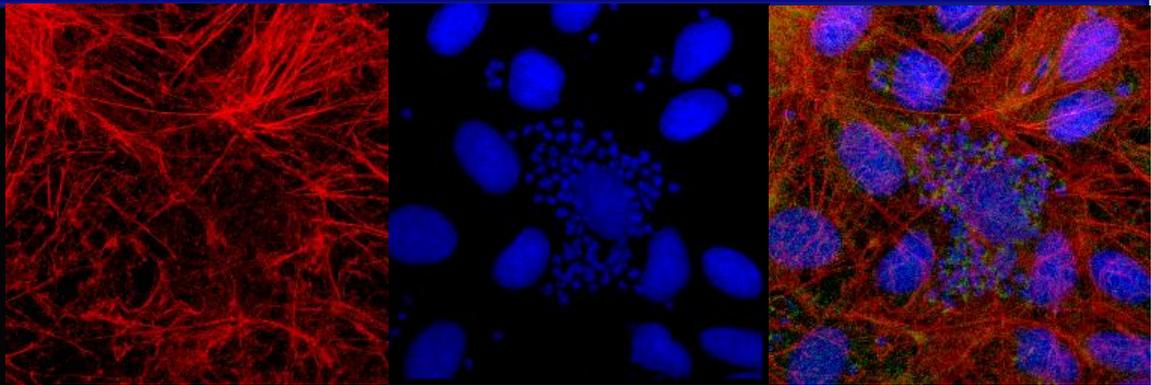


BIOSÍNTESIS DE TRIPANOTIÓN EN *Trypanosoma cruzi*: Validación biológica de su potencial como blanco terapéutico contra la enfermedad de Chagas



Lic. María Lucía Fiestas Puppo

Tutor: Dra. Andrea Medeiros

Co-tutor: Dr. Marcelo Comini

Tesina de Maestría en Ciencias Biológicas -
Subárea Biología Celular y Molecular- PEDECIBA

Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas,
Insitut Pasteur de Montevideo, Uruguay

Diciembre, 2014

Je ne cherche pas,

je trouve

Pablo Picasso



Índice temático:

1. Introducción	5
1.1 Visión general	6
1.2 Evolución de los tripanosomas	6
1.2.1 Filogenia de los tripanosomas	6
1.2.2 Sintenia	10
1.2.3 Origen y evolución de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> y la enfermedad de Chagas	15
1.3.1 Enfermedad de Chagas: epidemiología, distribución y características	15
1.3.2 Ciclo de vida	16
1.3.3 Clasificación	20
1.3.4 Características funcionales, estructurales y genómicas	22
1.4 En búsqueda de nuevos blancos terapéuticos	29
1.4.1 Tratamientos anti-chagásicos actuales	29
1.4.2 Portafolio de nuevos tratamientos	31
1.4.3 Dianas farmacológicas	32
1.5 Análisis funcional de genes en tripanosomas	33
1.5.1 <i>Knock-out</i>	33
1.5.2 Expresión constitutiva o inducible	35
1.5.3 Silenciamiento génico post-transcripcional por ARN doble cadena	36
1.6 Metabolismo redox de tripanosomas	39
1.7 Tripanotión	44
1.7.1 Funciones del tripanotión	44
1.7.1.1 Mantenimiento del balance redox y niveles de poliaminas	44
1.7.1.2 Detoxificación de xeno y endobióticos	46
1.7.1.3 Síntesis de deoxirribonucleótidos	47
1.7.1.4 Otras funciones	47
1.8 Biosíntesis de tripanotión	50
1.8.1 Sustratos para la biosíntesis de tripanotión	50

1.8.2	Glutathionilperimidina sintetasa y tripanotión sintetasa	51
2.	Objetivos	59
2.1	Objetivos generales	60
2.2	Objetivos específicos	60
3	Materiales y métodos	61
3.1.	Materiales	62
3.2	Generación de construcciones	62
3.2.1	Identificación de secuencias putativas y clonado de GspSs de <i>T. cruzi</i>	62
3.2.2	Clonado de CfGspS en un vector de expresión para <i>T. brucei</i>	65
3.2.3	Clonado de TbTryS en un vector de expresión para <i>T. cruzi</i>	66
3.2.4	Generación de casetes para el reemplazo alélico de TcTryS	67
3.2.5	Amplificación del casete de ARNi de parásitos <i>T. brucei</i> ARNi-TryS	68
3.3	Detección de ARN mensajeros	68
3.3.1	Extracción de ARN total de parásitos <i>T. brucei</i> y <i>T. cruzi</i>	68
3.3.2	Transcripción reversa y amplificación por PCR	70
3.4	Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i>	71
3.5	Inmunoensayos	74
3.5.1	Protocolo de inmunización de ratones para la generación de anticuerpos anti-CfGspS y TbTryS	74
3.5.2	Ensayo de <i>western blot</i>	75
3.5.3	Ensayo de inmunofluorescencia indirecta	76
3.6	Cultivos celulares	78
3.6.1	Cultivo de <i>T. cruzi</i>	78
3.6.1.1	Transfecciones en <i>T. cruzi</i>	79
3.6.1.1	Infección de líneas celulares de mamífero por <i>T. cruzi</i>	80
3.6.2	Cultivo de <i>T. brucei</i>	82
3.6.2.1	Transfecciones de la forma infectiva de <i>T. brucei</i>	84
3.6.2.2	Ensayos de inducción de silenciamiento de la expresión de TbTryS	85

3.7 Microscopía	85
3.7.1 Microscopía de epifluorescencia	85
3.7.2 Microscopía confocal	86
3.7.3 Microscopía electrónica de transmisión	88
3.8 Infecciones por <i>T. brucei</i> en ratones BALB/cJ	88
3.8.1 Evaluación de parásitos recuperados de sangre	89
3.9 Actividad biológica de compuestos contra la forma infectiva de <i>T. b. brucei</i>	90
3.9.1 Ensayo de proliferación de la forma infectiva de <i>T. b. brucei</i>	90
3.9.2 Evaluación de citotoxicidad en macrófagos murinos	90
3.10 Bioinformática y programas computacionales	90
3.10.1 Bases de datos	92
3.10.2 Búsquedas y alineamiento múltiple de secuencias	92
3.10.3 Gráficas e imágenes	92
4. Resultados y discusión	95
4.1 Análisis in silico de secuencias codificantes para TryS y GspS	96
4.1.1 Secuencias codificantes para GspS y TryS: identificación y origen de la GspS/TryS de Kinetoplastidos.	96
4.2. Un único gen codifica para la GspS en diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	109
4.2.1 Detección y amplificación de los genes de gspS de distintas cepas de <i>T. cruzi</i>	109
4.2.2 Alineamientos de secuencias y características funcionales de GspS y TryS.	111
4.3. TryS pero no GspS es expresada en distintos estadios y cepas de <i>T. cruzi</i>	118
4.3.1. Generación y respuesta de anticuerpos de ratón anti-TbTryS	118
4.3.2. Análisis de expresión y concentración intracelular de TryS en los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> .	123
4.3.3. Construcción del vector de expresión pET15b-TcGspS	126
4.3.4 Ensayos de optimización de la expresión de la TcGspS en <i>E.coli</i>	126
4.3.5 Generación y respuesta de anticuerpos de ratón anti-CfGspS	132
4.3.6 Detección de TcGspS por ensayos de <i>Western blot</i> y RT-PCR	136
4.4. Localización subcelular de TryS en distintos estadios de <i>T. cruzi</i>	141

4.4.1 Inmunofluorescencias con anti-TbTryS en <i>T. cruzi</i> CL-Brener y DM28c.	141
4.4.2 Microscopías electrónicas de amastigotas.	148
4.5. Estudio de virulencia de <i>T. cruzi</i> CL-Brener y Dm28c	152
4.6 Generación de knock-out clásico/condicional para TcTryS en <i>T. cruzi</i>	155
4.6.1 Generación de las construcciones pBSK-UTRs	158
4.6.2 Generación de la construcción pTcINDEX-TbTryS	160
4.6.3 Caracterización de la línea de <i>T. cruzi</i> pTcINDEX-TbTryS	163
4.7. Capacidad infectiva de una línea celular de <i>T. cruzi</i> que sobreexpresa TbTryS	165
4.7.1. Cuantificación de las infecciones	167
4.7.2 Imágenes de epifluorescencia de infecciones de macrófagos J774	170
4.8. Monoglutationilespermidina no es capaz de sustituir in vivo las funciones de tripanotión	180
4.8.1 Caracterización de la línea ARNi-TbTryS + CfGspS	184
4.8.2 Estudio de complementación funcional por parte de la CfGspS en una línea celular de la forma infectiva de <i>T. brucei</i> depletada en TryS	188
4.9 Aproximación al modo de acción de ciertos compuestos sobre la forma infectiva de <i>T. brucei</i>	195
4.10. Mecanismos epigenéticos de escape al silenciamiento post-transcripcional por ARN doble cadena in vitro e in vivo	201
4.10.1 Infecciones de animales con <i>T. brucei</i> ARNi-TryS: curvas de parasitemia y sobrevida.	205
4.10.2. Caracterización fenotípica y molecular de los parásitos ARNi-TryS recuperados de animales infectados.	207
5. Conclusiones	213
6. Bibliografía	218
7. Anexo	238
8. Agradecimientos	247

1. Introducción

1.1 – Visión general

Los tripanosomátidos son organismos protozoarios del orden *Kinetoplastida* que parasitan una amplia variedad de huéspedes invertebrados y vertebrados o bien llevan un ciclo de vida libre. Los especímenes más relevantes para la salud humana y animal pertenecen a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, los cuales afectan a más de un billón de personas y son responsables de la muerte de más de medio millón de personas en regiones (sub)tropicales del mundo (Cavalli, 2009). En países africanos de la región sub-sahariana, *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense* son los agentes causantes de la tripanosomiasis humana o enfermedad del sueño, mientras que *T. brucei brucei*, *T. vivax* y *T. congolense* producen la enfermedad de Nagana que afecta al ganado (Franco, 2014). En América, *T. cruzi* es responsable de la enfermedad de Chagas (Câmara Marques Pereira, 2013). Con una distribución mundial más amplia, diferentes especies de *Leishmania* producen enfermedades como la fiebre negra, espundia (leishmaniasis mucocutánea), la úlcera oriental y Kala-Azar (o leishmaniasis visceral) (Singh, 2012).

1.2 – Evolución de los tripanosomátidos

1.2.1 – Filogenia de los tripanosomatidos

Los Protozoa forman un sub-reino dentro del reino Protista. Son un grupo muy diverso representado en su mayoría por organismos eucariotas unicelulares de gran complejidad y con motilidad. Este grupo está ubicado en la raíz evolutiva de los actuales animales. Se han descrito más de 50.000 especies, la mayoría organismos de vida libre, con capacidad de colonizar una gran diversidad de hábitats.

En 1985, la sociedad de Protozoólogos publicó el esquema taxonómico de distribución de los Protozoa en seis filos. Dos de estos seis filos, Sarcomastigofora y Apicompleza, contienen la mayoría de las especies causantes de enfermedades humanas (Robert G. Yeager, 1996 y John O Corliss, 2001).

El orden Kinetoplastida, perteneciente al filo Sarcomastigofora, fue creado 40 años atrás, al agrupar a dos géneros que inicialmente se consideraban protozoos no relacionados, el género Trypanosomatidae y el Bodonidae (Fig. 1). Por otro lado, a partir de estudios filogenéticos iniciados en la década del 80 fue posible distinguir que los kinetoplástidos se relacionan estrechamente con los euglénidos (organismos unicelulares flagelados y fotosintéticos) dado que estos dos grupos de protistas convergían como una rama profunda en el árbol evolutivo de los eucariotas. Estas evidencias filogenéticas correlacionaban bien con las características morfológicas, estructurales y biológicas distintivas de estos dos grupos (por ej. hetero- o auxotrofia), base sobre la cual pudo establecerse una relación adicional de ambos grupos con los jakobidos, protozoos amebo-flagelados que poseen mitocondria y son heterotróficos. Incluso se ha llegado a proponer que los jakobidos son ancestros distantes de los kinetoplastidos por la conservación de ciertas características morfológicas y ecológicas (Simpson, 2006). Sumado a esto, años más tarde se identificó a los diplomonéidos, protozoos de vida libre que ocasionalmente parasitan invertebrados (parásitos facultativos), como el grupo filogenético más estrechamente relacionado al orden kinetoplastida.

El desarrollo reciente de sistemas de secuenciación masiva y análisis computacional de datos ha permitido obtener y procesar de manera comparativa información genómica completa de los organismos (principalmente especies dentro de los géneros Trypanosomas y Leishmania, aunque también bodonidos y criptobidos). En el caso de estudios filogenéticos, esto posibilita rastrear de manera robusta conexiones evolutivas que en análisis parciales de secuencia podrían no ser detectados (Fig.1).

En ese sentido, hoy en día se ha puesto en evidencia que los tripanosomas claramente descienden de entre los bodonidos, y que la vieja división de los kinetoplastos en estos dos grupos es artificial (Simpson, 2006). Tal es así que un trabajo reciente, donde estudiaron el impacto de la incorporación de secuencias ambientales del ARNr 18S aisladas a partir de fuentes marítimas al árbol filogenético de los kinetoplástidos, propone un nuevo sistema de clasificación que divide a los kinetoplastos en Prokinetoplastina (Ichthyobodo y Perkinsiella) y Metakinetoplastina (otros bodonidos y trypanosomátidos) (Moreira, 2004) (Fig. 1). Los tres clados de organismos bodonidos dentro de Metakinetoplastina se denominaron Neobodonida, Parabodonida y

Eubodonida. *Bodo saltans*, un kinetoplastido de vida libre y con hábitos bacteriofágicos, pertenece al clado Eubodonida. Numerosos estudios indican que también los tripanosomátidos están estrechamente relacionados a este clado (Moreira, 2004; Deschamps, 2011). Por esta razón, *B. saltans* es un organismo clave para el estudio de la evolución de los tripanosomátidos

El género *Trypanosoma* comprende las especies con origen en el continente africano, como *Trypanosoma brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*, etc. y aquellas que emergieron en el Nuevo Mundo como *T. cruzi* (Fig. 1). Dentro de este género *Trypanosoma* también existen especies que se asocian en clados por su selectividad por infectar roedores (transmitidos probablemente en primer lugar por pulgas), aves (transmitidos por moscas) y peces o anfibios (transmitidos por sanguijuelas).

Por otro lado, descendiendo un escalón en la taxonomía, la familia *Tripanosomatidae* tradicionalmente se compone de nueve géneros que incluyen tanto a los parásitos de insectos monoxenos como taxones dixenos que alternan entre insectos y vertebrados (o plantas). El género de los monoxena, integrado por *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomona*, *Leptomona* y *Wallaceina* es monofilético. Únicamente los dixenos *Leishmania* y *Phytomona* parecerían constituir grupos naturales distintos o polifiléticos (Lukes y Simpson, 2006). *Phytomonas spp.* son parásitos de plantas que se transmiten por insectos que se alimentan de floema y constituyen un problema para la agricultura en Latinoamérica (Camargo, 1999). Los géneros *Herpetomonas*, *Angomonas* y *Strigomonas* colonizan únicamente insectos (Maslov, 2013).

Algunos tripanosomátidos que originalmente fueron clasificados dentro de los géneros *Crithidia*, *Blastocrithidia* y *Herpetomona* contienen una única bacteria endosimbionte en su citoplasma, que se divide de manera sincronizada a la célula huésped, y parecería estar altamente relacionada con las γ -proteobacterias (*Bordetella*). Todos los tripanosomátidos que presentan un endosimbionte pertenecen al grupo de los monofiléticos, lo que estaría indicando que la simbiosis ocurrió una única vez a lo largo de la evolución y fue retenida por presentarle una ventaja evolutiva al protista (Simpson, 2006).

Es interesante destacar que el parasitismo evolucionó varias veces dentro de los kinetoplastos. A su vez, las diversas asociaciones de los tripanosomátidos indican que el origen del parasitismo es singular y remoto. (Simpson, 2006). Si se asume que no hubo reversión a un estado de vida libre, el parasitismo obligado o comensalismo emergió al menos cuatro veces en estos organismos: i) primero en el clado Ichthyobodo–Perkinsiella (parásito de peces), ii) Cryptobia, organismos que parasitan peces (ej. Trypanoplasma); iii) Cryptobia “verdadera”, que es comensal en serpientes; y iv) los tripanosomátidos, que presentan una gran diversidad de organismos huésped (vertebrados, no vertebrados y plantas). Cada uno de estos grupos cuenta con un ancestro cercano de vida libre. En el caso de los tripanosomátidos, este es Eubodonida (Simpson, 2006).

Ha existido un largo debate acerca de cuál ha sido el parasitismo original de los tripanosomátidos patógenos, por ej. insectos o vertebrados. Estudios moleculares recientes apoyan la teoría que propone que *Trypanosoma* y *Leishmania* descienden de parásitos de insectos hematófagos que, accidentalmente, sobrevivieron a la transmisión y lograron adaptarse a un huésped vertebrado (Simpson, 2006). Siguiendo esta hipótesis, el origen de estos géneros (o la de sus ancestros con capacidad de infectar vertebrados) debe ser posterior a la aparición de los primeros vertebrados (370 millones de años atrás), dado que es poco probable que los vertebrados acuáticos pudieran ser blanco de los insectos terrestres (Simpson, 2006). Las especies de *Leishmania* presentan menor divergencia en sus secuencias de ARNr que las especies de *Trypanosoma*, pero por recientes reportes se cree que fueron originadas 100 millones de años atrás (Simpson, 2006). La transmisión del tripanosoma monoxénico (insecto) a la sangre de un vertebrado debe haber ocurrido muchas veces, pero solo tuvo éxito unas pocas. Sin embargo, una vez que la adaptación al huésped vertebrado fue exitosa, al patógeno se le facilitó el acceso a muchos otros nichos por transmisión vectorial directa (Simpson, 2006).

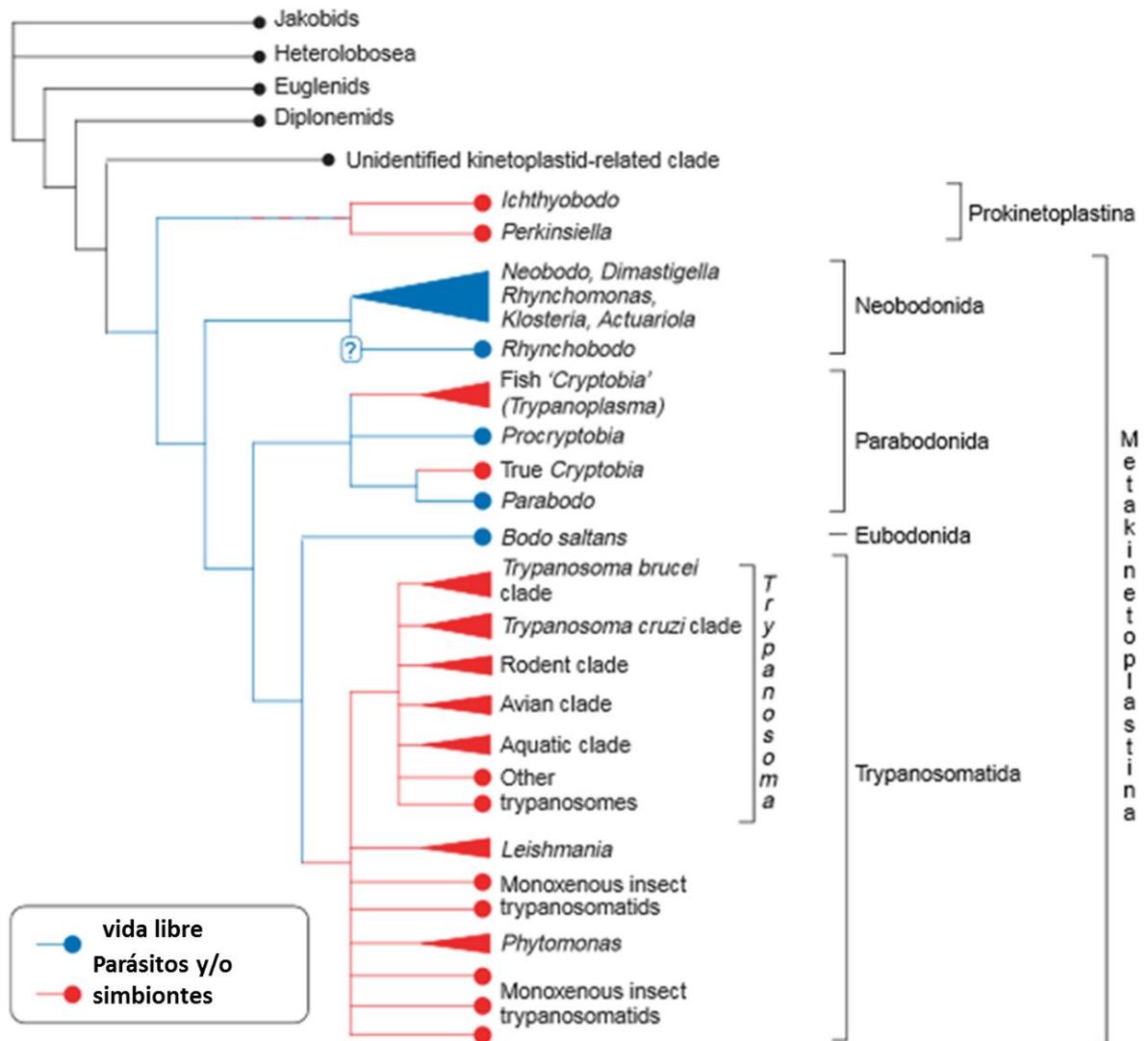


Figura 1. Relación evolutiva de los kinetoplástidos. La relación evolutiva dentro de los kinetoplástidos fue estimada por árboles recientes de genes taxónicos de ARNr ricos en SSU (small subunit) y filogenia de proteínas. La ubicación de los tripanosomátidos como un grupo hermano de los Eubodonida siguió un criterio de filogenia de las proteínas heat-shock (HSP). El clado de los kinetoplástidos relacionados sin identificar se conoce únicamente por secuencias de genes ARNr ambientales. Las líneas negras representan las ramas por fuera del grupo de kinetoplástidos, mientras que las líneas roja-azul indican un estatus desconocido. Los círculos muestran la representación de uno o pocos clados particulares, y los triángulos la representación de varios clados conocidos, los signos de interrogación marcan la posición de un clado inestable. Tomada y adaptada de Simpson, 2006.

1.2.2 – Sintenia

La comparación de los genomas de los *Trityps* (*T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major*) muestra que tanto el orden de los genes como su repertorio están ampliamente conservados

dentro de los centros cromosomales (El-Sayed et al. 2005b). La considerable co-linealidad entre los genomas de tripanosomas, a pesar de que divergieron tempranamente, refleja restricciones selectivas y fuertes en la estructura de dichos genomas (Ghedin et al. 2004). Esta conservación del orden de secuencias codificantes dentro de los genomas de eucariotas indica que pares de genes altamente conservados son retenidos por su regulación funcional y transcripcional (Dávila-López et al. 2010). En el caso de los tripanosomátidos, estos arreglos de genes podrían además estar asociados al mecanismo de transcripción policistrónico que en ellos opera (Muhicht, 1988), el cual se beneficiaría de la co-direccionalidad de la replicación y transcripción ya que permitiría expresar “paquetes” de genes con funciones compartidas o relacionadas (Ghedin, 2004). Aunque aún resta reunir información que lo confirme, esta organización podría ofrecer una ventaja estructural, por ejemplo, para la transcripción de genes ciclo de vida-dependiente.

Por otro lado, fuera de los centros cromosomales, en las regions sub-teloméricas, existe una gran variedad de características especie-específicas relacionadas principalmente a la interacción del parásito con el ambiente y/o huésped (Gardner, 2005; Berriman, 2005; El-Sayed et al. 2005b).

Es sabido que algunas características que son vitales para organismos de vida libre, pero que no son necesarias para organismos parásitos dentro del ambiente de su huésped, son eliminadas cuando la presión selectiva por retenerlas desaparece. De esta forma, una reducción del fenotipo debería tener como contrapartida una disminución del tamaño del genoma de los parásitos. Los tripanosomátidos no parecen haber reducido el tamaño de su genoma (25–35 Mb en estado haploide) o la densidad génica (2.8–4.6 Kb/gen), ya que estos se comparan a los hallados en otros eucariotas unicelulares de vida libre (Jackson 2014).

Sin embargo, el genoma de los tripanosomátidos ha sufrido una minimización funcional, perdiendo algunos genes esenciales para otros Kinetoplastidos de vida libre. Por ejemplo, son auxótrofos para pteridina o folato, co-factores esenciales para la biosíntesis de macromoléculas, ya que perdieron los genes de las enzimas encargadas de la biosíntesis de estos importantes cofactores (Beck, 1990, Bello, 1994, Nare, 1997; Ouellette, 2002). De manera similar, tienen que importar hemo de sus huéspedes u

obtenerlo de bacterias endosimbiontes (Alveset, 2011), ya que carecen de enzimas de la ruta biosintética (Du, 1994)(Chang, 1975; Korený, 2010). Los tripanosomas también son auxótrofos para purinas (Marr, 1978; Gutteridge, 1979), vitales para la biosíntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo energético.

Otros componentes clásicos de la bioquímica eucariota también están ausentes, como por ejemplo la catalasa y glutatión reductasa, enzimas claves en la mantención de la homeostasis redox intracelular. Precisamente, el sistema redox dependiente de tioles de estos parásitos presenta características que lo hacen único y, en buena parte, ejemplifica la presión evolutiva a la que fue sometido el organismo, la cual fue resuelta exitosamente mediante simplificaciones funcionales (ver más adelante, (Krauth-Siegel, 2008; Oza, 2005; Comini, 2013).

Uno de los interrogantes más importantes desde el punto de vista evolutivo para estos organismos es si estas características (y otras), es decir la ausencia de ciertos genes altamente conservados en otras especies, son el reflejo de eventos de presión evolutiva que dieron lugar a la pérdida de material genético o por el contrario es una característica intrínseca (naturalmente heredada) de la rama de los Kinetoplastida dentro de la filogenia eucariota. Puede ser que muchos genes conservados estén ausentes en los tripanosomátidos porque los Kinetoplástidos se separaron de otros linajes eucariotas muy temprano en la evolución y por lo tanto los genes de estos últimos fueron evolucionando ya sin relación a los primeros. Estas hipótesis van a quedar más claras cuando se secuencien genomas de Kinetoplástidos de vida libre y otros organismos filogenéticamente relacionados (Jackson 2014).

Una comparación del uso de aminoácidos en las proteínas mostró que el grado de identidad entre proteínas homólogas de *L. major* y *Trypanosoma* es inferior (identidad del 40-45%) al correspondiente al de homólogos de *T. brucei* y *T. cruzi* (identidad del 55%) (Ghedini, 2004). Estos niveles de conservación a nivel de secuencia de proteínas son consistentes con la aparición de una divergencia remota de otros linajes. Para alcanzar esta notoria divergencia de secuencia, el genoma de los parásitos debió atravesar rearrreglos y mutaciones, por lo que resulta sorprendente encontrar una sintenia tan alta entre estos organismos. Una comparación con otros genomas eucariotas señala que los niveles de sintenia observados en tripanosomátidos son

mayores a los esperados por el tiempo de divergencia que tuvieron estas especies (Ghedin, 2004). Ahora, para conservar un alto nivel de sintenia junto con una elevada divergencia de secuencia inter-género debe existir una importante fuerza de selección. El hecho de que el grado de sintenia sea el mismo dentro de un mismo género (*T. cruzi* vs *T. brucei*) así como entre géneros (*L. major* vs *tripanosomas*) sugiere que esta presión selectiva estuvo actuando desde la divergencia de los linajes.

En procariotas, el orden de los genes es frecuentemente mantenido para grupos de genes con funciones relacionadas que forman un operón. De forma similar, si bien el 60% del genoma de *C. elegans* es susceptible a rearrreglos, las regiones que parecen ser estables corresponden a regiones de genes co-regulables (Ghedin, 2004; Pettitt, 2014; Vergara, 2010). A pesar que existe un caso reportado en *T. cruzi*, donde las enzimas de la biosíntesis *de novo* de pirimidinas son codificadas por genes que forman parte de una misma unidad transcripcional policistrónica (Gao, 1999), en su mayoría, las unidades transcripcionales en tripanosomas no parecerían estar agrupadas por función.

En algunos procariotas, altos niveles de sintenia se han observado en algunas especies que no son capaces de llevar a cabo recombinación homóloga (por lo tanto se previenen los rearrreglos genómicos). Esta situación es poco probable en tripanosomas dado que la recombinación homóloga existe y es una de las estrategias que se ha explotado para la manipulación genética (ver más adelante, sección 1.5.1).

Una característica que destaca a los tripanosomas del resto de los eucariotas es que transcriben sus genes como largos policistrones que, como precursores de ARNs, luego son procesados y transformados en ARNm monocistrónicos (ver más adelante, sección 1.3.4). Por este y otros motivos más (ej. no se han identificado promotores para la ARN polimerasa II), la regulación de la expresión génica en estos organismos es fundamentalmente controlada a nivel post-transcripcional (Torri, 1988; Tschudi, 1985). El origen de la replicación podría estar en la región entre dos policistrones. Estos podrían existir para permitir que la replicación y la transcripción se den de manera co-direccional. Esto ha sido demostrado como un factor importante para mantener el orden de los genes y la dirección de la transcripción en procariotas. Dado el gran tamaño de los policistrones en tripanosomas, parece incluso más probable que sea necesario mantener la co-dirección de la replicación y la transcripción. Si esto es cierto,

llevaría a la selección en contra de la mayoría de los rearrreglos genómicos en regiones intergénicas, dado que la mayoría interrumpirían la coordinación de las direcciones (Ghedin, 2004).

1.2.3 – Origen y evolución de *T. cruzi*

Desde los años 90s, la discusión de la evolución de *T. cruzi* ha sido dominada por la hipótesis del “super-continente sureño”, que sugiere que esta especie emergió de tripanosomas que fueron aislados en mamíferos terrestres del Nuevo Mundo, a partir de la separación de la gran masa continental que incluía a América del Sur, Australia y Antártica hace 40 millones de años (Hamilton, 2012). Sin embargo, en los últimos años, la evidencia que ha emergido no apoya esta hipótesis y en su lugar se ha formulado una nueva (en inglés *bat seeding*). En este escenario, el ancestro común de los tripanosomas del clado de *T. cruzi* (al menos para *T. rangeli* y *T. cruzi*) fue un tripanosoma de murciélago que luego se diversificó y expandió geográficamente (Hamilton, 2012)(Hamilton, 2002).

Varios tripanosomas dentro de este grupo fueron transmitidos de murciélagos a mamíferos terrestres de manera independiente y exitosa en al menos 5 oportunidades. Se cree que un evento único de este tipo es el que dio lugar a la aparición de *T. cruzi*, como en los otros casos, facilitado por la coexistencia en un mismo nicho de la especie reservorio (murciélagos), el vector (insecto hematófago) y el huésped mamífero (por ej. marsupiales) (Hamilton, 2002). Es altamente probable que estos pocos casos probados de transferencia de tripanosomas entre distintas especies del reino animal sean solo la punta del iceberg que quedará develado cuando se avance en el descubrimiento de la gran diversidad tripanosomas que habitan este planeta.

El clado de *T. cruzi* es probable que se haya expandido en algún momento luego que los murciélagos sufrieran una diversificación mayor hace aproximadamente 58-70 millones de años (Cottontail, 2014; Hamilton, 2002). La diversidad genética relativa dentro de *T. cruzi*, su gran diversidad geográfica en el nuevo mundo y su gran variedad de huéspedes (tanto dentro de los mamíferos, como dentro de los triatomíneos) apuntan a un origen pre-humano de estas especies. De esta forma, los humanos

fueron expuestos por primera vez a *T. cruzi* cuando migraron al Nuevo Mundo aproximadamente hace 30.000 años, cuando estuvieron en contacto por primera vez con los vectores artrópodos del parásito. A partir de allí, las infecciones se volvieron prevalentes cuando las casas se infestaron con especies de triatomíneos, como extensión natural de su hábitat (Hamilton, 2002).

1.3 – *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas

1.3.1 – Enfermedad de Chagas: epidemiología, distribución, y características

La enfermedad de Chagas es una zoonosis que constituye un problema de salud pública importante en Latinoamérica. Según datos de la OMS, se estima que alrededor de 8 millones de personas portan esta infección, principalmente en Latinoamérica, siendo la tasa de mortalidad de 12.000 personas por año (OMS, 2014). La morbilidad y mortalidad son especialmente elevadas en personas que viven en el medio rural y en condiciones de pobreza, donde el tipo de vivienda y la dificultad para el acceso a la atención médica facilitan la transmisión vectorial y complican el diagnóstico en etapas tempranas de la infección. Alrededor de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de contagio, sin embargo esta cifra se logró reducir considerablemente en la últimas dos décadas gracias a los programas de control del vector de transmisión (OMS, 2014).

La forma más frecuente de infección se da por transmisión vectorial, y se produce por el contacto de las mucosas o dermis con heces de insectos de la subfamilia *Triatominae* (familia *Reduviidae*, orden *Hemiptera*) infectados con el parásito. Si bien se han reconocido más de cien especies de estos insectos, solamente unas diez cohabitan con los humanos. Entre estos se encuentran *Triatoma infestans* responsable del 85% de los casos de Chagas en el cono sur, *Rhodnius prolixus*, el segundo vector más importante en Centroamérica y *Panstrongylus megitus* (OMS, 2007). En menor medida, la infección también puede ocurrir por ingesta de alimentos contaminados con el insecto. Dentro de las formas alternativas de transmisión se encuentran: la



Figura 2. Distribución geográfica de los casos de Enfermedad de Chagas (número de casos estimado entre los años 2006 y 2009). Tomada y adaptada de <http://www.bayerpharma.com>.

transfusión de sangre, el transplante de órganos y la vía congénita por parte de madres infectadas (Cavalli, 2009). Estas formas de transmisión cobran relevancia en países de América del Norte, Europa u Oceanía, donde el vector no se encuentra presente, pero la inmigración de personas infectadas ha llevado a la expansión de la enfermedad fuera de su región endémica (OMS, 2010) (Fig. 2).

La enfermedad presenta dos estadios clínicos, la fase aguda y la crónica. La manifestación clínica de la fase aguda comienza entre los 6-10 días luego de la infección y dura entre 1 y 2 meses. Esta fase se caracteriza por fiebre, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y muchas veces produce un edema facial conocido como chagoma. El 5% de los niños muere en esta fase. Luego de la fase aguda, los pacientes se vuelven asintomáticos. Alrededor del 70-85% de las personas infectadas continúa en esta etapa por el resto de su vida, conocida como forma indeterminada de la enfermedad crónica de Chagas. Sin embargo, la gran mayoría terminará manifestando daño en distintos órganos, los cuales conducirán a fallas cardíacas, digestivas o nerviosas que son características de la enfermedad crónica avanzada (Barret, 2003).

1.3.2 – Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi*, que comprende una etapa intracelular en un huésped mamífero y otra en el insecto triatomino, involucra tres estadios: epimastigota,

tripomastigota y amastigota (Fig. 3). La forma tripomastigota es una célula elongada con el núcleo ubicado de forma central y el kinetoplasto (o ADN mitocondrial condensado) en el extremo posterior. Este estadio presenta una característica membrana ondulante que corre a lo largo de todo el parásito. El flagelo nace en el extremo posterior de esta membrana y se extiende hasta el extremo anterior del cuerpo, desde donde se proyecta como un flagelo propiamente dicho. El flagelo generalmente se posicionan en forma de C o U. La forma epimastigota es ligeramente menor que el tripomastigota. El cuerpo sigue elongado, pero el núcleo y kinetoplasto se ubican ambos en la región central. El flagelo se origina de forma central, causando que la membrana ondulante cubra solamente la mitad del cuerpo. La forma amastigota es pequeña y redondeada, presenta un núcleo y kinetoplasto pero carece de flagelo (sólo conserva un vestigio de este) y membrana ondulante.

En el intestino del insecto se encuentra la forma epimastigota la cual se diferencia al estadio infeccioso de tripomastigota metacíclico. La forma tripomastigota reside también en el medio extracelular de ambos hospederos, mientras que los amastigotas presentan una localización intracelular en las células del huésped mamífero.

Luego de entrar en el organismo, *T. cruzi* invade las células del huésped (ej., fibroblastos, células epiteliales). Los macrófagos tienen un importante rol inicial para reaccionar contra la infección y en transportar los parásitos a otros sitios del cuerpo, como ser el tejido cardíaco o el músculo liso del sistema gastrointestinal (Barret, 2003).

Los tripomastigotas metacíclicos son capaces de parasitar una amplia gama de células mamíferas nucleadas. Los mecanismos que los parásitos han adoptado para poder entrar a las células explotan la maquinaria de tráfico intracelular de la célula huésped. La invasión puede ocurrir por tres rutas diferentes: (i) por la presión mecánica que generan por su propia motilidad. Esto se evidenció por el hecho de que incluso cuando las células se encuentran fijadas no se puede prevenir la invasión. Sin embargo, este mecanismo es el menos importante (Barrias, 2013) (ii) fagocitosis mediada por reclutamiento de lisosomas. En este caso *T. cruzi* organiza los microtúbulos del

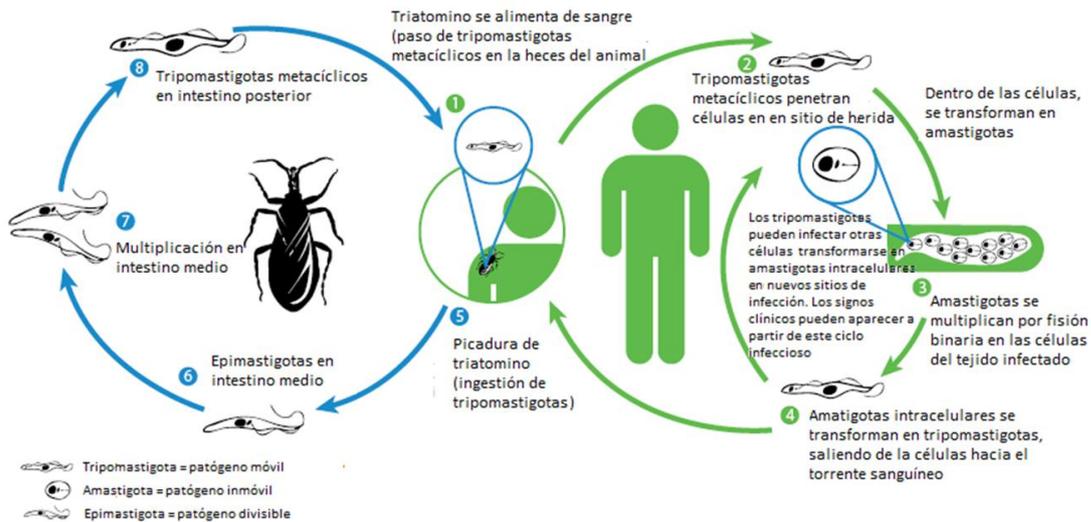


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de *T. cruzi*. En azul se señalan y explican las etapas que suceden dentro del vector insecto, un triatomino, mientras que en verde aquellas que ocurren dentro del ser humano. Tomada y adaptada de: <http://www.bayerpharma.com>.

citoesqueleto de la célula huésped para poder reclutar los lisosomas en el punto donde el parásito se adhirió (Barrias, 2013). Estos lisosomas se fusionan con la membrana plasmática para crear un compartimiento vacuolar (la vacuola parasitófora) en donde el parásito se aloja transitoriamente; (iii) endocitosis facilitada por los filamentos de actina del citoesqueleto (Barrias, 2013). En este caso la vacuola parasitófora se construye inicialmente desde la membrana plasmática de la célula huésped que rodea al parásito. Una vez dentro de la vacuola por cualquiera de estos mecanismos, los lisosomas se dirigen a estas hasta fusionarse. Esta fusión lleva a la acidificación de las mismas. Esta caída en el pH cumple un rol dual, en inducir la diferenciación rápida de tripomastigota a amastigota y a su vez activa a una proteína de tipo porina (TcTox). Esta proteína media el debilitamiento de la membrana vacuolar y permite el escape de los parásitos al citoplasma (Barrias, 2013).

El acortamiento del flagelo y el cuerpo celular comienzan inmediatamente a la entrada en la célula huésped, siendo un proceso rápido que precede el rearrreglo del kinetoplasto. La primera división celular ocurre solo luego de un periodo lag, donde el kinetoplasto está siendo reordenado, hasta adoptar su morfología replicativa.

Luego de la diferenciación, la forma amastigota prolifera en el citoplasma. Cuando se alcanza una densidad celular alta, los amastigotas dan forma a los tripomastigotas

sanguíneos. La señal que dispara esta diferenciación no está bien definida, sin embargo se cree que los niveles limitantes de glucosa, las interacciones por contacto y la producción de amastina podrían estar involucrados (Cruz, 2012; Tyler, 2001).

Durante la diferenciación hacia formas tripomastigotas, la morfología del kinetoplasto suele ser un marcador tardío, adoptando una estructura replicativa mientras se encuentra en la célula huésped (Tyler, 2001).

Los tripomastigotas en la sangre periférica son pleomórficos, ya que se encuentran tanto formas alargadas (*slender*) como anchas (*broad*). La proporción entre estas dos formas varía según la cepa, lo que puede estar reflejando las diferencias en las tasas de diferenciación e invasión de los tripomastigotas entre cepas (Urdaneta Morale, 1983).

Cuando una población pleomórfica de tripomastigotas sanguíneos (que también puede llegar a tener hasta un 10% de amastigotas) es ingerida por un insecto *reduviid*, los parásitos deben atravesar en primer lugar el intestino medio. Allí los tripomastigotas sufren una diferenciación a formas amastigotas (generalmente de 3-5 μm de diámetro), capaces de replicarse y de diferenciarse a epimastigota. Inicialmente los amastigotas aumentan su volumen y prolongan su flagelo transformándose en esferomastigota. El cuerpo celular y el flagelo continúan elongándose, para dar lugar al epimastigota (aproximadamente 30 μm de largo) replicativo.

Esta transformación de ama a epimastigota parece ser reversible y depende de la concentración de monosacáridos libres en el ambiente (Tyler, 2001).

La diferenciación de la forma tripomastigota *slender* a epimastigota coincide con el pasaje de un ambiente rico en glucosa (sangre del huésped) a uno extremadamente pobre en monosacáridos (intestino posterior del insecto). El incremento en la biogénesis y complejidad de la mitocondria en la forma epimastigota es una aparente adaptación a la ausencia de sacáridos simples.

Eventualmente, los epimastigotas llegan al recto del insecto y se adhieren a la cutícula del mismo por intermedio de su flagelo. Aquí sufrirán un proceso denominado metacicloogénesis que implica cambios morfológicos y bioquímicos dramáticos. La metacicloogénesis puede describirse en dos partes. En primer lugar el tripanosoma sensa la falta de azúcar en el ambiente y responde activando su mitocondria y

elongando el cuerpo celular y flagelo. La membrana flagelar, que es rica en esteroides y por lo tanto más hidrofóbica que la membrana somática, se ve más prolongada. Esta elongación del flagelo permite al tripanosoma adherirse a superficies hidrofóbicas y estas interacciones son las que disparan la metacicloogénesis (mediado por AMPc). Sin embargo, existen evidencias experimentales que implican a un factor de la hemolinfa del insecto como estímulo inductor de la metacicloogénesis. Finalmente, los tripomastigotas (metacíclicos) infectivos terminan por despegarse y son eliminados en las heces del insecto (Tyler, 2001).

T. cruzi emplea la diferenciación celular como una estrategia para adaptarse a los diversos ambientes que encuentra en el huésped y el vector. La diferenciación está altamente controlada, y requiere de cambios en la morfología celular, motilidad y metabolismo que terminan afectando un gran número de procesos fundamentales.

Durante el ciclo celular *T. cruzi* modifica estructuras y funciones clave, como son: i) la superficie celular, que le permitirá interactuar con los diferentes ambientes, ii) el citoesqueleto, tanto pelicular como flagelar, que termina afectando la morfología y motilidad, iii) la captación de nutrientes y metabolismo, por regulación de la estructura y actividad de la mitocondria principalmente, pero también por (in)activación de algunas enzimas glicosomales o citosólicas, iv) el ciclo celular y v) los mecanismos de defensa, dado que la respuesta a la infección por parte del huésped mamífero y del insecto son extremadamente diferentes, el parásito requerirá en cada estadio de moléculas distintas para poder sobrevivir (Jimenez, 2014; Noireau, 2009).

1.3.3 – Clasificación

La diversidad del genoma de *T. cruzi* y su multiplicidad de genotipos y fenotipos ha sido bien estudiada (Dvorak, 1982; Barnabé, 2000; Brisse, 2000; Devera, 2003; Lewis, 2009a). La descripción de diferentes grupos ecológicos o epidemiológicos de *T. cruzi* ha oscilado entre pocos grupos discretos (Miles, 1986; Souto, 1993; Souto, 1996; Zingales, 1999) a muchos (Tibayrenc, 1988). Actualmente, se han designado seis unidades discretas (DTUs por sus siglas en inglés, *discrete typing units*) (Brisse, 2000). En 2009, estas DTUs fueron renombradas como grupos TcI a TcVI (Zingales, 2009).

A veces las subdivisiones genéticas identificadas por estudios de evolución de especies patógenas no satisfacen los criterios cladísticos. La razón principal de esto es que, incluso en especies predominantemente clonales como puede ser *T. cruzi*, ocurre cierta tasa de recombinación genética. Por definición un clado representa una unidad de evolución que estrictamente está aislada de otra unidad. Algunos linajes pueden presentar un origen híbrido, lo que implica dos ancestros. Por esta razón el concepto de clados no es aplicable al caso de *T. cruzi*. Sin embargo, a pesar de que ocurre cierto intercambio genético, es posible realizar subdivisiones discretas y estables. De esta forma se introdujo el término de unidades de tipificación discretas (DTUs, Tibayrenc, 1998). Las DTUs fueron propuestas para describir un cierto grupo de linajes que eran más similares genéticamente respecto a otros, y podían ser identificadas por marcadores moleculares comunes. Las cepas dentro de un DTU no son consideradas como un único clon, sino como clones relacionados. Los *clusters* genéticos entre las diferentes cepas de *T. cruzi* se adaptan perfectamente a esta definición, por lo que fueron determinadas seis DTUs, TcI–TcVI (Brisse, 2000; Zingales, 2009).

La heterocigosis observada en los aislamientos de cepas de TcV o TcVI sugiere que estas DTUs son híbridos y derivan de TcII y TcIII (Zingales, 2009; Zingales, 2012). Sin embargo, las restantes DTUs, TcI–TcIV muestran claramente homocigosis alélica.

TcI es la más predominante y ampliamente distribuida de todas las DTUs que se encuentran en América. TcI infecta distintos vectores triatomíneos, y se asocia con ciclos selváticos o domésticos. Las infecciones humanas con TcI se concentran en el norte de sud y centroamérica, y están asociados con las cardiomiopatías chagásicas.

TcIII se asocia principalmente a ciclos selváticos en Brasil y países vecinos. Las infecciones en humanos son reportadas raramente (Llewellyn, 2009a; Marcili, 2009a). Ocasionalmente, TcIII puede ser encontrada en perros domésticos (Chapman, 1984; Cardinal, 2008).

TcIV muestra un patrón de distribución similar al de TcIII, con la excepción del Chaco, donde parece estar ausente. A diferencia de TcIII, las infecciones en humanos por TcIV son bastante frecuentes (Miles, 1981).

TcII se encuentra principalmente en las regiones del sur y centro de Sudamérica. TcII se asocia a manifestaciones cardíacas y también pueden presentarse de manera concomitante megaesofago y megacolon. Se la ha encontrado principalmente en ciclos de transmisión doméstica. Aún no ha sido posible determinar los huéspedes naturales y vectores de TcII (Fernandes, 1999; Zingales, 1999; Lisboa, 2007).

TcV y TcVI son dos DTUs híbridas similares que se asocian con el Chagas en las regiones sur y central de Sudamérica. Hasta la fecha, prácticamente no se han podido aislar cepas selváticas pertenecientes a esta DTU.

Algunas especies de *Trypanosoma* se pueden aislar de quirópteros alrededor del mundo, con más de 30 especies de tripanosomas recuperadas de más de 100 especies de murciélagos. Los murciélagos insectívoros son los más frecuentemente infectados tanto por tripanosomas *stercorarian* (subgeneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* y *Megatrypanum*) como *salivaria* (*Trypanosoma evansi*)

Hasta la fecha, la mayoría de los aislamientos adaptados al cultivo *in vitro*, pertenecen al subgenero *Schizotrypanum*. Al grupo de *T. cruzi* aislados de murciélagos se lo clasificó provisoriamente bajo el título de "Tcbat" (Marcili, 2009c), el cual posiblemente será el séptimo DTU: TcVII

Tcbat es capaz de desarrollarse *in vitro* dentro de células mamíferas, al igual que otros *T. cruzi* (Marcili et al., 2009c). Sin embargo, a diferencia de los otros seis DTUs, Tcbat no es capaz de desarrollarse en las especies de triatomino disponibles en los laboratorios (ej. *T. infestans*, *Rhodnius prolixus* o *Panstrongylus megistus*). El vector de Tcbat es aún desconocido, pero se especula que posiblemente se encuentre en los refugios de los murciélagos, cimicidios (chinches) o ectoparásitos de murciélagos (Cavazzana, 2010).

1.3.4 – Características funcionales, estructurales y genómicas

T. cruzi, así como el resto de los tripanosomátidos, son microorganismos flagelados que presentan ciertas características distintivas entre los que se encuentran: una inusual transcripción policistronica con *trans-splicing*; organización del ADN mitocondrial en una única gran masa de maxi y mini-círculos concatenados

(denominada kinetoplasto), y el editado de su ARN; la localización de la mayoría de las enzimas de la glicólisis en un organelo de membrana simple, el glicosoma; y el metabolismo redox basado en un ditiol de bajo peso molecular, el tripanotión (Smith, 1992).

La estructura y composición celular de los tripanosomátidos es similar, aunque no idéntica, a la de una célula eucariota (Fig. 4). Estos parásitos conservan organelos tales como el núcleo celular, mitocondria, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, pero han desarrollado a lo largo de la evolución nuevas estructuras celulares o modificado las ya existentes.

A nivel de la superficie celular, los tripanosomátidos poseen tres estructuras: el glicocálix, la bicapa lipídica, y los microtúbulos subpeliculares. El glicocálix de *T. cruzi* es una cubierta muy fina en epimastigotas y amastigotas y algo más gruesa en tripomastigotas. Los glicoconjugados se encuentran uniformemente distribuidos sobre la superficie del cuerpo celular y flagelo. Un componente importante de la superficie celular son las glicoproteínas. Los mismos forman una densa envoltura altamente inmunogénica, que brinda protección contra el sistema inmune del huésped mamífero, por ejemplo estos parásitos son refractarios a la lisis mediada por complemento (inmunidad innata) (Barret, 2003).

Mediante técnicas de criofractura convencional y microscopía electrónica se demostró que las proteínas integrales de membrana son más abundantes en la forma epimastigota, seguida de la amastigota y en último lugar la tripomastigota (De Souza, 1999). Si bien las proteínas integrales se encuentran uniformemente distribuidas, existen sitios de especialización que presentan diferente composición y arreglos. Uno de ellos es el citostoma o boca celular, presente únicamente en epimastigotas y amastigotas. Este se encuentra formado por un arreglo lineal de partículas intramembranas, creando un área muy pobre en proteínas integrales de membrana, generando así una abertura por donde ingresan macromoléculas del medio. La segunda área especializada es la que se encuentra localizada en la base del flagelo, formando el collar flagelar rico en partículas intramembranas. La última área es aquella involucrada en la unión del flagelo al cuerpo celular.

El citoesqueleto de los tripanosomátidos está básicamente formado por una capa de microtúbulos localizados por debajo de la membrana plasmática. Pequeños puentes de naturaleza proteica conectan los microtúbulos entre sí, a la membrana plasmática y a la cisterna del retículo endoplasmático (De Souza, 1999).

La forma epimastigota de *T. cruzi* es capaz de incorporar un vasto número de macromoléculas. Esto se da a través de un proceso altamente polarizado que ocurre en la región del bolsillo flagelar y, de forma más eficiente, en el citostoma (o boca celular, es una abertura por donde entran las partículas alimenticias a las células con membrana resistente especializadas para la fagocitosis). Las pequeñas vesículas endocíticas formadas en el citostoma, forman largos túbulos y se fusionan con organelos especiales localizados en la región posterior, llamados reservosomas. Este organelo se corresponde con un compartimiento pre-lisosomal. El reservosoma es el sitio de almacenamiento de las macromoléculas tomadas del medio, que pueden ser empleadas durante el proceso de transformación de la forma epimastigota a tripomastigota (De Souza, 1999).

El flagelo de los tripanosomátidos se encuentra involucrado en al menos dos procesos biológicos importantes: el movimiento de la célula y la unión del parásito a la superficie celular de los huéspedes vertebrados y a la membrana perimicrovilar del intestino de los huéspedes invertebrados. El flagelo muestra la organización típica de nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central (axonema) (De Souza, 2009) y la presencia de una estructura compleja que es característica de tripanosomátidos y euglenoides denominada cuerpo paraxial o estructura paraflagelar, la cual contribuye a la motilidad de los parásitos (Matthews, 2005). Esta estructura se encuentra formada por un complejo arreglo de filamentos que están asociados a los dobletes número 4 y 7 del axonema, a través de puentes proteicos (De Souza, 1999).

El kinetoplasto es una condensación de ADN extranuclear ubicado en una región bien definida de la mitocondria, formando una estructura discoide cerca de la base del flagelo. El ADN del kinetoplasto (K-ADN) representa cerca del 30% del total del ADN celular. Se encuentra compuesto por una red de entre 20.000 y 30.000 minicírculos concatenados entre sí. Cada minicírculo tiene un largo de 0,45 μm , siendo altamente

heterogéneos en secuencia, lo cual permite la diferenciación entre cepas y/o clones dentro de una misma especie por ejemplo. Los minicírculos codifican para pequeños ARN guías, que controlan la especificidad del proceso de edición del ARNm codificado por los maxicírculos (De Souza, 1999). Además de los minicírculos, el K-ADN también se compone de maxicírculos de un largo de 6 a 11 μm , siendo estos análogos estructurales y funcionales al ADN mitocondrial presente en todas las células eucariotas. El K-ADN codifica ARNr y subunidades de la cadena respiratoria (De Souza, 2009). La morfología y disposición intracelular del kinetoplasto varía según la etapa del ciclo de vida de las distintas especies de tripanosomátidos. En epimastigotas y amastigotas adquiere una estructura tipo barra localizada de manera anterior al núcleo, encontrándose el ADN altamente condensado. Mientras que en tripomastigotas, presenta una forma más redondeada que se ubica de manera posterior al núcleo, y el ADN tiene un menor grado de condensación (De Souza, 1999).

El glicosoma es un organelo redondeado o alargado con un diámetro de 0,3 μm , alcanzando un largo máximo de 2,8 μm que deriva de los peroxisomas y que a lo largo de la evolución perdió ciertas propiedades de estos últimos (por ejemplo actividad catalasa) y se especializó en una importante función metabólica, la glicólisis. Este organelo contiene a la mayoría de las enzimas involucradas en la vía glicolítica, lo cual incrementa significativamente la eficiencia del proceso de generación de energía (ATP) en estos microorganismos. La compartimentalización de estas enzimas, típicamente citoplasmáticas en células eucariotas, le permite al parásito además afrontar periodos cortos de anaerobiosis (Vonlaufen, 2008).

Los acidocalcisomas son organelos ácidos que acumulan calcio. Se les han asignado diferentes funciones, entre ellas el depósito de cationes y fósforo, el metabolismo del polifosfato, la homeostasis del calcio, el mantenimiento del pH intracelular y la regulación osmótica. Presentan una H^+ -ATPasa vacuolar, Ca^{2+} -ATPasa y una pirofosfatasa en la membrana que rodea al acidocalcisoma. El número de acidocalcisomas varía de acuerdo a la fase del ciclo de vida del parásito (Vonlaufen, 2008).

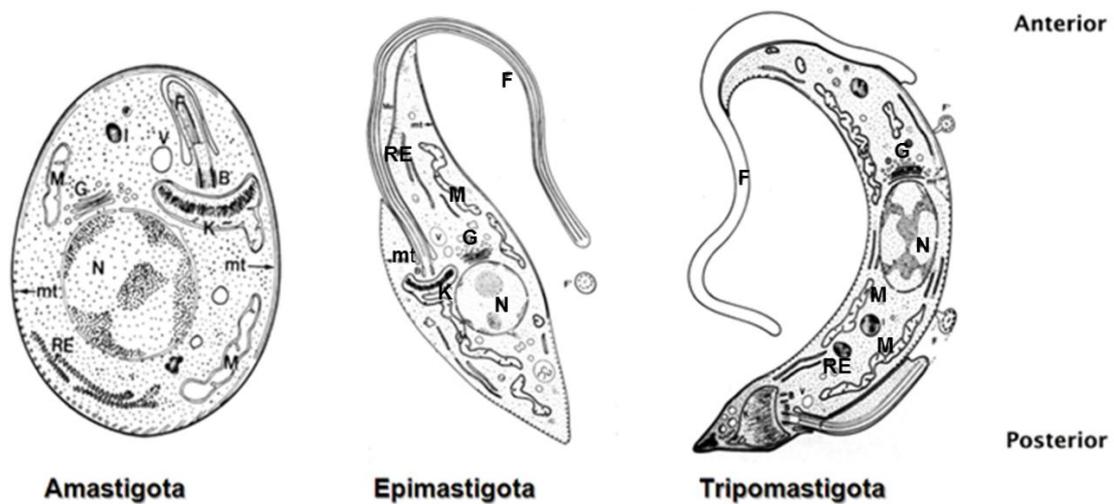


Figura 4. Representación esquemática de la morfología y ultraestructura de *T. cruzi*. Distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. En las imágenes se señalan: retículo endoplasmático (RE), flagelo (F), bolsillo flagelar (B), aparato de Golgi (G), kinetoplasto (K), mitocondria (M) y núcleo (N), vesículas (V). Tomadas y adaptadas de De Souza, 1999.

Los tripanosomas presentan copias altamente conservadas de las tres ARN polimerasas clásicas eucariotas. La ARN polimerasa I transcribe los pre-ARNr (18S, 5.8S y 28S). Esta enzima también transcribe las glicoproteínas de superficie. Por otro lado, la ARN polimerasa II transcribe los ARNm, así como también el gen específico de tripanosomas, *cap4* (con la modificación m7Gpppm6, 2AmpAmpCmpm3Um), el gen del líder de empalme (*spliced leader*, SL). Finalmente, la ARN polimerasa III transcribe ARNt, 5S ARN y los ARNsn ricos en U.

Al igual que los ARNm eucariotas, estos ARNm poseen modificaciones en los extremos 5' y 3'. Los tripanosomas deben integrar las reacciones de poliadenilación y *capping* para poder resolver en unidades estables y traducibles los ARNm individuales que están siendo co-transcritos a partir de los policistrones. Para llevar a cabo este proceso, los tripanosomas presentan un *pool* de *cap 4* altamente modificado de 35 nucleótidos, que deriva del gen de alta copia del ARN SL. Un suministro elevado de SL ARN pre-modificado, permite al parásito sintetizar un gran número de mensajeros maduros. Típicamente, dos ARNm en tándem se encuentran separados por una región intergénica, y la poliadenilación 3' del primer mensajero ocurre luego de que el

segundo mensajero reciba el cap4 que contiene el ARN SL en su extremo 5' (Lustig et al. 2007; Günzl 2010).

Este proceso de eventos inusuales permite al organismo producir numerosos ARNm funcionales en una única ronda de transcripción.

La alta tasa de crecimiento de estos parásitos explica porque estos parásitos no presentan el mecanismo clásico de *capping* co-transcripcional que requiere la pausa de la ARN polimerasa II, así como el reclutamiento de la maquinaria necesaria. Con la transcripción policistrónica los tripanosomas evitan el reinicio repetitivo de la transcripción.

El paradigma eucariota implica que el inicio de la transcripción es un punto clave para regular la expresión génica, controlando así la producción de ARNm por la unión de elementos en *trans* (proteínas reguladoras, como factores basales o activadores) a elementos en *cis* dentro del ADN. Hasta la fecha, no se han encontrado evidencias de que este mecanismo tenga una implicancia significativa en tripanosomas. La transcripción policistrónica, sumado a la ausencia de promotores clásicos para la ARN polimerasa II indican que el inicio de la transcripción no es un factor limitante en la producción de ARNm en tripanosomas.

El suministro continuo de transcriptos, podría estar promoviendo la rápida respuesta a los estreses o cambios ambientales a lo largo del complejo ciclo de vida de estos parásitos. A pesar que a simple vista este tipo de transcripción pueda parecer un gasto de energía innecesario, a la larga podría estar contribuyendo a la supervivencia del organismo en los distintos ambientes que coloniza (Bellofatto 2006; Günzl, 2007; Agabian, 1984).

En lugar de promotores diferenciales, los tripanosomas presentan un genoma plástico que les permite regular la producción de ARNm, y por lo tanto su abundancia. El requerimiento de una gran cantidad de ARN SL para el *capping* de cada ARNm se cumple por la repetición a nivel cromosómico de los genes del ARN SL (Bellofatto 2006, Günzl, 2007; Agabian, 1984).

Luego de terminado el proyecto de secuenciación de los genomas de tres de los tripanosomátidos más importantes a nivel de salud humana (*T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, tritryps) fue posible analizar comparativamente la constitución de los mismos entre las diferentes especies y otros organismos eucariotas. Una gran diferencia que destaca a *T. cruzi* respecto de las otras dos especies secuenciadas es el número y tamaño de las regiones repetidas subteloméricas, donde generalmente se encuentran los genes que codifican las proteínas variables de superficie, retroelementos u otros genes repetidos (ej. DGF/1) (El-Sayed, 2005a, 2005b; Ivens, 2005; Berriman, 2005).

Estas regiones constituyen gran parte del genoma y son muy variables. Dado que los genes del *core* están conservados, estas regiones son responsables de la mayor variación a nivel del tamaño de los cromosomas.

La mayoría de los cromosomas se componen de regiones centrales que contienen tramos policistrónicos de genes. Generalmente los cromosomas presentan al menos una región de salto de hebra (*strand switch*), en donde la dirección de la transcripción cambia. También es posible que las regiones tipo subteloméricas puedan ocurrir dentro de una región central del cromosoma, lo cual se atribuye posiblemente al fenómeno de fusión de cromosomas.

Las regiones de salto de hebra, donde las unidades de transcripción policistrónicas se encuentran cabeza a cabeza o cola a cola, son de gran interés ya que pueden contener sitios de inicio de la transcripción, regiones reguladoras, o en algunos casos actividad centromérica. Son variables en tamaño pudiendo ir de 100 pb a 10 kpb, y pueden llegar a contener genes de ARN. Estudios de actividad centromérica de ciertas regiones de salto de hebra demostraron que son importantes e intervienen en la segregación de cromosomas (Obado, 2005, 2007).

El genoma de *T. cruzi* es altamente repetitivo donde más del 50% consiste de secuencias repetidas (El-Sayed, 2005a). Un gran número de genes, incluidos aquellos que codifican para proteínas con funciones *housekeeping*, se encuentran presentes como genes de múltiple copia, generalmente agrupados en tándem (Campetella, 1992), aunque también pueden ubicarse en cromosomas diferentes (Taylor, 1999). La mayoría de los repetidos en el genoma de *T. cruzi* corresponden a genes, sin embargo también existen otro tipo de elementos repetidos, como por ejemplo varias familias de

retrotransposones (Bringaud, 2007) así como repetidos del tipo satélites (Elias, 2003). El mecanismo de origen de estos repetidos así como el significado funcional es aún desconocido. Posiblemente se vean involucrados en mecanismos de recombinación, conversión génica o de rearrreglos cromosómicos. A pesar de esto, está claro que la naturaleza repetitiva de los genes *housekeeping* esta conservada entre diferentes cepas y que existen mecanismos para mantener la similaridad de secuencias entre copias en tándem (Tomas, 1996; Arner, 2007).

Como ya fue mencionado, los genes de moléculas de superficie involucrados en la interacción huésped-parasito son los que más contribuyen a la naturaleza repetitiva del genoma. Estos genes pertenecen a familias grandes, cada una con miles de miembros, siendo muy complejas dado el grado de divergencia entre los diferentes miembros (desde genes prácticamente idénticos, genes con regiones conservadas y variables a genes divergentes).

A la hora del ensamblaje del genoma de *T. cruzi*, muchos de estos genes fueron subrepresentados al ser colapsados en menos copias. Por esta razón el genoma disponible en las bases de datos es confiable únicamente para las regiones no repetitivas, mientras que las secuencias repetidas se encuentran normalmente incompletas o son engañosas (Arner, 2007).

1.4 – En búsqueda de nuevos blancos terapéuticos

1.4.1 – Tratamientos anti-chagásicos actuales

Si bien existen algunas iniciativas para la generación y desarrollo de vacunas para el tratamiento y/o prevención de esta enfermedad (Aparicio-burgos, 2011, Dumonteil, 2008, Perez-Brandan, 2011), dada la gran variación antigénica que presentan estos tripanosomátidos su desarrollo no resulta promisorio. Por este motivo, los tratamientos quimioterapéuticos son a la fecha, la única opción disponible para el control de la enfermedad.

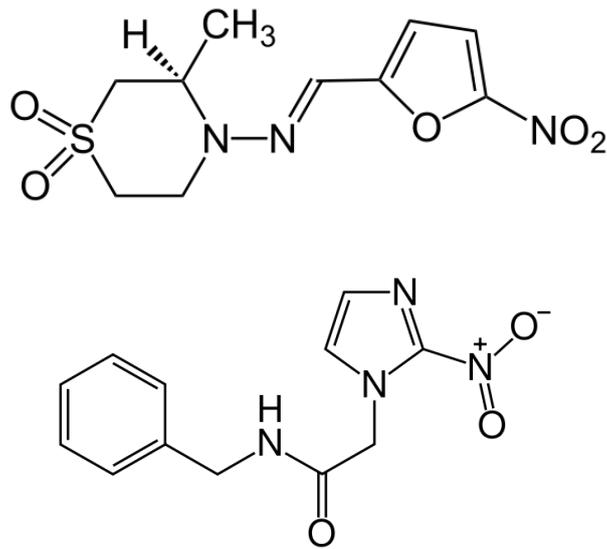


Figura 5. Estructuras químicas de los fármacos en uso clínico para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Arriba, Nifurtimox y abajo, Benznidazol.

Actualmente se encuentran disponibles únicamente dos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, el nifurtimox y el benznidazol (Fig. 5). Sin embargo, su uso es restringido debido a su elevada toxicidad, limitada eficacia en la fase crónica de la enfermedad y su alto costo, debido en parte a la necesidad de tratamientos prolongados (Cavelli, 2009, Irigoín, 2008, OMS 2007).

El nifurtimox (con nombre comercial Lampit®, de Bayer), un nitrofurano, se introdujo por primera vez en la década del 60 para tratar la fase aguda de la enfermedad. Esta droga es tripanocida, matando principalmente a los tripomastigotas circulantes, siendo mejor tolerada por pacientes jóvenes. Por otra parte, benznidazol, un derivado de nitroimidazol, se introdujo en la década del 70 (Barret, 2003). Para ambos derivados nitroheterocíclicos se ha observado el desarrollo de resistencia (Murta, 1998; Sokolova, 2010). Ciertas cepas o clones, como por ejemplo la cepa Colombiana, son resistentes a los tratamientos (Veloso, 2001). También ha sido observada la resistencia cruzada entre el nifurtimox y el benznidazol (Wilkinson, 2008). Las áreas donde las infecciones de Chagas son curadas más frecuentemente, están asociadas a presencia

de cepas con mayor sensibilidad y menor frecuencia de resistencia a las quimioterapias.

Los interrogantes aún no resueltos en relación al tratamiento para la enfermedad de Chagas son, por qué: i) los casos agudos o de infección tienen mejor pronóstico de cura que los casos crónicos, ii) los pacientes de ciertas áreas geográficas responden mejor a los tratamientos respecto a pacientes de otras áreas, iii) los parámetros serológicos de casos crónicos de Chagas no negativizan inmediatamente luego de que se haya logrado la cura, sino que por el contrario este proceso toma años. En relación a este último punto, al menos existen evidencias experimentales que indican que las células dendríticas de animales infectados y curados, quedaban impregnadas con antígenos de *T. cruzi* que estimulaban la producción de anticuerpos (Portela, 2009).

1.4.2 - Portafolio de nuevos tratamientos

La iniciativa “Fármacos para enfermedades olvidadas” (DNDi, por sus siglas en inglés *Drugs for Neglected Diseases initiative*) es una organización sin fines de lucro, orientada por la necesidad de los pacientes, que se dedica a la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos compuestos para enfermedades desatendidas. DNDi también actúa fortaleciendo la capacidad de investigación existente en países endémicos y desarrollando actividades que promueven la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para las enfermedades que reciben poca atención por parte de organismos de salud pública y empresas farmacéuticas. Desde su fundación en 2003, la DNDi ha construido la mayor cartelera existente de I+D para enfermedades causadas por kinetoplastidos y ha desarrollado seis nuevos tratamientos: dos para malaria, uno para la enfermedad del sueño, dos para leishmaniasis visceral y una nueva formulación para el mal de Chagas (DNDi, 2014).

Dentro de los proyectos a corto plazo, la falta de formulaciones pediátricas fue una de las carencias más importantes, la cual ha sido resuelta con la colaboración de un laboratorio farmacéutico brasileiro (LAFEPE – Laboratório Farmaceutico de Estado de Pernambuco) y la DNDi al generar dosis pediátricas de benznidazol.

Actualmente las actividades contra la enfermedad de Chagas se enfocan en: i) completar las pruebas de concepto en fase II del fexnidazol, ii) completar los estudios clínicos de benznidazol en pacientes en fase crónica que persigue valorar la efectividad de tratamientos en plazos menores a los actuales, iii) la optimización de compuestos líderes en Latinoamérica (LOLA, por sus siglas en inglés) asociado a la Universidad de Campinas (UniCAMP), para incrementar el número de nuevos candidatos a fármacos (Coura, 2012).

En ensayos *in vitro*, algunos otros compuestos han demostrado ser eficaces contra *T. cruzi*. Estos incluyen el alopurinol e hipoxantina anti-uricémico (Grosso, 2013; Perez-Mazliah et al., 2013), que es utilizado para tratar la gota, anti-fúngicos que inhiben la síntesis de ergosterol, como el ketoconazol, itraconazol o fluconazol (Kessler, 2013; Iniguez, 2013), e inhibidores de cistein proteasas (Wiggers, 2013). Aun no se ha comprobado la efectividad de estos compuestos *in vivo*.

Más recientemente, posaconazol, otro derivado azólico, fue determinado como un compuesto prometedor por su actividad tripanocida en experimentos con un modelo murino. Este compuesto fue sometido por primera vez a ensayos clínicos desde el descubrimiento de las terapias actuales, sin embargo a pesar de mostrar actividad tripanocida en pacientes, los resultados no fueron mejores que la terapia actual con benznidazol (Molina, 2014; Pecoul, 2009), con la desventaja del alto costo que presenta el tratamiento con posaconazol respecto de este último. Por otro lado, actualmente se está explorando a nivel pre-clínico la efectividad de terapias combinadas con estos azoles, que, de ser exitosas, permitirían reducir los efectos secundarios de benznidazol y nifurtimox y/o la aparición de resistencia, todo ello por reducción de las dosis y tiempos de administración (DNDi, 2014).

1.4.3 – Dianas farmacológicas

La identificación de nuevos blancos terapéuticos requiere del estudio pormenorizado de rutas metabólicas, procesos celulares y sus componentes, especialmente de aquellos que hayan sido reconocidos como indispensables para la supervivencia y virulencia del patógeno. Como ya fue discutido anteriormente, el orden Kinetoplastida

constituye una de las ramas más tempranas de la evolución eucariota que ha desarrollado varias características genéticas y bioquímicas distintivas que ofrecen excelentes candidatos para una intervención terapéutica selectiva. En ese sentido, los proyectos de secuenciación de los genomas de tripanosomátidos patógenos (TriTryps) así como el desarrollo de herramientas moleculares y métodos de alta procesividad han facilitado la identificación de rutas metabólicas y proteínas que califican como candidatos a blancos de fármacos.

Para que una proteína pueda ser considerada como blanco terapéutico, esta debe: (i) en primer lugar, ser indispensable para el patógeno, (ii) presentar algún sitio de unión poco común, o en los casos que la estructura sea desconocida, (iii) poseer particularidades funcionales como su especificidad por sustrato, concentración intracelular o tasa de recambio (Flohé 2012).

El metabolismo redox dependiente de tripanotión es una de las rutas bioquímicas compartida por todos los kinetoplástidos que además de ser indispensable está constituida por entidades enzimáticas que presentan marcadas diferencias estructurales, y en algunos casos funcionales, con los sistemas ortólogos de mamíferos. Estas características convierten al sistema del tripanotión en una interesante fuente de potenciales blancos moleculares para el diseño de fármacos más específicos y efectivos.

1.5 – Análisis funcional de genes en tripanosomas

1.5.1 – *Knock-out*

La técnica genética de *knock out* (KO) o reemplazo de genes consiste en eliminar una o más secuencias codificantes de interés del genoma del organismo en estudio. Esta técnica se utiliza para estudiar la función y/o esencialidad de dicho gen en el contexto biológico del organismo blanco, al permitir comparar las diferencias entre el organismo KO y el salvaje. El reemplazo del gen se logra por recombinación homóloga al introducir secuencias homólogas al gen que se quiere reemplazar que están flanqueando un gen reportero (por ej. resistencia a antibiótico).

Con esta aproximación, la no esencialidad de una proteína queda en evidencia cuando es posible eliminar por completo las secuencias endógenas que la codifican, mientras que la resistencia que ofrezca el organismo a la remoción de dichas secuencias es interpretada como un indicio de indispensabilidad, que, en lo posible, debe ser validado por otros métodos (como el uso de inhibidores específicos, la (co)expresión de versiones salvajes y mutadas del gen, o el silenciamiento post-transcripcional) para descartar artefactos de índole técnico.

En esta estrategia, el reemplazo génico se logra al transfectar las células con un plásmido linealizado que contiene un marcador de selección flanqueado por regiones 5' y 3' no traducibles (NTR o UTRs, del inglés *untranslated regions*) del gen blanco. Dado que los kinetoplastos son diploides, un KO completo requiere dos rondas de delección independientes. En el caso que la eliminación de uno de los alelos sea deletéreo (por ej. que esto conlleve a una reducción de al menos un 50% en la expresión de la proteína blanco), entonces el KO homocigota no podrá ser obtenido (Ingram, 2000). En la práctica, es posible obtener células con doble resistencia aunque sea en baja frecuencia, pero se debe a que las mismas retuvieron en su genoma una copia del locus salvaje. Esta situación puede ser superada con la generación de un KO condicional. Este implica en primera instancia la incorporación de una copia ectópica del gen blanco al genoma del parásito y cuya expresión debe estar bajo el control de un promotor inducible (ver más adelante). La inducción de la expresión del gen ectópico aseguraría concentraciones adecuadas de la proteína blanco, lo cual facilitaría la eliminación de las copias endógenas del gen hasta lograr obtener el KO homocigota. En condiciones de no inducción se pondría en evidencia la indispensabilidad del gen en la línea celular KO.

Una desventaja adicional de esta estrategia se asocia a las posibles alteraciones biológicas que pueden aparecer por el prolongado cultivo *in vitro* o clonados, por lo que siempre es indispensable realizar controles positivos que implican re-transfectar los mutantes con el gen que fue eliminado (Clayton 1999).

Si bien esta metodología es robusta y da resultados con interpretaciones sencillas, su aplicación a los tripanosomátidos es laboriosa e insume mucho tiempo, además de ser impredecible en la práctica debido a la elevada refractariedad al KO y las altas tasa de mutaciones que tienen estos organismos.

1.5.2 - Expresión constitutiva o inducible

La sobreexpresión de un producto génico implica la generación de un alto número de copias del gen de forma artificial. Esto puede (o no) dar lugar a un incremento en los niveles de la proteína blanco. El término sobreexpresión se aplica para organismos unicelulares, e implica la expresión de una proteína por encima de los niveles fisiológicos. Por otro lado, el término de expresión ectópica implica la expresión de un gen en una región del genoma, un tipo celular, estadio del desarrollo o condición donde normalmente no ocurriría. Si bien los principios genéticos atrás son los mismos, el segundo concepto queda abarcado dentro del primero ya que implica un conocimiento previo de los patrones de expresión del gen blanco.

Los estudios de sobreexpresión proveen varias ventajas: i) constituyen herramientas versátiles que pueden aplicarse tanto a organismos salvajes como mutantes ii) permiten identificar tasas de regulación o pasos limitantes, ii) poseen un efecto dominante, por lo que puede ser aplicado de manera sencilla a organismos diploides, iv) provee conexiones funcionales incluso entre genes redundantes, y v) permite determinar la localización subcelular de una proteína de baja expresión e identificar sus potenciales interactores.

En general, los tripanosomas no parecen controlar la expresión génica a nivel del inicio de la transcripción. Las excepciones a esto son por ejemplo las glicoproteínas de superficie de *T. brucei*, donde promotores de la ARN polimerasa I pueden regular la expresión dependiendo del desarrollo y ubicación del locus.

En tripanosomátidos, no se han identificado promotores de la ARN polimerasa II en genes que codifican proteínas y no existen ejemplos de unidades de transcripción inducibles. Los sistemas de sobreexpresión que se emplean en estos organismos utilizan algunas de las pocas secuencias promotoras que se han identificado para estos organismos, como ser la del gen de prociclina (PARP: *procyclic acidic repetitive protein*, una proteína altamente expresada en la forma no infectiva de *T. brucei*), promotores VSG (exclusivamente para *T. brucei*) o promotores de ARNr (para *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. infantum* y *L. tarentolae*) (Clayton, 1999; Uliana, 1996; Tyler-Cross, 1995). De todas

formas, para alcanzar niveles de expresión elevados e independientes de la tasa de transcripción constitutiva dada por promotores endógenos, fue necesario importar la maquinaria de regulación genética de otros organismos.

Para *T. brucei* esto fue desarrollado por Wirtz y Clayton (Clayton 1995), quienes aplicaron a este organismo el sistema de expresión procarionta inducible por tetraciclina. Este sistema se basa en la proteína bacteriana represora de tetraciclina (TetR), que en ausencia de tetraciclina se une al operón de tetraciclina bacteriano, interponiéndose en el camino y/o bloqueando la unión de la ARN polimerasa a la secuencia promotora contigua. Ante el agregado de tetraciclina, esta se unirá a la proteína represora produciendo un cambio conformacional que le hará perder afinidad por la secuencia de ADN del operón permitiendo así que ocurra la transcripción. Inicialmente se utilizó el promotor de tetraciclina de *T. brucei*. Sin embargo, se observó que el sistema era mejor regulado cuando se utilizaba un promotor del bacteriófago T7. La inclusión de esta última secuencia obligó a integrar, en una región transcripcionalmente activa del genoma del parásito, un gen que codifique para la T7 ARN polimerasa.

Un sistema similar fue descrito para *Leishmania*, pero utilizando el promotor endógeno del ARN ribosomal (ARNr) (Stuart, 2001). Incluso para una especie no patogénica de este organismo, *L. tarentolae*, se ha desarrollado un sistema inducible de alta expresión, que tiene aplicaciones biotecnológicas en la producción de proteínas recombinantes (Breitling 2002). Más recientemente sistemas similares han sido generados en *T. cruzi*, en donde los genes de la T7 polimerasa y TetR fueron insertos dentro del gen de la tubulina y su expresión es controlada por el promotor fuerte del ARNr (Da Rocha, 2004). De manera análoga al sistema de inducción bacteriana por tetraciclina desarrollado para *T. brucei*, también se ha desarrollado un vector integrativo que permite una inducción inducible de la expresión bajo el control del promotor T7 y tetraciclina para *T. cruzi* (pTCINDEX; (Taylor, 2006)).

La mayoría de estos vectores fueron diseñados para poder integrarse por recombinación homóloga dentro de un locus transcripcionalmente quiescente y a su vez llevan consigo un promotor que es el que permitirá la expresión del gen de interés.

1.5.3 – Silenciamiento génico post-transcripcional por ARN doble cadena

En eucariotas, el sistema de interferencia del ARN (ARNi) es una defensa natural contra la invasión de ARNs doble hebra (ARNdh) generados por virus o elementos genéticos móviles, o durante el ensamblaje y mantenimiento de la heterocromatina, la metilación de ADN e histonas, el silenciamiento de promotores y, por otro lado, como control del desarrollo celular/tisular (Balaña-Fouce, 2007). Este fenómeno de silenciamiento postranscripcional es guiado por pequeños ARNs de entre 20 a 26 nucleótidos que, dependiendo del proceso en los que se vean involucrados, presentan diferentes características y nombres (Tschudi, 2003).

La presencia de ARN doble cadena es una señal para el silenciamiento de la expresión génica de forma específica (Sharp, 1999). Fue demostrada por primera vez en *Caenorhabditis elegans* en 1998, y en ese mismo año el ARN interferencia fue confirmado para *T. brucei* (Ngo, 1998). En tripanosomas el blanco del ARNi es el ARNm citoplasmático y su degradación puede ser disparada por: i) ARNdh sintético que se introduce a la célula por transfección (electroporación), ii) ARNdh producido *in vivo* por transgenes que se transcriben desde promotores constitutivos o inducibles (Tschudi, 2003).

La ruta de interferencia en tripanosomas africanos involucra dos complejos multidominio: DICER y RISC. DICER es un complejo proteico capaz de generar pequeños siARNs (pequeños ARN de interferencia, de la sigla en inglés *small interference RNA*) a partir del ARNdh. Este complejo presenta un dominio PAZ de unión al ARN y dos dominios ARNasaIII capaces de degradar el ARNdh a siARN.

A causa de la distancia entre ambos dominios catalíticos de la ARNasaIII de cada subunidad (DICER forma dímeros), es que los siARNs generados presentan una longitud de 25 nucleótidos. Por otra parte, RISC se compone de diferentes proteínas siendo una de las más relevantes la argonauta (AGO), la cual posee un motivo RNasa H capaz de clivar ARNm marcado por los siARNs (Balaña-Fouce, 2007).

El mecanismo de acción se puede separar en dos grandes pasos. En primer lugar el complejo DICER, a través de sus dominios RNasaIII se encarga de clivar el ARNdh en fragmentos de 25 nucleótidos (siARNs). Estos fragmentos son desapareados por el dominio helicasa de DICER y luego las cadenas resultantes quedan libres. La cadena

complementaria al ARNm blanco se unirá a éste marcándolo para su degradación por el complejo RISC (Ullu, 2002).

El mecanismo de interferencia de la transcripción es utilizado hoy en día para el silenciamiento de la expresión de genes en *T. brucei*. Sin embargo es importante tener presente que esta técnica no es capaz de suprimir totalmente la expresión de un gen en particular y que el grado de silenciamiento dependerá de la abundancia y vida media de la proteína en cuestión, así como de la cantidad de ARNdH que entre a la ruta del ARNi (Ullu, 2004). Por otro lado, también es importante tener en cuenta la tasa de mutagénesis o efectos epigenéticos con los cuales el organismo tratará de evadir el silenciamiento por ARNi para restaurar la expresión de la proteína blanco (Clayton 1999).

Debido a que es una técnica que permite la degradación de ARNm por hibridación con los siARNs derivados del ARNdH, es posible silenciar de manera simultánea varios genes relacionados, si como blanco del ARNi se eligiera una región conservada dentro de los mismos (ej. la identidad de nucleótidos debe ser $\geq 80\%$). Esto presenta un potencial enorme cuando se lo compara con la técnica de KO, que para genes multicopia que presenten diferente localización cromosomal requeriría un reemplazo secuencia por secuencia, que de acuerdo a su número podría exceder al de agentes de selección disponibles.

Por otra parte, el conjunto de datos experimentales y de información genómica disponible indica que tanto *T. cruzi* como *Leishmania* serían incapaces de silenciar genes por el mecanismo de ARN doble cadena descrito arriba ya que no cuentan con la maquinaria completa que caracteriza a estos sistemas de silenciamiento (por ej. estos tripanosomátidos no codifican para homólogos de AGO1 ni para alguno de los demás genes que componen los complejos DICER y RISC). Las razones propuestas para explicar la ausencia de esta maquinaria son: i) la tolerancia de estos parásitos a elementos de virus doble cadena y ii) la permisividad para ADN episomales (Ullu, 2004, Motyka, 2004).

A pesar de que esta no sería una técnica que se pudiera aplicar para todos los tripanosomátidos, el ARNi es una estrategia rápida, flexible y potente, capaz de inactivar la expresión de determinado/s gen/es en *T. brucei*, de manera comparable a estrategias de KO (Redmond, 2003; Durand-Dubief 2003; Bastin, 2000; Roldán, 2011). Asimismo se debe tener especial cuidado de evitar efectos fenotípicos *off-target* si el ARN doble cadena presenta una secuencia compartida con otro gen que no se desea silenciar. Hoy en día es posible descartar artefactos de este tipo mediante la estrategia denominada “rescate de ARNi”, la cual consiste en rescatar el fenotipo letal del ARNi mediante la expresión de una copia ectópica del gen en estudio cuya secuencia ha sido mutada de manera que se reduce a menos de un 80% la identidad nucleotídica con la región que guiará el ARNi (Ericson, 2014).

1.6 – Metabolismo redox de los tripanosomas

Los organismos aerobios utilizan oxígeno (O_2) para la respiración y oxidación de nutrientes con el fin de obtener energía que abastecerá distintas funciones celulares. Especies reactivas del oxígeno (EROs), como el radical aniónico superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), así como especies reactivas del nitrógeno (por ejemplo $ONOO^-$), son generadas continuamente en células que crecen de forma aeróbica o en respuesta al medio ambiente (como por ejemplo la radiación UV o compuestos que al ser metabolizados por la célula generan EROs) (Imlay, 2003). Estas especies son altamente reactivas y producen la oxidación de moléculas biológicas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, azúcares, etc), pudiendo causar daños irreversibles sobre las mismas con graves consecuencias para la célula (Cabisco, 2000). Los radicales libres y peróxidos pueden atacar directamente los ácidos grasos poli-insaturados en las membranas e iniciar la peroxidación de lípidos. El primer efecto de esta peroxidación es la disminución de la fluidez de las membranas, alterando las propiedades de éstas, pudiendo alterar seriamente a las proteínas de unión a membrana. Estos efectos actúan como amplificadores, generando más radicales libres, degradando ácidos grasos poli-insaturados a una variedad de productos. Algunos de ellos, como por ejemplo los aldehídos, son grupos electrofílicos que pueden modificar distintas biomoléculas. Por otra parte, el ADN es otro de los

principales blancos de las especies oxidantes, las cuales pueden reaccionar tanto contra las bases nitrogenadas como contra los azúcares produciendo roturas simples o dobles en los enlaces, aductos entre las bases y azúcares y *cross-linking* con otras moléculas. Estas modificaciones químicas suelen ser irreversibles e implican un bloqueo del proceso de replicación del material genético. Por último, el ataque de especies oxidantes a las proteínas incluye la oxidación de grupos sulfhidrilo, modificación de grupos prostéticos o *clusters* de metal, *cross-linking* entre proteínas o fragmentación peptídica, entre otras (Cabiscol, 2000).

A lo largo de su evolución los organismos vivos desarrollaron mecanismos de protección contra las especies oxidantes. Uno de ellos lo constituyen los grupos tiólicos activos que están presentes en proteínas y compuestos de bajo peso molecular, los cuales juegan un rol fundamental como amortiguadores que equilibran perturbaciones del estado redox intracelular.

Los kinetoplástidos están equipados con tioles de bajo peso molecular (Fig. 6) y proteínas redox activas que conforman un sistema redox dependiente de tioles único. El principal cofactor redox de bajo peso molecular de este metabolismo lo constituye el tripanotión [N¹-N⁸-bis (glutathionil)espermidina], un ditiol formado por dos moléculas de GSH unidas covalentemente a una molécula de espermidina. Esta molécula fue identificada por primera vez en el tripanosomátido *C. fasciculata* hace más de 25 años atrás (Fairlamb, 1985). Trabajos posteriores confirmaron su existencia en distintas especies de la familia *Trypanosomatidae* (citados en (Krauth-Siegel, 2008)). Apoyando las evidencias bioquímicas recogidas a lo largo de estas últimas décadas en lo que respecta a los componentes del sistema redox de los tripanosomas, los proyectos de secuenciación genómica culminados hace un par de años confirmaron que estos organismos carecen de glutatión reductasa (GR) y tiorredoxina reductasa (TrxR), dos enzimas que contribuyen de manera destacada a la homeostasis redox en las células de mamíferos (Krauth-Siegel, 2008; Smith, 1992). El sistema básico con el que cuenta el parásito para mantener su equilibrio redox se completa con la enzima encargada de regenerar la forma reducida del tripanotión, la tripanotión reductasa (TR) (Krauth-siegel, 1987; Shames, 1986; Smith 1997), y una oxidoreductasa, la triparredoxina (TXN) (Gommel, 1997; Montemartini, 1998), que aporta control catalítico a las reacciones de

oxidoreducción dependientes del ditiol de bajo peso molecular. El hecho que los parásitos sean capaces de soportar el ataque oxidativo durante el proceso de infección y se adapten a diferentes condiciones metabólicas y ambientales durante su ciclo de vida, indica que a pesar del minimalismo de su sistema redox este opera de manera eficiente (Krauth-Siegel, 2008).

El $T(SH)_2$ reemplaza al GSH en la mayoría de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro que ocurren a nivel celular. Se ha determinado que $T(SH)_2$ presenta mayor reactividad que GSH en reacciones de oxido-reducción, una propiedad fundamentada en su naturaleza ditiólica y en el hecho que a pH fisiológico sus cisteínas se hayan en su

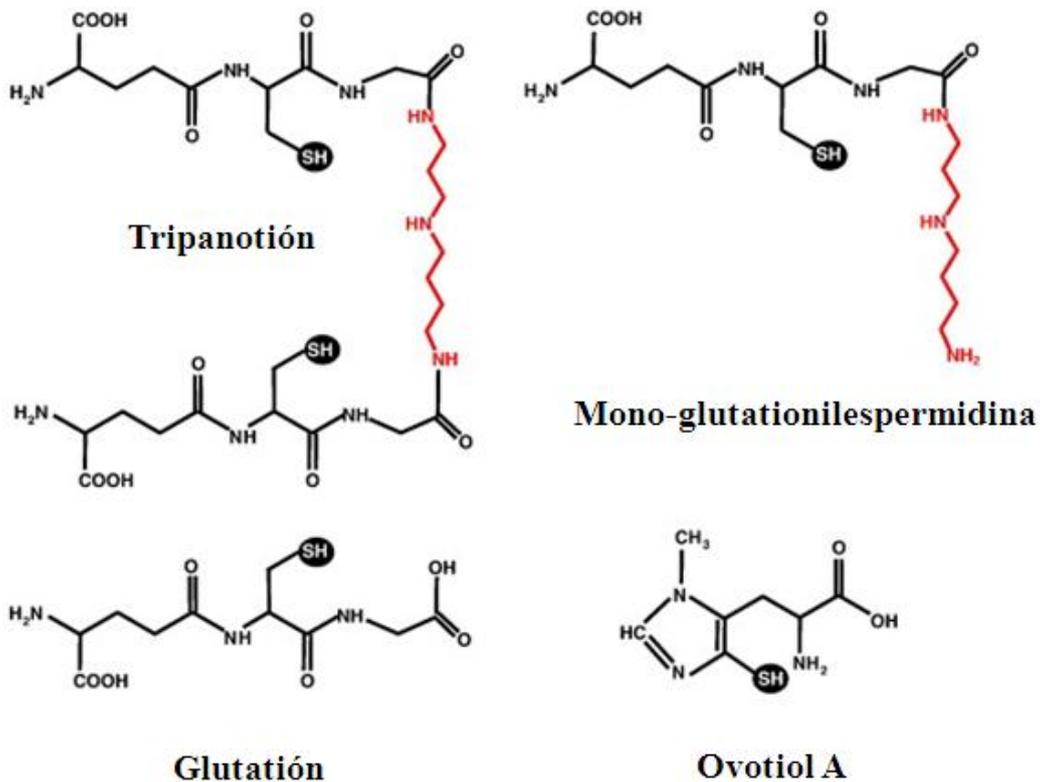


Figura 6. Tioles de bajo peso molecular presentes en tripanosomátidos. El glutati3n (GSH), un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina, contiene un enlace péptidico inusual (gama) entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutámico. El tripanotión [$T(SH)_2$] es el principal (di)tiol de bajo peso molecular de los tripanosomátidos, formado por la unión de dos moléculas de GSH (en negro) y una de espermidina (en rojo). Mono-glutationilespermidina (intermediario en la síntesis de tripanotión) y ovotiol A son otros tioles de bajo peso molecular presentes en estos parásitos. Los grupos tiólicos de las moléculas se marcan con círculos negros.

forma desprotonada, tiolato, la cual es más reactiva para intervenir en reacciones de intercambio tiol-disulfuro (Moutiez, 1994). Por otro lado, se ha propuesto que estas propiedades del $T(SH)_2$ favorecen la formación de puentes disulfuro intramoleculares luego de una o dos oxidaciones, previniendo la formación de radicales sulfinilo ($RSO\dot{O}$), una especie capaz de propagar la oxidación a otras moléculas. Los niveles de $T(SH)_2$ varían a lo largo del ciclo de vida del parásito, por ejemplo para el caso de *T. cruzi* su concentración es de 1,5-2,1 mM en epimastigotes, 0,5 mM en tripomastigotes y 0,12 mM en amastigotas (Ariyanayagam, 2001; Ariyanayagam, 2003; Maya, 1997; Thomson, 2003), mientras que para *T. brucei* sanguíneos los valores oscilan entre 0,1 y 0,34 mM y para la forma procíclica el valor es cercano a 0,34 mM (Ariyanayagam, 2001; Comini, 2007; Shahi, 2002).

El $T(SH)_2$ se mantiene en su estado reducido por la actividad NADPH-dependiente de la TR (Fig. 7). Esta enzima, perteneciente a la familia de las FAD-cisteín-oxidoreductasa, es un homodímero, con una masa de 55 kDa por subunidad (Krauth-siegel et al. 1987). La TR tiene un 35% de identidad de secuencia con la GR humana, compartiendo ambas muchas propiedades físicas y químicas, no así su especificidad por la naturaleza química de los disulfuros a ser reducidos: TR interactúa con formas oxidadas cargadas positivamente de conjugados glutatión-poliamina como $T(SH)_2$ y glutatiónil espermidina, mientras que GR sólo acepta glutatión oxidado (GSSG) cuya carga neta es negativa (Bradley, 1991; Iribarne, 2002). La especificidad está determinada por 5 aminoácidos en el dominio de unión al sustrato, que hace al sitio activo de la TR más amplio, hidrofóbico y negativo respecto al de GR (Bradley, 1991; Iribarne, 2002). La TR de varios tripanosomátidos, incluidos *T. cruzi* y *T. brucei*, contiene una extensión C-terminal con una señal putativa de localización glicosomal, por lo que se ha llegado a postular que una fracción de la enzima se halla en este compartimento además del citosol (Schlecker, 2005). Dado que los tripanosomas carecen de GR y TrxR, la TR es la única enzima capaz de conectar los sistemas del NADPH con el redox dependiente de tioles. Experimentos de genética reversa en *T. brucei* han demostrado que la TR es esencial para la viabilidad de los parásitos, validando a esta enzima como uno de los posibles blancos terapéuticos dentro del metabolismo tiólico del parásito (Krieger, 2000; Tovar, 2000).

Triparredoxina, TXN, es el nombre que reciben aquellas oxidoreductasas perteneciente a la superfamilia de las tioredoxinas que son encontradas exclusivamente en el orden *Kinetoplastida*. Las TXNs son enzimas tripanotión-dependiente, que difieren de las tioredoxinas (Trxs) típicas en varios aspectos: i) comparten sólo un 15% de homología con ellas, ii) son aproximadamente 5 kDa más grandes que las Trxs y iii) su sitio activo es WCPPCR, en lugar del clásico WC(G/A)PCK presente en la mayoría de las Trxs (Ludermann, 1998). A diferencia de las Trxs típicas, TXN no es reducida directamente por una flavoproteína NADPH-dependiente (la TrxR) sino por T(SH)₂ (Gommel, 1997) (Fig. 7). TXN es una proteína muy abundante, en la forma infectiva de *T. brucei* alcanza una concentración intracelular de hasta 100 µM (Comini, 2007) mientras que en *C. fasciculata* representa entre un 3-5% del contenido proteico soluble total (Gommel, 1997). Existen isoformas citosólicas y mitocondriales de TXN. Esta enzima aporta control catalítico a la mantención del equilibrio redox intracelular del parásito ya que resuelve enlaces disulfuro intramoleculares de distintas proteínas blanco con una eficiencia que llega a ser al menos tres órdenes de magnitud superior a la del T(SH)₂ (Castro, 2008). El mecanismo de reacción de la TXN con sus blancos involucra a ambas cisteínas de su sitio activo. La cisteína N-terminal del motivo CPPC del sitio activo está expuesta al solvente, y su nucleofilicidad está garantizada por un rápido intercambio de protones que involucra a la segunda cisteína y una red de residuos internos sin carga. Los aniones tiolato reaccionan con disulfuros de proteínas específicas, dando lugar a la formación de puentes disulfuro mixtos entre la TXN y la molécula blanco. El ataque del disulfuro mixto por la cisteína C-terminal del sitio activo de la TXN libera el blanco proteico reducido generándose concomitantemente la forma oxidada de TXN (Schlecker et al. 2005). La regeneración de TXN reducida se da por una reacción espontánea con el T(SH)₂. Los sustratos mejor estudiados de la TXN son distintos tipos de peroxidasas y la ribonucleótido reductasa (Krauth-Siegel, 2002). Existen otras proteínas que son discutidas como potenciales blancos de acción de la TXN, como aquella que participa en la replicación del ADN mitocondrial (la UMSBP, *universal minicircle sequence binding protein*) (Avrahami, 1995), en la biogénesis de centros ferro-sulfurados (glutarredoxinas monotiólicas) (Filser, 2008), en la generación de NADPH y pentosas-5-fosfato (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) (Krauth-Siegel, 2008), precursores de poliaminas (cistationin-γ-liasa, metiltioadenosin fosforilasa, amidino

transferasa) y algunas involucradas en la síntesis y degradación proteica (Krauth-Siegel, 2008; Piñeyro et al., 2011). Dado que la función de muchas proteínas depende del estado redox de algunos de sus residuos de cisteína, los cuales pueden cumplir roles catalíticos o estructurales importantes, la actividad tiol/disulfuro oxidoreductasa de TXN le asegura al parásito el control y sostenimiento de dichas funciones.

1.7 – Tripanotión

1.7.1 – Funciones del tripanotión

1.7.1.1 – Mantenimiento del balance redox y niveles de poliaminas

Una de las rutas metabólicas a las cuales el T(SH)₂ dona poder reductor es aquella que incluye los sistemas de detoxificación de especies oxidantes (ver Fig. 7,8) tal como el H₂O₂, el peroxinitrito, ciertos peróxidos de compuestos orgánicos de cadena corta, de ácidos grasos y de fosfolípidos (Wilkinson, 2002; Krauth-Siegel, 2005). El armamento antioxidante de *T. cruzi* y *T. brucei* está distribuido en diferentes compartimientos subcelulares (citosol, mitocondria, glicosoma y retículo endoplasmático), donde actúa frente a una gran variedad de oxidantes. Los componentes básicos del mismo son las peroxirredoxinas, peroxidasas del tipo glutatión peroxidasas (GPx) y las superóxido dismutasas (SOD). *T. cruzi* y *Leishmania* poseen además una hemoperoxidasa ascorbato-dependiente (APx) (Wilkinson, 2002; Adak, 2013). Es interesante hacer notar que para ambos parásitos se ha descrito un mayor contenido de estas enzimas tanto en las formas infectivas como en cepas de marcada virulencia (Piacenza, 2009). Esto puede interpretarse como una adaptación del parásito previa a la invasión de determinados tipos celulares del huésped, como pueden ser las células del sistema inmune. En ese sentido, los macrófagos activados por citoquinas proinflamatorias (como por ejemplo IFN- γ y TNF- α) representan una primera línea de defensa contra las infecciones causadas por estos parásitos. Bajo estas condiciones, los macrófagos producen altos niveles de óxido nítrico (·NO) debido a la activación inducible de la sintasa de óxido nítrico. Por otro lado, se ha demostrado que la invasión/internalización de tripomastigotas de *T. cruzi* por macrófagos *naive*, actuaría

como estímulo activador del complejo NADPH oxidasa lo cual desencadenaría la producción de O_2^- que en presencia de $\cdot NO$ forma peroxinitrito (Alvarez, 2011), una molécula altamente tóxica capaz de matar al parásito recientemente fagocitado. Dentro de las enzimas antioxidantes del parásito se destacan las peroxidases del tipo peroxirredoxina clásica (PRXs) y las estructuralmente relacionadas a las glutatión peroxidases (GPXs). Ambos grupos de enzimas emplean TXN como fuente de electrones durante la descomposición de peróxidos, y por lo tanto a nivel de actividad biológica se las denomina como triparredoxina-peroxidases. Las PRXs presentan actividad reductora de hidroperóxidos, peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos (Hillebrand, 2003; Wilkinson, 2000). Estas carecen de grupos prostéticos o iones metálicos, sino que en su lugar utilizan cisteínas redox activas para catalizar la descomposición de grupos peróxidos. Al igual que las PRXs, las GPXs se especializan en descomponer compuestos oxidantes con una alta eficiencia catalítica, existiendo cierta preferencia por peróxidos lipídicos (Schlecker, 2005; Wilkinson, 2002). Si bien a nivel de secuencia las GPXs de tripanosomátidos presentan un alto nivel de identidad con las GPXs clásicas, las primeras carecen (ausencia o mutación no conservada) de los residuos de unión a GSH lo cual explica su baja afinidad por este tiol y, en parte, su dependencia en TXN como fuente de equivalentes de reducción (Castro, 2008).

La APx es una hemoperoxidasa localizada en el retículo endoplásmico de *T. cruzi*, aunque también se ha observado expuesta al medio extracelular anclada a la membrana (M. Hugo, no publicado), la cual utiliza ácido ascórbico como agente reductor (Wilkinson, 2002). Su relevancia funcional es hasta el momento desconocida, aunque se especula acerca de un rol antioxidante en esta organela donde el potencial redox es predominantemente menos electronegativo. Dado que *T. cruzi* carece de una dehidroascorbato reductasa, y que tripanotión mostró ser un eficiente reductor de dehidroascorbato (Clark, 1994; Krauth-Siegel, 1996), la función de esta enzima dependería en última instancia del poder reductor provisto por el sistema redox del tripanotión (Fig. 7) (Irigoín, 2008)

Además de $T(SH)_2$ y GSH, *T. cruzi* también presenta otros tioles de bajo peso molecular, incluyendo a la mono-glutationilpermidina (Gsp) y ovotiol A (N^1 -metil-4-mercaptohistidina). La concentración de estos tioles varía durante el ciclo de vida del

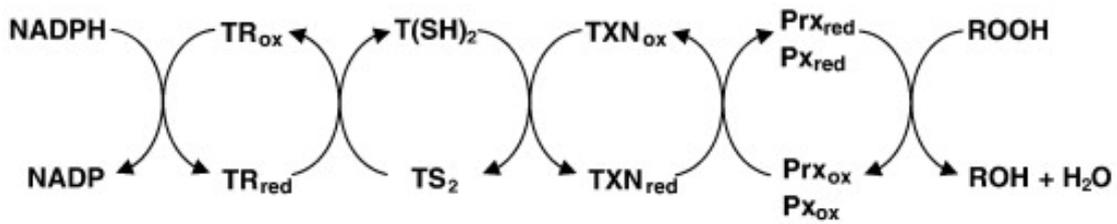


Figura 7. Esquema del metabolismo de peróxidos mediado por T(SH)₂. La descomposición de peróxidos (ROOH) es llevada a cabo por peroxirredoxinas (Prx) y peroxidasas (Px), enzimas que obtienen sus equivalentes de reducción de una cascada compuesta por triparredoxina (TXN), tripanotión [T(SH)₂] y tripanotión reductasa (TR), que adquiere poder reductor de NADPH. Los subíndices red y ox hacen referencia al estado de redox, ditiólico o disulfuro, respectivamente, de las proteínas.

parásito y sus fases de crecimiento, siendo el tripanotión el más abundante en todas las etapas (Krauth-Siegel, 2008). Aunque se han reportado algunas funciones para la Gsp y el ovotiol A *in vitro* (Chiang, 2010; Bollinger, 1995; R. Krauth-Siegel, 2008; Oza, 2002) las mismas no fueron verificadas *in vivo*.

Por otro lado, el pool de tioles de bajo peso molecular, incluyendo al T(SH)₂, podría estar jugando un rol importante como *buffer* y *scavenger* de radicales derivados de NO₂ y CO₂ (NO₂ o CO₃⁻) y de proteínas (radical tirosilo) (Irigoín, 2008).

1.7.1.2 - Detoxificación de xeno y endobióticos

Los organismos superiores están equipados con una gran familia de glutatión-S-transferasas capaces de catalizar el ataque nucleofílico del glutatión a una variedad de xenobióticos electrofílicos e hidrofóbicos, para formar productos S-conjugados que son generalmente menos tóxicos y más fáciles de excretar que los compuestos originales. En tripanosomátidos, no se ha encontrado actividad glutatión S-transferasa (Fairlamb, 1992), sin embargo al analizar extractos de *L. major*, *L. infantum*, *L. tarentolae*, *T. brucei* y *C. fasciculata* pero no en *T. cruzi*, se encontró una enzima que cumplía las mismas funciones con especificidad por los tioles T(SH)₂ y Gsp, la cual fue denominada tripanotión S-transferasa (Vickers TJ, 2004). El rol biológico de dicha actividad aún no ha sido demostrado, aunque podría especularse una función relacionada a la

neutralización de ciertos fármacos (melarsoprol, antimoniales) ya que se ha observado la formación de aductos estables con tripanotión (Alsford et al. 2012).

1.7.1.3 - Síntesis de deoxirribonucleótidos

El T(SH)₂ juega un rol importante en la síntesis de ADN, proveyendo equivalentes de reducción para la síntesis de precursores de ADN a través de la ribonucleótido reductasa (RR). En grandes concentraciones, el T(SH)₂ es capaz de reducir a la RR, siendo hasta el momento el único tiol de bajo peso molecular conocido capaz de cumplir dicha función con alta eficiencia. En presencia de TXN, el flujo de electrones hacia la RR se acelera. Se ha demostrado que la forma oxidada de tripanotión (TS₂) es capaz de inhibir la reducción de la RR mediada por TXN lo que establece una conexión directa entre el estado redox de la célula y su capacidad proliferativa (Dormeyer, 2001). Asimismo se ha sugerido que T(SH)₂ y una isoforma mitocondrial de TXN operan de manera concertada para reducir y activar a una enzima involucrada en la replicación del ADN mitocondrial (UMSBP), aunque estudios recientes del mismo grupo de trabajo plantean ciertas dudas sobre la presencia de estas moléculas en dicho organelo (Motyka, 2006).

1.7.1.4 - Otras funciones

Las glutarredoxinas son pequeñas proteínas de la superfamilia de las proteínas con plegamiento tipo Trx. Normalmente se clasifican de acuerdo al número de cisteínas en su sitio activo, encontrándose las ditiólicas (motivo CXXC, 2-C-Grx) o monotiólicas (motivo CXXS, 1-C-Grx).

La mayoría de los organismos se encuentra equipado con al menos dos isoformas de 2-C-Grxs localizadas en diferentes compartimentos subcelulares, donde operan como oxidoreductasas dependientes de GSH catalizando la (de)glutathionilación de proteínas así como la reducción de dehidroascorbato y disulfuros proteicos (Manta, 2013).

Por otro lado, las 1-C-Grxs fueron descubiertas más recientemente, y salvo algunas excepciones, carecen de actividad reductora de disulfuros (Rahlf, 2001; Tamarit, 2003).

En la mayoría de los organismos, el mecanismo de acción de las 2-C-Grxs está estrechamente relacionado con el sistema GSH/GR, dado que el disulfuro intramolecular en la proteína oxidada se regenera mediante reducción no enzimática por dos moléculas de GSH. El GSSG resultante es reducido por la GR a expensas de NADPH (Deponte 2013). En tripanosomas, esta función es llevada a cabo por el T(SH)₂, ya que la constante de segundo orden para la reducción de 2-C-Grxs recombinantes por este ditiol es 1000 veces mayor que para GSH. Más aún, la 2-C-Grx1 cataliza con gran eficiencia la reducción de GSSG a expensas de T(SH)₂, sustituyéndose así a la GR ausente (Ceylan et al. 2010).

En células eucariotas, la formación de disulfuros mixtos entre proteína y GSH (glutathionilación) es la modificación post-transcripcional más frecuente en los residuos de cisteína, seguida de la adición de lípidos (Schuppe-Koistinen, 1994; Xiong, 2011). A nivel fisiológico, la glutathionilación de proteínas ocurre principalmente por una reacción del GSH con un ácido cisteinsulfénico de la proteína llevando a la formación de un disulfuro mixto, que protegerá a la cisteína de su sobreoxidación y/o regulará la actividad de dicha proteína. La reducción de este hetero-disulfuro ocurre casi exclusivamente por la catálisis de 2-C-Grxs a expensas de un mecanismo monotiólico que involucra a la cisteína del sitio activo y una segunda molécula de GSH, que reduce el disulfuro mixto entre la glutarredoxina y el GSH.

Ensayos *in vitro* con proteínas de *T. brucei* mostraron que es posible formar disulfuros mixtos a concentraciones fisiológicas de los disulfuros de GSH y Gsp oxidantes (0.25–0.5 mM) y de manera selectiva contra ciertas cisteínas (Melchers, 2007). Recientemente, se ha encontrado un link entre el metabolismo de Gsp y 2-C-Grxs en *E. coli* con la identificación de la tiolación de proteínas por Gsp (Chiang, 2010).

Los centros ferrosulfurados son cofactores con átomos de hierro conectados con sulfuro inorgánico. Dentro de los mismos, los *clusters* binucleares [2Fe-2S] son los más simples y mejor representados en la biología. En general los *clusters* [2Fe-2S] están unidos a proteínas por cuatro átomos de sulfuro, que provienen de las cadenas laterales con residuos de cisteína y se encuentran unidos en reacciones de transferencia de electrones debido a la propensión con que los átomos de Fe pueden

alternar entre un estado reducido (Fe^{2+}) y oxidado (Fe^{3+}). Ciertas 2-C-Grxs y casi todas las 1-C-Grxs de tripanosoma caracterizadas a la fecha son capaces de unir *clusters* de hierro-azufre (Manta, 2013).

Independientemente de su clasificación como mono o ditiólicas, las Grxs anclan el ISC a expensas de la cisteína N-terminal del sitio activo de dos subunidades y grupos tiólicos adicionales que provienen del GSH unido a cada subunidad de la proteína. En los pocos casos estudiados, el *cluster* [2Fe-2S] unido por 2-C-Grxs no participa en reacciones de transferencia de electrones pero sirve como elemento regulatorio que apaga la actividad oxidoreductasa al secuestrar la cisteína del sitio activo (Manta, 2013). Las 1-C-Grxs de mitocondria actuarían como chaperonas moleculares facilitando la transferencia de estos centros ferrosulfurados por parte de un complejo multiproteico a las proteínas aceptoras (Manta et al. 2013). Al margen de la dependencia redox que pueda existir entre las 1- o 2-C-Grxs con el sistema del tripanotión, ya que ambas proteínas poseen tioles que para ser funcionales deben encontrarse en el estado reducido, es interesante destacar el hallazgo que este ditiol puede participar como ligando de los *clusters* sea como cofactor de las glutarredoxinas o bien en forma independiente (Ceylan, 2010; Manta, 2013).

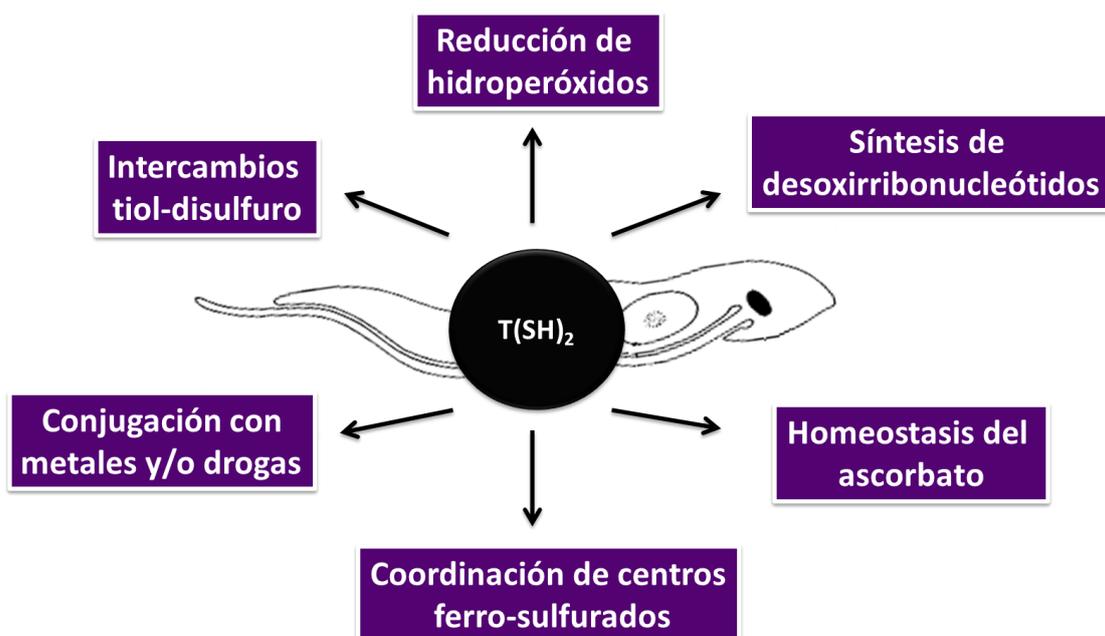


Figura 8. Funciones del tripanotión.

1.8 – Biosíntesis de tripanotión

1.8.1 – Sustratos para la biosíntesis del tripanotión

La síntesis del T(SH)₂ es resultado de la convergencia de las rutas metabólicas del GSH y la espermidina, las cuales se encuentran desvinculadas en mamíferos. El T(SH)₂ se crea por la unión secuencial covalente de dos moléculas de GSH a los grupos NH₂ terminales de la espermidina, proceso que consume un total de dos moléculas de ATP (Fig 8B).

Al igual que otros organismos, los tripanosomátidos son capaces de sintetizar GSH a partir de sus aminoácidos precursores a través de dos reacciones ATP-dependientes. La primera enzima de la ruta, la glutamilsteín sintetasa (GshA), cataliza la etapa limitante de la síntesis y ha demostrado ser esencial para *T. brucei*, mientras que la segunda reacción es llevada a cabo por la glutatión sintetasa (GshB) (ver Fig 9B) (Huynh, 2003; Lueder, 1996).

El modo en el que los parásitos obtienen la espermidina varía según la especie. *T. brucei* spp, *Leishmania* spp. y *C. fasciculata* son capaces de sintetizar poliaminas *de novo* a partir de arginina, a través de la acción concertada de la arginasa y la ornitina descarboxilasa (Balaña, 2012; González, 2001; Peluffo, 2004; Taylor, 2008). La diamina resultante, putrescina, es luego convertida en espermidina por la espermidina sintetasa (SpS). Se ha identificado a la molécula de espermidina como la poliamina crucial para la proliferación de los parásitos, siendo confirmada la indispensabilidad de la SpS para los tripanosomas africanos (Taylor, 2008).

Sin embargo, para *T. cruzi* el escenario es distinto. Los parásitos en cualquiera de sus tres estadios son capaces de incorporar poliaminas del medio extracelular a través de transportadores que contienen residuos tiólicos críticos para su actividad (Quesne, 1996).

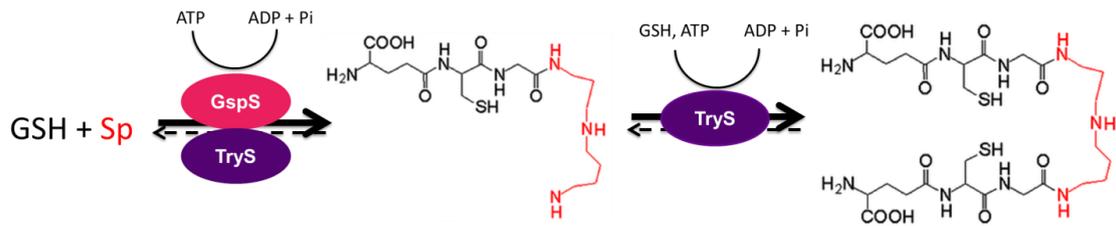


Figura 8B. Biosíntesis del tripanotión. La síntesis de tripanotión requiere ATP y ocurre en dos etapas sucesivas, en las cuales se adiciona una molécula de glutatión (GSH, en negro) a espermidina (Sp, en rojo) o a mono-glutationil-espermidina. La enzima tripanotión sintetasa (TryS, violeta) es capaz de catalizar ambas reacciones de conjugación, mientras que la monoglutationil-espermidina sintetasa (GspS, rosado) sólo la primera. La flecha negra indica la reacción de síntesis catalizada por los dominios sintetasa de GspS y TryS, mientras que la flecha punteada señalan la reacción de hidrólisis de tripanotión y monoglutationil-espermidina catalizada por el dominio amidasa de las enzimas.

Por otro lado, ciertos estudios indican que *T. cruzi* sintetiza putrescina a través de una ruta diferente a la presente en los otros tripanosomátidos, pero similar a aquella usada por procariontes y el parásito protozoario *Cryptosporidium parvum*. Esta vía involucra a la enzima arginina decarboxilasa (ADC), que forma agmatina a partir de arginina y la agmatinasa que convierte agmatina en putrescina (ver Fig. 9B) (Morris 2009).

1.8.2 – Glutationil-espermidina sintetasa y tripanotión sintetasa

La reacción de síntesis de $T(SH)_2$ puede ser catalizada por una o dos enzimas, según el organismo, denominadas tripanotión sintetasa (TryS), y glutatiónil-espermidina sintetasa (GspS) (Ariyanayagam, 2005; Comini, 2003; Koenig, 1997; Oza, 2002; Smith, 1992, Oza, 2005; Souza, 2013)(Fig. 9). TryS es capaz de catalizar ambos pasos, sin embargo GspS solo podría realizar el primero de ellos.

Estas enzimas, codificadas por genes de copia única por genoma haploide, se presentan como monómeros con un peso molecular de aproximadamente 74 kDa y 83 kDa, respectivamente. Si bien la GspS se encuentra distribuida en otros organismos (principalmente eubacterias, ver sección 4.1.1), la TryS es exclusiva de tripanosomátidos, no existiendo homólogos en los mamíferos.

La GspS de *C. fasciculata*, la única enzima de kinetoplastos caracterizada hasta la fecha, posee una K_M por la espermidina 126 veces menor que la CfTryS y una relación k_{cat}/K_M para este sustrato que es dos órdenes de magnitud superior al de esta última enzima (Comini, 2004). Por lo tanto, se ha propuesto que la GspS estaría especializada únicamente en catalizar la primera reacción de la ruta de biosíntesis del tripanotión (formación de Gsp) (ver Fig.8B). El genoma de *T. cruzi* codifica una secuencia putativa de GspS (TcGspS) que aún no ha sido caracterizada. Contrariamente, *T. brucei* y *L. major* sólo dependen de la expresión de TryS para asegurar la formación del tripanotión y, carecen o presentan secuencias truncadas (pseudogen) de la GspS, respectivamente.

Se ha sugerido que Gsp, aparte de ser el intermediario en la biosíntesis de T(SH)₂, cumple funciones de almacenamiento de espermidina y GSH (Fairlamb, 1992). Su forma disulfuro es reducida por la TR con una eficiencia comparable a la reacción que tiene lugar con T(SH)₂ (Jockers-Scherub, 1988). Además, Gsp es capaz de formar disulfuros mixtos con tioles específicos de proteínas y de reemplazar al tripanotión en la detoxificación de hidroperóxidos mediada por TXN (Melchers, 2007).

Por otro lado, la TcTryS tiene un amplio espectro de especificidad por sustratos poliamínicos, como la aminopropilcadaverina y la espermina, aparte de la espermidina (Oza, 2002). Los respectivos productos glutationilados (entendido como el proceso de adición de una molécula de GSH sin involucramiento del tiol), llamados homotripanotión y mono o bis-(glutationil) espermina, también son sustratos de la TR (Ariyanayagam, 2003). Esta afinidad por distintas poliaminas puede entenderse como una consecuencia evolutiva debido a la incapacidad de *T. cruzi* de sintetizar poliaminas *de novo* que además podría redundar en ventajas metabólicas en caso de escasez de espermidina en el medio extracelular. Sin embargo, esto último requiere del estudio del *pool* de las diferentes poliaminas en los distintos organismos hospederos del parásito así como determinar si estos análogos del T(SH)₂ pueden participar en las mismas reacciones/funciones asignadas a este último.

La actividad sintetasa de estas enzimas reside en su dominio C-terminal. El mecanismo catalítico propuesto involucra la formación de un complejo ternario entre GSH, Mg²⁺-ATP y la enzima, llevando a la activación del GSH (probablemente por fosforilación del

grupo carboxilo de la glicina) para que luego tenga lugar la adición de GSH al grupo amino terminal de la espermidina o Gsp (en el caso de la TryS) (Comini, 2005; Fyfe, 2008; Koch, 2013).

A su vez, además de presentar actividad sintetasa, todas las TryS y GspS estudiadas hasta la fecha presentan una actividad T(SH)₂/Gsp- amidasa localizada en el dominio N-terminal (Oza, 2002; Oza, 2003; Fyfe, 2008). La enzima hace uso de su actividad amidasa para hidrolizar los productos y convertirlos en los sustratos originales, GSH y espermidina. Se cree que estas funciones opuestas de síntesis e hidrólisis no son meramente un ciclo fútil, sino que a partir de la acción de la TryS o GspS se estarían regulando los niveles de poliaminas en respuesta a la disponibilidad de éstas en el medio o de acuerdo a la fase de crecimiento celular (Smith, 1995; Chiang, 2010).

Niveles elevados de poliaminas son esenciales para el crecimiento y proliferación de las células. De ésta manera es que la biosíntesis y conversión de poliaminas está altamente regulada. En mamíferos, el control de los niveles de las poliaminas se logra, en primera instancia, a través de la regulación de la tasa de síntesis y degradación de las enzimas encargadas de su producción, lo cual incluye la actividad de tres enzimas, la ornitina descarboxilasa (ODC), la S-adenosilmetionina descarboxilasa y la poliamina N¹-acetiltransferasa (Shim, 1988; Willert, 2012). Este mecanismo de regulación no aplicaría para los tripanosomátidos, los cuales carecen de un control eficiente de la expresión de genes y donde las enzimas homólogas poseen una vida media inferior a la de los mamíferos (menor a una hora) (Fairlamb, 1992). Esto plantea la posible existencia de vías alternativas de regulación del *pool* de poliaminas. Sin embargo, la hipótesis que la actividad amidasa de la GspS y TryS contribuirían a mantener un equilibrio en el pool de poliamina de acuerdo a las necesidades metabólicas de la célula, fueron recientemente puestas en duda, al menos para el tripanosoma Africano (Torrie, 2009). En este trabajo, la sobreexpresión de un mutante de la TryS carente de actividad amidasa en una línea celular de *T. brucei* desprovista de secuencias de la TryS endógena (KO de TryS) no otorgó ninguna ventaja o desventaja para el crecimiento y supervivencia *in vitro* e *in vivo* de la forma infectiva del parásito.

La enzima GspS, que no es necesaria para la síntesis de T(SH)₂, debe cumplir funciones biológicas de regulación de los niveles de Gsp en los parásitos que la presentan. Uno

de los pocos ejemplos podría ser *C. fasciculata*, donde la espermidina libre puede ser secuestrada como glutationilespermidina o T(SH)₂ en la fase estacionaria de crecimiento, cuando comienzan a escasear los nutrientes y el medio de cultivo se acidifica (Chiang, 2010). Cuando el parásito es nuevamente cultivado en condiciones óptimas, la glutationilespermidina y el T(SH)₂ se convierten rápidamente en espermidina libre y GSH, sin ser necesaria la síntesis *de novo* de estas biomoléculas. Se cree que este efecto estaría mediado por los cambios en el pH intracelular, afectando la actividad catalítica relativa de las enzimas GspS y TryS (Fairlamb, 1992).

En *E. coli*, Gsp es capaz de formar disulfuros mixtos con los tioles de proteínas, estando ligado el número de estos disulfuros mixtos a las condiciones redox intracelulares. Ha sido demostrado que los niveles de Gsp aumentan cuando *E. coli* sufre de estrés oxidativo (como por ejemplo en la fase estacionaria del crecimiento celular). En esta etapa ocurre una inactivación selectiva del dominio amidasa de la GspS, llevando a la acumulación de su producto. En estas condiciones se plantea que Gsp actuaría en la neutralización de oxidantes o protegiendo de la oxidación a las cisteínas de proteínas mediante la formación de disulfuros mixtos (Chiang, 2010). De esta forma Gsp contribuiría a restablecer la homeostasis redox y, concomitantemente, a recuperar la actividad amidasa de la GspS. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios relacionados a la S-tiolación de proteínas se enfocan en GSH, dado que es el tiol más abundante en la mayoría de las células. Sin embargo la tiolación con otro tipo de tioles como por ejemplo cisteína o Gsp, puede llegar a tener efectos diferentes. Se ha demostrado que Gsp es un agente tiolante más eficiente que GSH (Chiang, 2010). GSH está cargado negativamente (-1) a pH fisiológico, mientras que Gsp es positiva (+2). Por lo tanto, Gsp y GSH introducen cargas opuestas a las proteínas. Como los tioles de las proteínas se encuentran desprotonados para formar tiolatos, interactúan más fácilmente con Gsp oxidado que con GSSG a pH fisiológico (Chiang, 2010).

Una posibilidad es que Gsp, pueda llegar a cumplir funciones similares en kinetoplastos, aunque a la fecha aún no ha sido estudiado. Sin embargo, la poca abundancia de este tiol en los parásitos juega en contra de dicha hipótesis

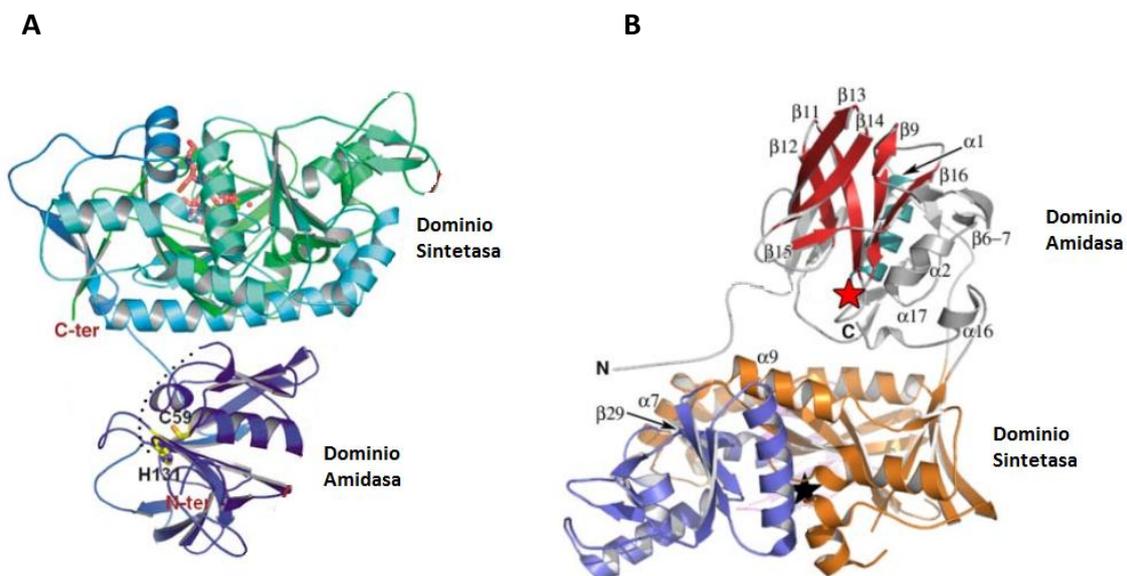


Figura 9. Estructura tridimensional de glutationilpermidina de *E. coli* y tripanotión sintetasa de *L. major*. Diagrama de cintas de las estructuras tridimensionales de la glutationilpermidina sintetasa/amidasa (GspS) de *E. coli* (A) y la tripanotión sintetasa (TryS) de *L. major* (B) a partir de los patrones de difracción de rayos X (resolución 2,2 y 2,3 Å, respectivamente). Se marcan los dominios sintetasa (C-terminal, residuos 206-619 y 216-633 para *E. coli* GspS y *L. major* TryS, respectivamente), amidasa (N-terminal, residuos 1-195 y 1-215 para *E. coli* GspS y *L. major* TryS, respectivamente) y el linker entre ambos para cada enzima. Las líneas punteadas representan la porción de la proteína sin resolver. Tomadas y adaptadas de Pai, 2006 o Fyfe, 2008, respectivamente. Por mayor información respecto a las estructuras, referirse a Pai, 2006 o Fyfe, 2008

La cristalización de la GspS de *E. coli* mostró que la misma pertenece a la superfamilia de las proteínas ATP-Grasp (Pai, 2006)(Fig. 9). La estructura y función del dominio sintetasa se encuentra relacionado al de la glutatión sintetasa humana, aunque con diferencias marcadas a nivel atómico dada la gran diferencia entre los sustratos que estas enzimas emplean. La reacción de conjugación entre GSH y Sp ocurre en dos pasos, algo análogo a lo que ocurre en otras ligasas ATP dependientes. El C-terminal de la molécula de GSH es inicialmente fosforilado por el ATP, seguido de un ataque nucleofílico de la N^1 -espermidina (Chen, 1997). El aducto tetraédrico resultante colapsa para formar una unión amida y rompe la unión C-O del fosfato, lo que lleva a la formación de Gsp y a la liberación de fosfato inorgánico y ADP luego de la catálisis (Pai, 2006). En la estructura de la GspS de *E. coli* se observaron dos sitios posibles de unión para el glutatión, S2 y S3. Se propone que S2 es el sitio inicial de unión, y

subsecuentemente el cambio de conformación disparado por la hidrólisis de ATP es posiblemente el que esté involucrado en la traslocación del GSH activado a S3 (Pai, 2006). La traslocación debe ocurrir para poder acomodar el otro sustrato en S2, la espermidina, para el próximo paso.

El manejo de dos sustratos diferentes como son la espermidina y la Gsp por una única enzima como la TryS puede explicarse por un mecanismo único que fue comprendido en mayor detalle con los análisis estructurales a partir de las difracciones de rayos X y los modelados moleculares (Fyfe, 2008)(Fig. 9). Los sitios de unión para ATP, GSH y espermidina se acomodan de tal forma que GSH puede ser fosforilado en la glicina del carboxilo, para luego permitir la glutationilación de la N^1 -espermidina, como se había demostrado previamente por estudios cinéticos (Comini, 2005). Esto demuestra que la TryS también es una proteína ATP-Grasp típica, que difícilmente libere el ATP antes de su clivado (Comini, 2005). Al igual que el bolsillo para el ATP, el de GSH también es un sitio bien estructurado. Sin embargo, el sitio de unión de la espermidina parece más plano y menos estructurado, de forma de permitir la rotación del Gsp inicialmente formado para permitir que el N^8 de la molécula sea glutationilado por una nueva molécula de glutationil fosfato (Fyfe, 2008). Un modelo por homología de la TryS de *T. cruzi* basado en la estructura de GspS muestra ciertas diferencias entre ambas enzimas. La TryS presenta un sitio de unión extra que está localizado en la superficie de la proteína. Este sitio se considera como la extensión del S2 y posiblemente es el que interacciona con el GSH del Gsp (Pai, 2006).

La GspS de *E. coli* así como sus homólogas en los parásitos kinetoplastos (incluyendo también las TryS), muestran inhibición por sustrato con GSH, un fenómeno que puede ser explicado por el mecanismo de traslocación. Concentraciones altas de GSH posiblemente lleven a la ocupación simultánea de los dos sitios de unión de glutatión (llamados S2 y S3) (Pai, 2006).

Al menos en *L. major* y *T. brucei*, la TryS fue detectada en el citoplasma (Oza, 2005 y Fiestas, Tesina de Grado). Sin embargo, la presencia de enzimas dependientes de tripanotión en otros compartimentos subcelulares del parásito plantea dudas sobre la

localización de la vía biosintética y/o los mecanismos de transporte del ditiol a los distintos organelos en cuestión (Irigoín, 2008).

Dado que está implicado en al menos tres funciones biológicas importantes, como ser la detoxificación de hidroperóxidos, la regulación de la síntesis y replicación del ADN, el sistema del tripanotión, y fundamentalmente la TryS, es un candidato para la acción de fármacos tripanocidas. Esa apreciación se apoya además en el hecho que estos sistemas se encuentran ausentes en los huéspedes mamíferos y las evidencias clínicas de ciertos fármacos como la eflornitina, el melarsoprol y las sales de antimonio, que muestran actividad tripanostática y /o tripanocida al interferir con esta ruta.

Para *T. brucei*, la esencialidad de la TryS quedó demostrada *in vitro* con experimentos de interferencia de ARN doble cadena (Ariyanayagam 2005, Comini, 2004), validación química (Torrie, 2009) e *in vivo* por experimentos de KO (Wyllie, 2009). Al cabo de 24 horas, los niveles de T(SH)₂ cayeron a un 10% respecto a los valores normales, y en los siguientes ese valor descendió a un 5% residual. También disminuyeron los niveles de Gsp, mientras que por el contrario GSH se acumuló. Al cabo del segundo día los parásitos detuvieron su crecimiento y en el tercer día murieron. Se observó que una disminución del 90% de T(SH)₂ es suficiente para comprometer dramáticamente el sistema de defensa contra oxidantes, y que una reducción sostenida del mismo durante 2 o 3 días es suficiente para matar al parásito, principalmente por agotamiento de deoxinucleótidos (Comini, 2004). Estos experimentos sirvieron para demostrar de manera adicional que GSH no es capaz de sustituir las funciones de T(SH)₂, al menos en *T. brucei* (Comini, 2004, Ariyanayagam et al., 2005).

Más recientemente también fue validada la TryS como una enzima esencial para *L. infantum*, por una aproximación genética de KO y química. Por el contrario, la GspS de *L. infantum* no resultó esencial para dicho parásito (Castro, 2013).

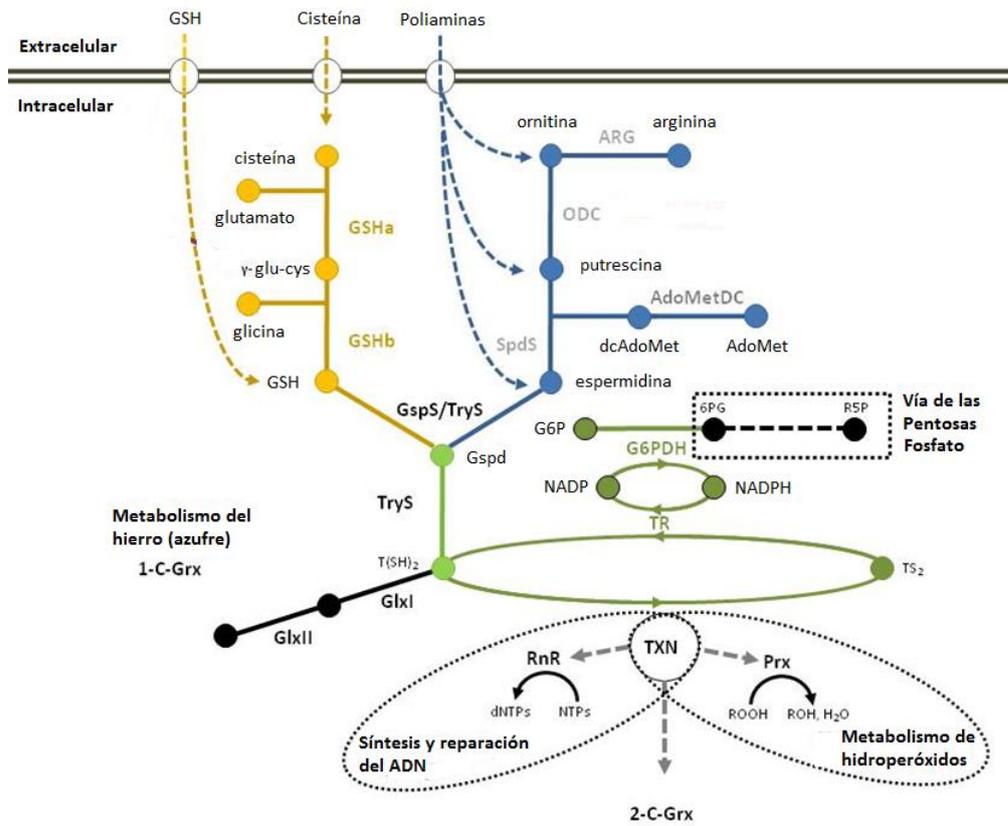


Figura 9B. Metabolismo del tripanotión. Esquema que resume la síntesis, reducción y utilización del tripanotión. Tomada y adaptada de Comini, 2013.

2. Objetivos

2.1 – Objetivo general

La falta de conocimiento sobre las entidades enzimáticas responsables de la síntesis de tripanotión así como su importancia fisiológica en *T. cruzi* constituye un obstáculo mayor tanto para comprender cuestiones básicas de la bioquímica del parásito como para otras más aplicadas y relacionadas al diseño de fármacos.

En este contexto, el objetivo general de este trabajo consistió en elucidar la biosíntesis de tripanotión a partir del análisis bioinformático, bioquímico y biológico de las enzimas tripanotión sintetasa (TryS) y mono-glutationilespermidina sintetasa (GspS) de *Trypanosoma cruzi* con el fin último de establecer su potencial como blancos terapéuticos contra la enfermedad de Chagas.

2.2 – Objetivos específicos

1. Análisis *in silico* y estudios evolutivos de secuencias codificantes para TryS y GspS.
2. Determinación de la concentración y localización subcelular de la TryS y GspS en diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.
3. Generación de una línea celular "knock out" clásico y/o condicional de la TryS en *T. cruzi*. Caracterización biológica preliminar de la(s) línea(s) celulares.
4. Determinación de la implicancia de TryS como factor de virulencia por estudios de infectividad de diferentes cepas y líneas transgénicas de *T. cruzi* con contenidos diferenciales de TryS.
5. Análisis de la importancia biológica de mono-glutationilespermidina en una línea celular de *T. brucei* transgénica.
6. Aproximación al mecanismo de acción anti-*T. brucei* de ciertos compuestos electrofílicos.
7. Estudio de los mecanismos epigenéticos de escape al silenciamiento post-transcripcional por ARN doble cadena en *T. brucei in vitro* e *in vivo*.

3. Materiales y métodos

3.1 – Materiales

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de la más alta pureza de Sigma-Aldrich. Todas las enzimas utilizadas en métodos de biología molecular fueron adquiridas en Invitrogen, Roche o New England Biolabs. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por IDT. Los kits para extracción y purificación de ADN fueron de Sigma-Aldrich o QIAGEN.

3.2 – Generación de construcciones

3.2.1 – Identificación de secuencias putativas y clonado de GspSs de *T. cruzi*

El marco abierto de lectura correspondiente al gen *gspS* fue amplificado a partir del ADN genómico aislado de las cepas CL-Brener, DM28c, Esmeraldo y Tulahuen de *T. cruzi* 2 utilizando el reactivo Tri Reagent (Sigma-Aldrich). Las cepas CL-Brener y DM28c fueron cedidas por el Dr. Esteban Serra (IBR-Argentina) y la Unidad de Biología Molecular (Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay) respectivamente, mientras que el ADN genómico de las cepas Esmeraldo y Tulahuen fue cedido amablemente por la Dra. Andrea Trochine (Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo).

Se partió de una suspensión celular de $1-5 \times 10^8$ parásitos. Los pellet celulares recuperados por centrifugación a $2000 \times g$ durante 10 min a 4°C , fueron lavados dos veces con 5 mL de amortiguador fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,76 mM pH 7,4). Las células fueron lisadas con 1 mL de Tri Reagent y para lograr la separación de fases, en primer lugar se debió agregar 0,2 mL de cloroformo y posteriormente mezclar por agitación y dejar reposar durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C , para obtener una fase orgánica (roja) donde se encuentran las proteínas, una fase acuosa (incolora) donde se encuentran los ARNs y una interfase (blanca) donde se ubica el ADN genómico. Se descartó la fase acuosa y al volumen restante se agregaron 0,3 mL de etanol 100% v/v (EtOH) para precipitar el ADN. A continuación, se realizaron lavados sucesivos con 0,1 M de citrato de trisodio en EtOH 10% v/v y EtOH 75% v/v, tal como detalla el fabricante. El precipitado de ADN se resuspendió con NaOH 8mM en un volumen final de 50-100 μL , almacenándose a –

20°C hasta su posterior uso. Previo a su uso en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) el pH del ADN fue ajustado con amortiguador 0,1 M HEPES pH 8,4 (86 µL por cada mL de ADN).

La amplificación de las secuencias de interés se realizó mediante la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos sentido y antisentido conteniendo sitios de restricción para las endonucleasas *NdeI* y *BamHI*, respectivamente (Tabla 1). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 100 µL que contenía 1-50 ng del ADN genómico, desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) a una concentración final de 0,3 mM cada uno, oligonucleótidos sentido y antisentido a una concentración final de 0,3 µM cada uno, 5 U de la polimerasa *Pfx50* (Invitrogen) y el amortiguador de reacción aportado por el fabricante.

El programa de PCR que se utilizó para la amplificación constó de un paso inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, hibridización a 50-55°C por 30 segundos, extensión de la reacción de polimerización a 68°C por 2 minutos y finalmente un último paso a 68°C por 5 minutos para asegurarse que la extensión fuese completa para todos los fragmentos.

Para verificar la amplificación, se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1% p/v en TAE 1x (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA pH 8.0). De no detectarse la co-amplificación de productos inespecíficos, los amplicones se purificaron desde la reacción de PCR mediante *kit* comercial (Invitrogen).

Para subclonar los productos de PCR en un vector T comercial, previamente fueron adenilados con 0,2 mM ATP y 2,5 U de polimerasa *Taq* (Invitrogen) durante 20 minutos a 72°C. La reacción de ligación (10 µL volumen final) fue preparada con 100-300 ng de los productos de PCR, 50 ng del vector comercial pCR2.1 (Invitrogen) y 1 U de T4 ligasa (Invitrogen) en el amortiguador correspondiente, e incubada durante 16-20 horas a temperatura ambiente.

E. coli cepa DH5α quimiocompetentes (Invitrogen) se transformaron con la reacción de ligación mediante shock térmico siguiendo el protocolo del fabricante. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB agar (5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 15 g/L de agar) suplementadas con ampicilina 100 µg/mL y X-gal 40 µg/mL, las cuales se incubaron durante 16-20 horas a 37°C.

El cribado inicial para detectar colonias positivas se realizó por la técnica de *colony cracking*. Para ello se seleccionaron entre 8-10 colonias blancas que se sub-cultivaron en 5 mL de LB líquido ampicilina 100 µg/mL durante 16-20 horas. Una alícuota de 1 mL de las células se recuperó por centrifugación a 5.000 x g y luego se eliminó el sobrenadante. Las bacterias se lisaron con 25 µL de fenol y agitación en vortex durante 30 segundos. Posteriormente se centrifugó el lisado a 18.000 x g durante 20 minutos para lograr una separación de las fracciones acuosa y fenólica. 25 µL de la fracción acuosa conteniendo los ácidos nucleicos totales se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v en TAE 1x. El ADN plasmídico se purificó de las colonias positivas (nota: las que presentaron plásmidos del tamaño molecular esperado) mediante kit comercial para minipreparación (Invitrogen). La presencia del inserto en el vector se confirmó mediante digestión con *EcoRI* o las enzimas específicas *NdeI/BamHI* (Invitrogen), cuyas secuencias de restricción flanquean el sitio de inserción del producto de interés, y análisis electroforético en gel de agarosa 1% p/v buffer TAE 1x. Las digestiones se realizaron en un volumen final de 50 µL con 10 U de cada enzima durante 1-2 horas.

Un máximo de dos vectores confirmados como positivos fueron secuenciados para verificar la secuencia del gen de *gps* de cada cepa de *T. cruzi* utilizando oligonucleótidos genéricos para el promotor y terminador del fago T7 (Servicio de secuenciación, Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo).

Para la expresión de la proteína TcGspS recombinante en *E. coli*, se clonó el gen *tcgps* de la cepa CL-Brener en el vector de expresión bacteriano pET15b (Novagen). El vector pCR2.1-TcGspS CL-Brener y el plásmido pET15b fueron digeridos como se detalla a continuación: en un volumen de reacción de 50 µL, 5 µg de cada vector fueron incubados con 10 U de las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (Invitrogen) en amortiguador React 3 1x a 37°C toda la noche. Los productos digeridos se purificaron a partir de un gel de agarosa al 1% p/v mediante *kit* comercial (QIAGEN).

Las ligaciones se realizaron en una relación molar 1:6 vector:inserto (50-100 ng del vector pET15b linealizado y 100-300 ng de inserto digerido) con 1 U de T4 ADN ligasa bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

La transformación de las bacterias con los nuevos constructos, búsqueda y confirmación de colonias positivas se realizó como se describió anteriormente.

3.2.2 – Clonado de CfGspS en vector de expresión para *T. brucei*

El marco abierto de lectura correspondiente al gen *gspS* (tamaño esperado: 2157 pb) fue amplificado a partir del ADN genómico aislado de $1-5 \times 10^8$ células de *C. fasciculata* de la misma forma detallada en sección 3.2.1.

Se utilizaron dos oligonucleótidos sentido y antisentido específicos que incorporaron sitios de restricción para las endonucleasas *Hind*III y *Bam*HI, respectivamente (Tabla 1).

Para poder sobreexpresar la CfGspS de manera constitutiva (no inducible) en *T. brucei*, se clonó la secuencia codificante de este gen en el vector pHD1034 (Molecular Biology Centre Heidelberg, ZMBH, Alemania) siguiendo el mismo procedimiento detallado en la sección 3.2.1. (Figura 10). En este vector la expresión del gen de interés está bajo el control de un promotor de prociclina (PARP) y la integración del mismo en el locus de la porción no transcribible del espaciador de ARN ribosomal del genoma de *T. brucei*, pudo ser seleccionada porque confiere resistencia al antibiótico puromicina.

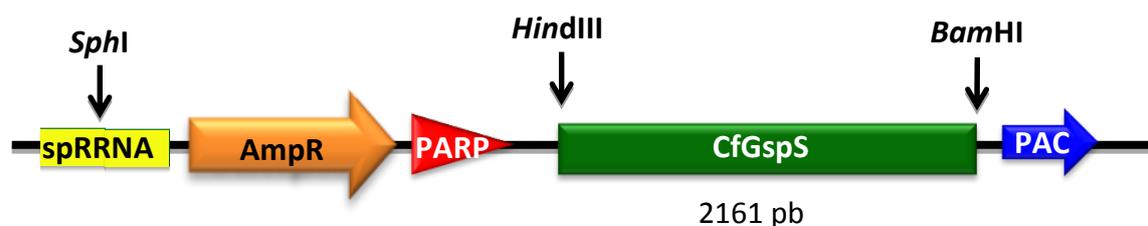


Figura 10. Esquema del clonado del gen *cfGspS* en el vector de expresión pHD1034 para *T. brucei*

La expresión del gen de interés está bajo el control de un promotor de prociclina (PARP) y la integración del mismo al genoma de los parásitos, que es mediada por recombinación homóloga en una región del ADN no traducible (*spRRNA*), pudo ser seleccionada porque confiere resistencia al antibiótico puromicina (PAC). Asimismo presenta el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) para la selección en el huésped procarionta, *E.coli*.

3.2.3 – Clonado de TbTryS en vector de expresión para *T. cruzi*

El marco abierto de lectura correspondiente al gen *tbtrys* (tamaño esperado: 1881 pb) fue amplificado a partir del vector pET15b-TbTryS (Comini y col.) de la misma forma detallada en sección 3.2.1. Se utilizaron dos oligonucleótidos sentido y antisentido específicos que incorporaron sitios de restricción para las endonucleasas *Bam*HI y *Eco*RV, respectivamente (Tabla 1).

Para poder sobreexpresar la TbTryS en *T. cruzi* de manera inducible, se clonó la secuencia de dicho gen en el vector pTcINDEX (London School of Hygiene and Tropical Medicine, Universidad de Londres) siguiendo el mismo procedimiento detallado en la sección 3.2.1. (Figura 11). En este vector la expresión del gen de interés depende de un promotor de fago T7 que está bajo el control de un operón de tetraciclina (sistema tet-on). La integración del vector pTcINDEX al genoma de los parásitos, pudo ser seleccionada porque este confiere resistencia al antibiótico higromicina, mientras que la expresión del gen ectópico es inducido con el agregado de tetraciclina al medio de cultivo.

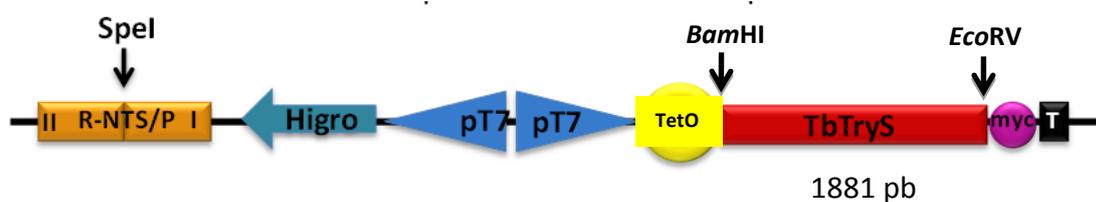


Figura 11. Esquema del clonado del gen *tbtrys* en el vector de expresión pTcINDEX para *T. cruzi*

La expresión del gen de interés está bajo el control de un promotor T7 (pT7) y su integración al genoma de los parásitos es mediada por recombinación homóloga en una región del ADN no traducible (R-NTS/P) y se selecciona con el antibiótico higromicina (Higro: gen de resistencia a higromicina). La expresión del gen de la TbTryS está bajo el control del operador de tetraciclina (TetO). Myc: epítopo myc y T: terminador de la transcripción.

3.2.4 – Generación de casetes para reemplazo alélico de TcTryS

Las regiones no traducidas o UTR (del inglés, *untranslated region*) 5' y 3' del gen *tctrys* fueron amplificadas a partir del ADN genómico de *T. cruzi* CL-Brener obtenido como se detalla en la sección 3.2.1. El diseño de los oligonucleótidos se realizó en base a la información del genoma de esta cepa existente en la base de datos TriTrypS DB (Bringaud et al. 2007) El-Sayed 2005). El gen *tctrys* es de copia única pero cada alelo presenta 5' y 3' UTRs diferentes, por lo que se debieron utilizar cuatro pares de oligonucleótidos diferentes que incorporan sitios de restricción específicos para cuatro diferentes endonucleasas de restricción (Tabla 1) que facilitaron el posterior clonado de estas secuencias.

Para generar los casetes de delección de los alelos del gen de la TcTryS en *T. cruzi*, se utilizó como esqueleto el plásmido comercial pBluescript SK (+) (Stratagene) en cuyo sitio de múltiple clonado se habían insertado previamente los genes de resistencia a puromicina (PAC) y blasticidina S (BLA) (Comini et al., 2008), por lo que se procedió al clonado del 5' y 3' UTR de cada uno de los alelos de *tctrys* y de manera tal que cada una de ellas flanqueara los genes de resistencia (Figura 12). Los procedimientos de biología molecular empleados se detallan en la sección 3.2.1.

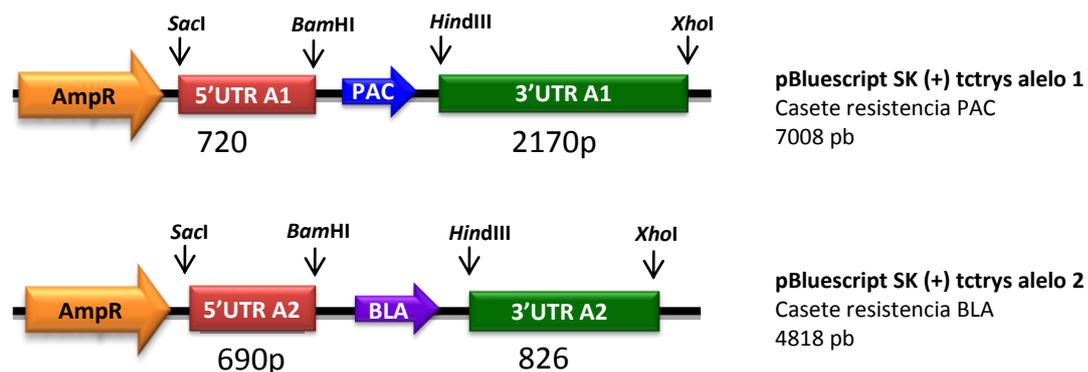


Figura 12. Esquema de la generación de los casetes para reemplazo alélico de secuencia de trys en *T. cruzi*. Esqueleto del plásmido comercial pBluescript SK (+) (Stratagene) en cuyo sitio de múltiple clonado se insertan los genes de resistencia a puromicina (PAC) y blasticidina S (BLA) (Comini et al., 2008), y los 5' y 3' UTR de cada uno de los alelos de *tctrys* adyacentes a dichos genes de resistencia. AmpR: gen de resistencia a ampicilina.

3.2.5 – Amplificación del casete de ARNi de parásitos *T. brucei* ARNi-TryS

Los estudios epigenéticos que se comentan en la sección 3.6.2 requirieron la amplificación del casete de ARNi a partir del genoma de parásitos *T. brucei* ARNi-TryS. Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos capaces de hibridizar con las secuencias del promotor de fago T7 que flanquean el fragmento de gen de la TbTryS (Comini et al., 2004), lo cual permite amplificar tanto la secuencia original como cualquier otra que se haya insertado en este sitio (ver tabla, p2T7 y p2T7term).

El ADN genómico de estos parásitos se extrajo a partir de una suspensión celular de $1-5 \times 10^7$ parásitos totales siguiendo las mismas indicaciones detalladas en la sección 3.2.1. La amplificación del casete del ARNi a partir del genoma de los parásitos se realizó mediante reacción de PCR con los oligonucleótidos específicos p2T7 y p2T7term bajo las mismas condiciones detalladas en la sección 3.2.1, reduciendo el tiempo de extensión a 1 minuto.

Para verificar la amplificación, se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1% p/v en TAE 1x y de no detectarse la co-amplificación de productos inespecíficos, los amplicones se purificaron desde la reacción de PCR mediante kit comercial (Invitrogen). Posteriormente, los productos de PCR fueron sub-clonados en un vector T comercial y las secuencias de los clones confirmados como positivos (colonias blancas, que se confirmó presentaban una secuencia de ADN clonada dentro del vector) fueron secuenciadas.

3.3 – Detección de ARN mensajeros

3.3.1 – Extracción de ARN total de parásitos *T. brucei* y *T. cruzi*

Las extracciones de ARN se realizaron a partir de $1-5 \times 10^7$ o 10^8 parásitos *T. brucei* o *T. cruzi*, respectivamente. Previo a la extracción, las células fueron lavadas dos veces con amortiguador PBS.

Para la extracción de ARN a partir de parásitos *T. brucei* ARNi-TbTryS + CfGspS, se utilizó el *kit* de extracción de ARN total RNeasy (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante para el protocolo “purificación de ARN total a partir de células animales”.

Como medidas de seguridad para evitar la degradación del ARN por contaminación con ARNsas, se utilizaron rutinariamente puntas con filtro y el descontaminante de superficies *RNase away* (Thermo). Brevemente, las lisis celulares se realizaron agregando 600 μ L de amortiguador RLT al *pellet* de células y luego 600 μ L de EtOH 70% v/v. Para la purificación del ARN total se utilizaron columnas *spin RNeasy*. Se realizaron los lavados con los diferentes amortiguadores tal como especifica el fabricante seguido de centrifugaciones a 10.000 x g durante 30 segundos. Para la elución del ARN se adicionaron 30 μ L de agua libre de ARNsas (Invitrogen) y posterior centrifugación a 10.000 x g durante 1 minuto.

Para la extracción de ARN de parásitos *T. cruzi* CL-Brener o DM28c, inicialmente se realizó una extracción con el reactivo Tri Reagent (Invitrogen) tal como se detalló en la sección 3.2.1 y se recuperó únicamente la fase acuosa conteniendo el ARN total, el cual se purificó con el *kit* de extracción de ARN total *RNeasy* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante para el protocolo “*RNA clean up*”. Brevemente, se adicionaron 350 μ L de amortiguador RLT por cada 100 μ L de solución conteniendo el ARN y posteriormente se agregaron 250 μ L de EtOH 100% v/v. Para la purificación del ARN total se utilizaron columnas *spin RNeasy*. Se realizaron los lavados con los diferentes amortiguadores tal como especifica el fabricante espaciados por centrifugaciones a 10.000 x g durante 30 segundos. Para la elución del ARN se adicionaron 30 μ L de agua libre de ARNsas (Invitrogen) y posterior centrifugación a 10.000 x g durante 1 minuto.

Como control de calidad se determinó la cantidad, pureza e integridad del ARN total aislado. Por medidas espectrofotométricas en *nanodrop* (Thermo) se estimó la cantidad de ARN recuperado (A_{260}) y la pureza del mismo (Abs_{260}/Abs_{280} , que debe ser entre 1,8-2). Para confirmar la integridad del ARN y ausencia de contaminación con ADN genómico se realizaron geles de agarosa al 0,8% p/v en TAE 1x. Una extracción de ARN de buena calidad implicó poder detectar íntegramente las bandas correspondientes al ARNr 18 y 28S, ausencia de degradación de ARN (que se evidencia

como un chorreado en el gel) o de bandas de alto peso molecular (que indican contaminación con ADN genómico).

3.3.2 – Transcripción reversa y amplificación por PCR

La retrotranscripción de los ARN mensajeros (ARNm) se realizó utilizando el *kit* de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina M-MLV (Invitrogen) con un oligonucleótido de 18 pares de bases poliT, siguiendo las instrucciones del fabricante. En un volumen de 20 μ L, se agregaron 500 ng de oligonucleótido dT, 50-300 ng de ARN total, 0,5 mM de dNTPs y se llevó a volumen con agua libre de RNAsas. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C y luego se colocó en hielo. A continuación, se agregaron 4 μ L de amortiguador 5x, 2 μ L de DTT 0,1 M y 40 U de RNasa OUT (en los casos en que se hubiera utilizado una cantidad próxima a las 50 ng de ARN total). La mezcla se incubó a 37°C durante 2 minutos y se le agregaron 200 U de la enzima transcriptasa reversa (RT M-MLV) prolongando la incubación a 37°C durante 50 minutos más. La inactivación de la enzima se realizó a 70°C durante 15 minutos.

Posteriormente, el ADN copia (ADNc) fue tratado con 2 U RNasa H durante 20 minutos a 37°C para eliminar los híbridos ADNc-ARN y así aumentar la eficiencia en las PCRs posteriores.

Para amplificar por PCR secuencias específicas de cada mensajero en particular se emplearon 2 μ L del ADNc total como molde y oligonucleótidos sentido específicos para *cfgsps* (FoCfGspS) o *tcgsps* (FoTcGspS) con un oligonucleótido antisentido poliT (Tabla 1). En todos los casos se incluyó como control la amplificación de secuencias de ADNc correspondientes a proteínas expresadas por *T. brucei* (glutarredoxina monotiólica 3 y tripanotión sintetasa, tamaños esperados aproximados de 670 y 1890 pb, respectivamente) y por *T. cruzi* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y tripanotión sintetasa, tamaños esperados aproximados de 1600 y 1890 pb). Las reacciones de PCR fueron realizadas bajo las condiciones descritas en la sección 3.2.1 y los amplicones visualizados en geles de agarosa 1% p/v teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 1. Secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de diferentes secuencias. Se subrayan los sitios de restricción introducidos. Todos los oligonucleótidos fueron preparados a una concentración *stock* de 100 pmol/ μ L.

Nombres	Secuencias de los oligonucleótidos
Fo TcGspS <i>Nde</i>I	5' - ACGCATATGGAAAACACTGACAAACA - 3'
Re TcGspS <i>Bam</i>HI	5' - ACGGGATCCTCACACTTCTCCAGATGTCG - 3'
Fo CfGspS <i>Hind</i>III	5' - ACGAAGCTTATGTCGTCGCTGCCACACAA - 3'
Re CfGspS <i>Bam</i>HI	5' - ACGGGATCCTTATGTTTCCCCCTGGTCCG - 3'
Fo TbTryS <i>Bam</i>HI	5' - GCGCGGATCCATGACGAAGTCGGCACTT - 3'
Re TbTryS <i>Eco</i>RV	5' - TTGATATCCATTTGAATACGTACGGG - 3'
Fo 5' UTR A1/A2 <i>Sac</i>I	5' - AGAGCTCTCGGCGAATGCCTCGTTG - 3'
Re 5' UTR A1/A2 <i>Bam</i>HI	5' - AGGATCCTGGTACCGCCAAAGACTG - 3'
Fo 3' UTR A1/A2 <i>Hind</i>II	5' - CTAAGCTTGGTGGCTTGAAAACGTG - 3'
Re 3' UTR A1 <i>Xho</i>I	5' - TACTCGAGCACGGGATCCGCGAAA - 3'
Re 3' UTR A2 <i>Xho</i>I	5' - TACTCGAGCAACTGGAGAGTGCTCC - 3'
Fo 5' TbGrxIII <i>Nde</i>I	5' - ACGCATATGAAACGCGTTGGGACTC - 3'
Fo 5' TcG6PDH <i>Nde</i>I	5' - TACCATATGAGTGGATCGGAGAATCG - 3'
p2T7	5' - GCTCTAGAACTAGTGGA - 3'
p2T7 term	5' - GGAAAGCTAGCTTGCATGCC - 3'

3.4 – Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*

Entre 30-50 ng de las construcciones plasmídicas pET19b-TbTryS (Comini, no publicado), pRSETB-TcTryS (cedido por el Dr. Guerrero, Universidad Nacional del Litoral, Argentina) y pET15b-CfGspS (Comini, no publicado) fueron incorporadas a células *E. coli* Tuner (DE3) (Novagen) quimiocompetentes mediante shock térmico a 42°C durante 2 minutos. Las células transformadas se incubaron a 37°C por 1 hora y a 200 rpm, y luego se sembraron sobre placas de LB agar suplementadas con ampicilina 100 μ g/mL y se incubaron toda la noche a 37°C. La construcción pET15b-TcGspS (ver sección 3.2.1), fue además incorporada a células *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Origami (DE3), Origami (DE3) pRARE.

El protocolo de expresión y purificación de TbTryS descrito por Comini y col. (Comini et al. 2003) fue optimizado de acuerdo a lo que se detalla a continuación.

Se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante a partir de un inóculo de varias colonias provenientes de placas LB-ampicilina. Luego, se realizó una dilución 1/50 en medio de auto-inducción modificado ZY-5052 (Studier, 2005; extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L, Na₂HPO₄ 25 mM, KH₂PO₄ 25 mM, NH₄Cl 50 mM, Na₂SO₄ 5 mM, MgSO₄ 2 mM, glicerol 0,5% v/v, glucosa 0,05% p/v, α-D-lactosa 0,2% p/v) con ampicilina 100 µg/mL final. Estos cultivos se incubaron a 37°C y 220 rpm durante 3-4 horas y luego a 25°C y 120 rpm, durante 16-18 hs aproximadamente.

El medio de autoinducción ZY-5052 activa la expresión de proteínas recombinantes en *E.coli* mediante un crecimiento diaúxico, produciéndose en la primera etapa densidad celulares elevadas del cultivo, que se corresponden con la utilización de glucosa como primera fuente energética. Al agotar la fuente de glucosa, las células entran en la segunda fase, donde se comienza a incorporar y utilizar la lactosa del medio. La entrada de lactosa a la célula provoca la activación de los promotores *lac* y ocurre la inducción de la transcripción y traducción del ADN clonado. La presencia de glucosa en el medio impide la inducción por lactosa, por lo que la expresión de proteína antes de tiempo es rara. Dentro de las ventajas de este medio se encuentran: i) no existe la necesidad de monitorear la DO₆₀₀, ya que la inducción ocurre de manera sincronizada al crecimiento celular, ii) las DO₆₀₀ finales obtenidas son mucho mayores que para la inducción tradicional con IPTG (ej. medio LB+IPTG ~ 1.8, medio autoinducción ~ 5), iii) normalmente se obtienen mayores rendimientos de producción de proteína recombinante, iv) útil cuando se está trabajando con proteínas que pueden resultar tóxicas para *E.coli* (Studier, 2005).

A continuación, se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 3.000 x g y 4°C durante 10 minutos. El *pellet* se resuspendió completamente en amortiguador A (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM pH 8,0) en una relación de 10 mL de amortiguador A por cada gramo de *pellet* húmedo. Para iniciar la lisis celular, se agregó lisozima (3,1 mg/mL en amortiguador A), DNAsa (2 U/mL en amortiguador A) y MgSO₄ a 10 mM. La muestra se incubó en hielo durante 1 hora luego de la cual se procedió a la sonicación en equipo Branson utilizando los siguientes parámetros: tiempo de 2 min con un

impulso *on* de 30 seg, un impulso *off* de 60 seg y una amplitud de 40%. A continuación se realizaron dos centrifugaciones a 34.000 x g durante 30 minutos a 4°C para separar los restos celulares del sobrenadante. Previo al pasaje por la columna de afinidad y para eliminar partículas insolubles, el extracto líquido se filtró utilizando filtros de 0,45 µm.

La purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) empleando una columna *HisTrap Fast Flow* (GE healthcare) de 1 mL a una temperatura de trabajo de 4-8°C y empleando una bomba peristáltica (TRIS Teledyne ISCO). La columna fue pre-equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador A y luego se aplicó el extracto soluble filtrado a la columna. A continuación se realizaron 2 lavados sucesivos, el primero con 10 volúmenes de 2% v/v de amortiguador B (imidazol 500 mM en amortiguador A pH 8,0) y el segundo con 5% v/v de amortiguador B. La elución de la proteína se realizó en modo isocrático con 15 mL de amortiguador B recolectando fracciones de 2 mL. Todos los pasos de esta cromatografía se realizaron a un flujo de 1 mL/minuto.

Para visualizar las fracciones conteniendo la proteína en cuestión y determinar el grado de pureza de la misma, se realizó un SDS-PAGE al 10 ó 12%. Asimismo, la concentración proteica de las fracciones se determinó mediante ensayo del ácido bicinconínico (BCA).

Aquellas fracciones que mostraron un nivel de pureza aceptable (homogeneidad de la muestra mayor a 60-80%), se juntaron y concentraron por diafiltración en un tubo Amicon con un filtro de corte de 30 kDa (Millipore) y centrifugando el tiempo necesario a 4.000 x g y 4°C.

Para obtener las proteínas recombinantes con un grado de pureza mayor al 90%, se realizó una cromatografía de exclusión molecular posterior a la IMAC. Para ello se emplearon columnas Superdex G-200 16/60 o 10/300 (GE healthcare: rango de separación entre 10-600 KDa) conectadas a un equipo de cromatografía líquida de baja presión AKTA (GE-Healthcare) y pre-equilibradas con 5 volúmenes de amortiguador Tris (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, DTT 1 mM, pH 7,2) a un flujo de 1 mL/minuto o 0,5 mL/minuto, respectivamente. La elución se realizó con el mismo amortiguador, colectando automáticamente fracciones de 1 mL y monitoreando en línea la absorbancia a 280 nm.

En los casos que fue necesario un tercer paso de purificación, se recurrió a un intercambio iónico sobre columnas MonoQ 5/5 o ResourceQ de 1mL (GE healthcare) conectadas a un equipo de cromatografía líquida de baja presión AKTA a un flujo de 0,5 mL/minuto. Aquellas fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular que mostraron un nivel de pureza aceptable (homogeneidad de la muestra mayor a 90%), se juntaron para realizar un cambio de amortiguador a uno sin NaCl (100 mM HEPES, 0,5 mM EDTA, 10 mM MgSO₄ pH 7,2) mediante diafiltración repetida en un tubo Amicon con filtro de corte de 30 KDa (Millipore) centrifugando a 4.000 x g y 4°C el tiempo que correspondiera.

Para el equilibrado de la columna, se utilizó el amortiguador 100 mM HEPES, 0,5 mM EDTA, 10 mM MgSO₄ pH 7,2. Se aplicó un gradiente de 0-500 mM de NaCl en un amortiguador idéntico al anterior, por un volumen de 20 mL. El patrón de elución se siguió mediante medición en línea de absorbancia a 280 nm, recogándose fracciones de 0,5 mL.

La visualización, cuantificación y determinación de la pureza de las fracciones se realizó como fue descrito anteriormente en la purificación por afinidad por metales inmovilizados.

3.5 – Inmunoensayos

3.5.1 – Protocolo de inmunización de ratones para la generación de anticuerpos anti-CfGspS y TbTryS

Para la generación de anticuerpos específicos anti-CfGspS y anti-TbTrys se inmunizaron dos y tres ratones hembra de la cepa BALB/cJ de entre 6-8 semanas de vida, respectivamente (Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, Institut Pasteur de Montevideo). El protocolo de experimentación aplicado fue previamente aprobado por la Comisión de Ética de Uso Animal (CEUA; 002-11) el cual se ajusta a las normas de ética vigentes según la ley nacional 18.611.

Las formas recombinantes de CfGspS y TbTryS a ser inyectadas en los animales presentaban una pureza mayor al 95%, a una concentración de 1 mg/mL, se encontraban en amortiguador 100 mM HEPES, 0,5 mM EDTA, 10 mM MgSO₄ (pH 7,2) y

Tris 50 mM, NaCl 500 mM, DTT 1 mM (pH 7,2), respectivamente, y fueron filtradas en esterilidad con filtros de 0.22 µm (Millipore).

El protocolo de inmunización implicó una sensibilización inicial por vía subcutánea en la base de la cola con 50 µg de CfGspS recombinante o 100 µg de TbTryS recombinante en una relación volumétrica 1:1 (volumen total de 50 µL) con adyuvante completo de Freund. En el caso de TbTryS, donde la inmunización se realizó con 100 µg de proteína, se realizaron dos sensibilizaciones de 50 µL cada una. A la semana 3 y 6 se realizaron dos refuerzos por vía subcutánea en la base de la cola con 50 µg o 100 µg de cada antígeno en una relación volumétrica 1:1 (volumen total de 50 µL) con el adyuvante incompleto de Freund (para el caso de la TbTryS fueron dos inoculaciones nuevamente).

En la semana 4, se evaluó el título de anticuerpos en suero (extracción de 50-100 µL de sangre del seno submandibular) mediante ensayo de *Western blot* contra la proteína recombinante y extractos de tripanosomas de las especies correspondientes, utilizando siempre como control los sueros de ratones pre-inmunes. En la semana 8, se realizó el sangrado final por punción cardíaca de ratones anestesiados con ketamina 100 mg/kg /xilacina 10 mg/kg por vía intraperitoneal, obteniéndose 500-800 µL de sangre. El suero se separó de la fracción celular por centrifugación a 300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se fraccionó en alícuotas que se conservaron a -20°C.

3.5.2 – Ensayo de *western blot*

Para la detección de proteínas específicas en extractos proteicos totales de parásitos (*T. cruzi*, *T. brucei* y *C. fasciculata*) así como de proteínas recombinantes, se realizaron ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos.

Para la preparación de los extractos proteicos las suspensiones celulares se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos y se lavaron dos veces con amortiguador PBS. Previo a la lisis de los parásitos se corroboró el número final de células totales.

Los *pellets* celulares se resuspendieron en una solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, tritón X-100 0,5% v/v, pH 8). Luego de incubar durante 10 minutos en hielo, el lisado se centrifugó a 18.000 x g y al sobrenadante se le adicionó amortiguador de

carga para electroforesis (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, glicerol 20% v/v, SDS 1% p/v y azul de bromofenol 0,05% p/v con β -mercaptoetanol 5% v/v) suficiente para llegar a una densidad de 1×10^6 parásitos/ μ L.

Para la preparación de proteínas recombinantes, las mismas fueron cuantificadas por ensayo de BCA y luego se les adicionó amortiguador de carga para electroforesis hasta llegar a la concentración final deseada en cada caso.

Los extractos proteicos fueron separados por SDS-PAGE 10-12% utilizando como amortiguador de corrida Tris base 0,25 M, glicina 0,52 M y SDS 35 mM, pH 8,3 y luego se transfirieron a una membrana de PVDF (GE healthcare) pre-tratada por embebido durante 30 segundos en EtOH 100% v/v y posteriormente durante 5 minutos en H₂O y amortiguador de transferencia Tris base 0,25 M, glicina 0,52 M, pH 8,3. La transferencia se realizó a 350 mA durante 4 horas en un equipo Mini Trans-Blot (Bio-Rad), en baño de hielo. Terminada ésta, se lavó la membrana con amortiguador PBS en agitación orbital a 200 rpm durante 5 minutos. El bloqueo de la membrana se realizó en PBS 4% p/v en leche entera de vaca (PBS-L) durante toda la noche a 4°C y en agitación a 80 rpm. Se realizaron 2 lavados con PBS conteniendo 0,05% v/v Tween-20 (PBS-T) de 5 minutos cada uno y luego se incubó la membrana con una dilución apropiada en PBS-L del anticuerpo primario (anti-TbTryS, anti-TR, anti-CfGspS o anti-TbTXN) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación a 80 rpm. Terminada la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-T. Se incubó la membrana durante 45 minutos a temperatura ambiente con una dilución 1/20000 en PBS-L del anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón, según corresponda, conjugado a peroxidasa (Invitrogen). Finalmente se lavó la membrana 5 veces con PBS-T. La detección de la actividad peroxidasa se desarrolló por quimioluminiscencia con el *kit Amersham ECL reagents* siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Las láminas radiográficas *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) se revelaron manualmente por inmersión en solución de revelado y de fijación (Kodak) con lavados intermedios y final con agua desionizada. Para la cuantificación de bandas por densitometría se utilizó el programa Image J® (NIH).

3.5.3 – Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Para llevar a cabo la detección de la localización subcelular de la TryS en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* de la cepa CL-Brener y DM28c, se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se centrifugaron 10 mL de cultivo de parásitos conteniendo aproximadamente 1×10^7 células/mL a 2.000 x g durante 10 minutos. Luego las células se lavaron con PBS y se repitió la centrifugación. El *pellet* fue resuspendido de manera homogénea en p-formaldehído 4% p/v en PBS (50 μ L cada 10^6 parásitos) incubando al menos por 20 minutos en hielo para permitir el proceso de fijación de las estructuras celulares. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS intercalados con centrifugaciones a 2.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los parásitos se resuspendieron en PBS de forma tal de obtener 2×10^6 células/50 μ L (una gota). Se colocaron dos gotas en portaobjetos recubiertos con poli L-lisina (Starfrost) que luego se incubaron durante toda la noche a 4°C para facilitar la adhesión de las células a la superficie.

Para el caso de las células Vero infectadas con amastigotas de *T. cruzi* y adheridas a láminas de microscopía, se realizaron tres lavados con PBS por pipeteo seguido de fijación con etanol 95% v/v durante 20 minutos. A continuación, se realizaron otros tres lavados con amortiguador PBS.

Posteriormente se permeabilizaron las membranas de los parásitos mediante tratamiento con 200 μ L de una solución de tritón X-100 0,2% v/v en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS y luego se procedió al bloqueo con una solución de gelatina 0,5% p/v en PBS (PBS-G) durante 20 minutos. Luego de lavar las placas con PBS, éstas se incubaron toda la noche a 4°C con una dilución 1/500 en PBS-G del anticuerpo primario anti-TbTryS o anti-TR o 2 horas en el caso de las células Vero infectadas. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS e inmediatamente se incubaron durante 45 minutos en oscuridad con 200 μ L de una dilución 1/1000 en PBS-G del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen). Se lavaron 5 veces las láminas con PBS y a continuación se incubaron durante 15 minutos en oscuridad con 200 μ L de una dilución 1/500 del reactivo TO-PRO 3 (Invitrogen) para teñir ácidos nucleicos y faloidina 594 (Invitrogen) que tiñe los filamentos de actina en el caso de los

preparados de células Vero infectadas. Finalmente, las láminas se lavaron con PBS, secaron y el cubre objetos se montó con glicerol 90% v/v en PBS.

3.6 – Cultivos celulares

3.6.1 – Cultivo de *T. cruzi*

En este trabajo se utilizaron parásitos de las cepas DM28c y CL-Brener de *T. cruzi*. Asimismo, se trabajó con la línea *T. cruzi* CL-Brener pLew13 (Taylor & Kelly 2006) que contiene integrado en su genoma secuencias codificantes para la T7-ARN polimerasa y la proteína represora de tetraciclina, para generar la línea celular pLew13 + pTcINDEX-TbTryS que permita la expresión inducible de la proteína TbTryS (ver secciones 3.2.3 y 3.6.1.2).

Los parásitos en estadio epimastigota fueron cultivados a 28°C en medio BHI completo (*brain heart infusion* 33 g/L, triptosa 3 g/L, KCl 0,4 g/L, NaH₂PO₄ 4 g/L con el agregado de hemina 0,02 g/L, glucosa 0,2 g/L, penicilina/estreptomicina 200.000 U/L) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino libre de tetraciclina (SFB - PAA). Para la línea pLew13 el medio debió suplementarse con 250 µg/mL del antibiótico geneticina (o G418) o 500 µg/mL durante protocolos de transfección y para el mantenimiento de la línea transfectada.

Rutinariamente los recuentos de los cultivos celulares de *T. cruzi* en cámara de Neubauer (Precicolor HBG, Germany) se realizaron de la siguiente manera: i) una alícuota de una suspensión celular se incubó durante 5 minutos en paraformaldehído 4% v/v, ii) la muestra se transfirió directamente a una cámara de Neubauer mejorada o se diluyó previamente en PBS para facilitar el recuento celular, iii) se contaron las células viables (morfológicamente normales) ubicadas en los cuatro cuadrantes laterales, compuestos de 16 campos cada uno de ellos, de cada hemicámara (n_1 y n_2), y iv) el promedio $[(n_1/4 + n_2/4)/2]$ se multiplicó por 1×10^4 para obtener el número de células por mL, y en caso de corresponder, este valor se afectó por el factor de dilución.

3.6.1.1 – Transfecciones en *T. cruzi*

Para realizar la transfección de parásitos *T. cruzi* CL-Brener pLew13 con la construcción pTcINDEX-TbTryS (ver sección 3.2.3), se cosecharon células en fase de crecimiento exponencial tardía ($4-6 \times 10^7$ parásitos/mL) a 2.000 x g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células se lavaron una vez con 10 mL de PBS, luego con 10 mL de amortiguador de electroporación (HBS - 50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7,4) y finalmente se resuspendieron en esta solución a una densidad de 10^8 parásitos/mL. A 400 μL de esta suspensión se le agregaron 50 μL de una solución acuosa conteniendo 100 μg de la construcción pTcINDEX-TbTryS que fue previamente linealizada (para favorecer su integración por recombinación homóloga) con 10 U de enzima *SpeI* (New England Biolabs) durante toda la noche, esterilizada por precipitación con etanol absoluto (C. Erba) y disuelta en agua estéril. La mezcla ADN/células se colocó en cubetas de electroporación de 0,2 mm y se electroporó con un pulso a 450 V, 1300 μF , 13 Ohms utilizando el equipo ECM 600 (BTX). De la misma manera, 400 μL de la suspensión celular fueron electroporadas con 50 μL de H_2O estéril (control negativo).

Las células electroporadas se transfirieron a una botella de cultivo de 25 cm^2 conteniendo 3 mL de medio de cultivo BHI completo con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418. El cultivo se incubó a 28°C durante 24 horas, luego de lo cual se le agregó 2 mL de medio BHI completo fresco con una concentración final de higromicina de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/4 de la concentración final). A las 72 horas de la transfección la concentración de higromicina fue incrementada a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (concentración de selección). Cada 2-3 días se monitoreó el crecimiento del cultivo transfectado y del control negativo, realizándose diluciones al medio con medio fresco con una concentración final de higromicina de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de la tercera semana la totalidad de los parásitos del control negativo murieron mientras que aquellos transfectados con el plásmido pTcINDEX-TbTryS presentaron resistencia a higromicina y lograron proliferar. Los estudios posteriores se realizaron sobre esta población de células ya que no se procedió a la selección clonal. El acondicionamiento de las células para su criopreservación se realizó por cosecha de $2-8 \times 10^7$ parásitos mediante centrifugación a 2.000 x g a temperatura ambiente y posterior resuspensión en 1 mL de medio de cultivo BHI con

concentración de antibióticos apropiado y glicerol 10% v/v. Los criotubos se almacenaron a -80°C.

3.6.1.2 – Infección de líneas celulares de mamífero por *T. cruzi*

Para la generación de los estadios infectivos para estudios por *Western blot* o inmunofluorescencia indirecta (ver sección 3.5), se realizaron infecciones de células epiteliales de riñón de mono verde (Vero). Estas fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*, Gibco) en presencia de 10% v/v de SFB libre de tetraciclina (PAA) en estufa a 37°C gaseada con 5% CO₂. Veinticuatro horas antes de las infecciones, una placa de cultivo de 6 pocillos (Corning) se sembró con 1 mL por pocillo de una suspensión de 1x10⁵ células/mL. Al próximo día, cuando la monocapa de células alcanzó un 50 % de confluencia (aproximadamente 5x10⁵ células/mL) se procedió a la infección con parásitos. La forma tripomastigota, infectiva, de *T. cruzi* DM28c y CL-Brener se obtuvo por diferenciación espontánea de cultivos “envejecidos” o depletados en nutrientes. Las formas epi y tripomastigota fueron identificadas por criterio morfológico. Cultivos en fase estacionaria tardía y con una relación aproximada de tripomastigota:epimastigota > 15%, se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio DMEM con 10% SFB a una densidad de 1x10⁶ células/mL. 1 a 2 mL de la suspensión de parásitos se dejó en contacto con las células Vero crecidas en placas de cultivo de 6 pocillos durante 24 horas en estufa a 37°C, manteniendo una relación 1:100 de exceso de parásitos totales (tripo y epimastigotas) sobre células de mamífero. Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante del medio, se lavó la monocapa con PBS y se agregó a las células medio DMEM con 2% v/v SFB. Los cultivos se observaron diariamente y los tripomastigotas liberados de las células Vero fueron cosechados por centrifugación a 2.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente del sobrenadante del medio de cultivo. Los parásitos en estadio amastigota se obtuvieron tras cosechar las células Vero infectadas. La monocapa adherente de células Vero se disoció de las botellas de cultivo por incubación con tripsina-EDTA (Invitrogen) a 37°C durante aproximadamente 5 minutos seguido de inactivación por agregado de medio DMEM. Las células infectadas se cosecharon por

centrifugación a 500 x g durante 10 minutos. Para remover el exceso de medio, se realizaron dos lavados con PBS y posterior centrifugación bajo las mismas condiciones. En todos los casos la densidad celular fue determinada por recuento en cámara de Neubauer.

Los estudios de infectividad se realizaron sobre células Vero y macrófagos murinos (línea celular J774). La primera línea se infectó con cultivos de *T. cruzi* CL-Brener o DM28c. Mientras que para la segunda línea, se trabajó con cultivos de *T. cruzi* CL-Brener pLew13 + pTcINDEX-TbTryS no inducido o inducido por 48 hs con oxitetraciclina (10 µg/mL cada 24hs) y la línea pLew13 como control.

El protocolo de infección en macrófagos murinos incluyó las siguientes modificaciones respecto al protocolo de infección recién descrito para células Vero: i) las formas epi y tripomastigota fueron identificadas por criterio morfológico y/o posicionamiento relativo del núcleo/kinetoplasto y cuantificadas por microscopía de campo claro y fluorescencia, ii) la suspensión de parásitos se dejó en contacto durante 4 horas con las células de mamíferos macrófagos en estufa a 37°C para luego colocarles medio DMEM conteniendo 2% SFB v/v y, iii) para cada ensayo de infectividad, las células fueron incubadas aproximadamente con un mismo porcentaje de tripomastigotas de las diferentes líneas dentro de un mismo experimento (siempre en una relación de exceso de parásitos totales respecto a las células mamíferas, por ej. en una relación 100:1).

Para la activación de los macrófagos, las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/mL en placas de cultivo de 6 pocillos donde se colocó un cubreobjeto estéril por pocillo y fueron mantenidas durante 24 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂ en presencia de DMEM con SFB 10% v/v, hasta alcanzar aproximadamente un 30 % de confluencia (aproximadamente 3×10^5 células totales). Posteriormente las células fueron incubadas con 200 U/mL de interferón gamma (IFN-γ) y lipopolisacárido (LPS) 3 µg/mL durante 5 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂ y posterior lavado con DMEM previo a la incubación con los parásitos. En todos los casos se incluyeron pocillos con macrófagos sin activar (control negativo) donde no fue agregado IFN-γ o LPS.

Las monocapas celulares de macrófagos activados o no, fueron expuestas durante 4 horas con las correspondientes cepas de *T. cruzi* para luego colocarles medio DMEM

conteniendo 2% SFB v/v e incubando en estufa a 37°C, 5% CO₂. Luego de 72, 96 y 168 horas post-infección, los cubreobjetos fueron lavados 2 veces con 1 mL de PBS, fijados con 1 mL de EtOH 95% v/v durante 10 minutos y finalmente lavados 2 veces con 1 mL de PBS. Los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos con medio de montaje *Fluoroshield* con DAPI (Sigma-Aldrich). Los preparados fueron analizados por microscopía de epifluorescencia (ver sección 3.8.1).

3.6.2 – Cultivos de *T. brucei*

En este trabajo se empleó la línea celular 514-1313/p2T7TA-177-28 de la forma sanguínea de *T. brucei* cepa 427, la cual contiene integrado en su genoma la secuencia codificante para la T7-ARN polimerasa (plásmido 514), dos copias para el gen de la proteína represora de tetraciclina (plásmido 1313) y el casete de ARN de interferencia para la TryS de *T. brucei* (Comini et al., 2004). A esta línea celular se la denominó ARNi-TbTryS.

Estas células fueron empleadas para generar una segunda línea celular denominada ARNi-TbTryS + CfGspS mediante su transfección con un casete integrativo para la expresión génica constitutiva de la proteína CfGspS (ver secciones 3.2.2 y 3.6.2.2).

Los cultivos se realizaron en medio HMI-9 completo cuya composición es: medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM - Invitrogen), bactocuproína 28,2 µg/mL, timidina 39 µg/mL, hipoxantina 0,136 mg/mL, L-cisteína 0,182 mg/mL, β-mercaptoetanol 0,143 M, suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino libre de tetraciclina (PAA) y penicilina/estreptomina 0,01 µg/mL concentración final. Para la línea *T. brucei* ARNi-TbTryS el medio se debió suplementar con los antibióticos fleomicina 0,2 µg/mL, geneticina 0,5 µg/mL e higromicina 5 µg/mL, mientras que para la línea ARNi-TbTryS + CfGspS se agregó además puromicina 0,2 µg/mL.

Los cultivos se incubaron en forma aeróbica a 37°C en estufa gaseada con 5% de CO₂.

Rutinariamente los recuentos de los cultivos celulares de *T. brucei* por cámara de Neubauer (Precicolor HBG, Germany) se realizaron de la misma forma detallada en la sección 3.6.1 con las siguientes modificaciones: i) una alícuota de la suspensión celular

se transfirió directamente a una cámara de Neubauer mejorada o se diluyó previamente en PBS 1% glucosa para facilitar el recuento celular ii) las células viables se definen como móviles y morfológicamente normales.

3.6.2.1 – Transfección de la forma infectiva de *T. brucei*

Para realizar la transfección de parásitos *T. brucei* ARNi-TbTryS con la construcción pHD1034-CfGspS (ver sección 3.2.2), se cosecharon 30 millones de células en fase de crecimiento exponencial media ($0,8-1 \times 10^6$ parásitos/mL) a 2.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y luego se resuspendieron con 100 μ L de solución Amaxa Basic Parasite (Lonza). Se agregaron 10 μ g de la construcción pHD1034-CfGspS en un volumen de 5 μ L, la cual fue previamente linealizada (para favorecer su integración por recombinación homóloga) con 10 U de enzima *SphI* (New England Biolabs) durante toda la noche y esterilizada por precipitación con etanol absoluto (C. Erba). La mezcla ADN/células se colocó en cubetas de electroporación (Lonza) y se aplicó el programa de electroporación X-001 del equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). A continuación, los parásitos transfectados se transfirieron a 24 mL de medio de cultivo HMI-9 completo conteniendo fleomicina 0,2 μ g/mL, G418 0,5 μ g/mL e higromicina 5 μ g/mL y luego se realizaron dos diluciones seriadas 1:10 en un volumen final de 24 mL con el mismo medio de cultivo fresco. Para realizar la selección clonal de los parásitos transfectados, las tres preparaciones se distribuyeron en tres placas de 24 pocillos (1 mL por pocillo) y luego se incubaron bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección 3.6.2. Luego de 16-20 horas, los cultivos fueron llevados a un volumen final de 2 mL mediante el agregado de medio de cultivo fresco suplementado con 2x de puromicina de manera tal de alcanzar una concentración final de 0,2 μ g/mL. A partir del cuarto o quinto día se comenzaron a detectar parásitos resistentes a puromicina. Se aislaron y amplificaron 36 clones, los cuales fueron sometidos a diferentes estudios. El acondicionamiento de las células para su criopreservación se realizó por cosecha de $1-5 \times 10^7$ parásitos por centrifugación a 2.000 x g a temperatura ambiente y posterior resuspensión en 1mL de medio de cultivo HMI-9 fresco y completo con un concentración de antibióticos apropiados y glicerol 10% v/v. Los criotubos se almacenaron a -80°C.

3.6.2.2 – Ensayos de inducción de silenciamiento de la expresión de TbTryS

Los ensayos de silenciamiento de TbTryS fueron llevados a cabo tanto en modo de crecimiento continuo como en modo de resembrado cada 24 horas en botellas de 25 cm².

Para el primer caso, las líneas ARNi-TbTryS y ARNi-TbTryS + CfGspS fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 parásitos/mL en medio de cultivo fresco y cultivadas durante un total de 5 días. Cada 24 horas se realizó recuento de densidad celular y se agregó oxitetraciclina a una concentración final de 10 µg/mL.

Para el segundo caso, las líneas celulares fueron sembradas a una densidad de 1×10^5 parásitos/mL y cultivadas durante un total de 13 días en presencia de oxitetraciclina. Cada 24 horas se determinó la densidad celular de los cultivos y en caso de existir crecimiento, se procedió a resembrar los mismos a una densidad de 1×10^5 parásitos/mL en medio de cultivo fresco agregado de 10 µg/mL oxitetraciclina.

Ambos experimentos incluyeron como control a las mismas líneas celulares no inducidas con oxitetraciclina.

Las densidades celulares fueron determinadas por recuento en cámara de Neubauer.

3.7 – Microscopía

3.7.1 – Microscopía de epifluorescencia

La visualización de los preparados de cultivos de *T. cruzi* utilizados para infecciones (para cuantificar la proporción tripomastigotas:epimastigotas) y de infecciones de macrófagos descritos en la sección 3.6.1 se llevó a cabo en un microscopio invertido Olympus IX81 con lente objetivo de inmersión en aceite UPlanFI 60x 1.25 Oil (Plataforma de Microscopía, Institut Pasteur de Montevideo). Se utilizó contraste de fase para obtener información sobre la morfología general de los parásitos y/o células de mamíferos y el filtro de fluorescencia para excitación 360-370 nm / emisión 420-460 nm para la detección de la señal del DAPI correspondiente al marcado de núcleo y kinetoplasto.

3.7.2 - Microscopía confocal

La visualización de los preparados de inmunofluorescencia descritos en la sección 3.5.3 se llevó a cabo en un microscopio láser confocal espectral invertido Leica DMI6000, TCS SP5 con lente objetivo de inmersión en aceite 63X (HCXPL APO NA 1.42) equipado con el software LASAF v2.0 (Plataforma de Microscopía, Institut Pasteur de Montevideo). Se emplearon longitudes de excitación de 579, 495 y 671 nm para la detección de la señal del Alexa 594, Alexa 488 y TO-PRO 3, respectivamente.

Se tomaron las imágenes a partir de un único plano z, utilizando un zoom 1X. Asimismo, se capturaron imágenes de campo claro para obtener información sobre la morfología general de los parásitos y/o células de mamífero.

3.7.3 – Microscopía de transmisión electrónica

La visualización de la localización subcelular de la TcTryS en la forma intracelular amastigota de *T. cruzi* CL-Brener y DM28c (células Vero infectadas), se realizó por técnica de marcado con partículas de oro coloidal (Inmunogold) utilizando un anticuerpo primario específico anti-TbTryS en ratón y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con partículas de oro coloidal.

Los preparados fueron fijados en glutaraldehído 2,5 % p/v y CaCl₂ 5 mM en amortiguador cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,2), post-fijados en tetraóxido de osmio 1% p/v y ferrocianuro de potasio 0,08% p/v, luego deshidratados en acetona y embebidos en resina Polybed (Polysciences, Inc.). Las secciones finas fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Tanto el marcado con Inmunogold como la adquisición de imágenes de microscopía de transmisión electrónica se realizaron en colaboración con la Dra. Adriana Lanfredi Rangel, responsable del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz-Bahia (Salvador, Brasil).

3.8 – Infecciones por *T. brucei* en ratones BALB/cJ

Se empleó un modelo de infección murino por *T. brucei* para llevar a cabo estudios de validación biológica con líneas transgénicas de parásitos. La cepa de ratón empleada fue BALB/cJ y las infecciones fueron realizadas en condiciones “libres de patógenos específicos” disponibles en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Institut Pasteur de Montevideo. El protocolo de experimentación aplicado fue previamente aprobado por la Comisión de Ética de Uso Animal (CEUA; Protocolo 004-11) el cual se ajusta a las normas de ética vigentes según la ley nacional 18.611.

Ocho hembras BALB/cJ de 6-8 semanas (peso aproximado entre 15-25 gramos) fueron inoculadas por vía intraperitoneal con 300 μ L de PBS-glucosa 1% conteniendo 10^4 - 10^5 parásitos de la línea ARNi-TryS no inducida. Dado que el silenciamiento del gen de la TbTryS se basa en un sistema inducible por tetraciclina, al grupo de animales problema (n= 2) se les suministró 1 mg/mL oxitetraciclina en el agua de bebida 72 horas previas y durante la infección con recambio cada 48 horas, mientras que el grupo control (n=6) no recibió este tratamiento.

Cada 72-96 horas se controló el peso de los animales y se extrajeron pequeñas muestras de sangre para control de parasitemia y subcultivo de parásitos para posteriores estudios genéticos. El recuento de parásitos en sangre se realizó a partir de \sim 50 μ L de sangre obtenida por punción del seno submandibular directamente en tubos con EDTA tripotasio (3K-EDTA, preparado por dilución de 70 μ L de K3-EDTA comercial en PBS con 2 mM EDTA (PBS-E) hasta un volumen final de 1 mL) en una relación 1:7 de anticoagulante:sangre. Previo al recuento en cámara de Neubauer, la sangre anticoagulada se homogeniza por agitación suave y se diluye 20 veces en amortiguador de lisis de glóbulos rojos estéril (preparado en agua como stock 10X, detallado como 0,8% (p/v) NH_4Cl , 0,084% (p/v) NaHCO_3 y 0,038% (p/v) $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, y filtrado a 0.22 μm).

Por razones éticas, aquellos animales con una parasitemia próxima a los 10^8 parásitos/mL o que presentaran un estado de salud deteriorado fueron sacrificados con CO_2 .

3.8.1 – Evaluación de parásitos recuperados de sangre

Para poder analizar qué tipo de variaciones genéticas se producen en los parásitos que evaden la muerte celular por silenciamiento de la TryS, se realizaron cultivos de parásitos extraídos de los ratones infectados con *T. brucei* línea ARNi-TbTryS.

Los ratones se infectaron según se describió en la sección 3.8 con las líneas ARNi-TbTryS y 514-1313/p2T7TA-177-28 como control de infección, evaluando la parasitemia cada 3-4 días. Cuando los ratones se encontraban en etapas finales de la enfermedad (próximo a 10^8 parásitos/mL), se realizaron extracciones de sangre en forma estéril y se lisaron los glóbulos rojos. Los parásitos recuperados de la sangre de ratones infectados fueron re-cultivados *in vitro* bajo las mismas condiciones detalladas en la sección 3.6.2.

Se incubaron 2×10^4 parásitos/pocillo (400 μ L/pocillo) en placas de 24 pocillos con todas las combinaciones posibles de los tres antibióticos necesarios para mantener el sistema ARNi funcional: fleomicina 0,2 μ g/mL, higromicina 5 μ g/mL o G418 2,5 μ g/mL, individualmente o en combinaciones de 2 antibiótico o con los 3 antibióticos juntos. También se incluyó un cultivo sin antibióticos.

En todos los casos, se mantuvo la inducción con oxitetraciclina 10 μ g/mL para mantener el silenciamiento del gen de la TbTryS en los parásitos.

Se observó el crecimiento de los parásitos cada 24 horas y se pasaron a nuevos pocillos cuando alcanzaron una densidad de $2-4 \times 10^6$ parásitos/mL, comenzando el nuevo cultivo a una densidad celular de 1×10^5 parásitos/mL.

Los parásitos sobrevivientes fueron pasados a los 7 u 8 días de cultivo en placa a botella para lograr obtener una cantidad aproximada de $2-4 \times 10^7$ parásitos totales, los cuales fueron criopreservados a -80°C como se detalla en la sección 3.6.2.2.

La amplificación del casete de ARNi a partir de parásitos *T. brucei* ARNi-TryS se realizó según lo detallado en la sección 3.2.5. El ADN genómico de parásitos de la línea ARNi-TbTryS que revirtieron el silenciamiento de la TryS en cultivos *in vitro* o bien recuperados de la sangre de ratones infectados se aisló siguiendo protocolos ya descritos (sección 3.2.1). Este ADN sirvió de templado para amplificar las secuencias

presentes en el casete de ARNi (sección 3.2.5), las cuales fueron luego secuenciadas en sus dos hebras.

3.9 - Actividad biológica de compuestos contra la forma infectiva de *T. b. brucei*

3.9.1 - Ensayo de proliferación de la forma infectiva de *T. b. brucei*

Se evaluó la actividad biológica de compuestos químicos en la forma infectiva *de T. brucei brucei* línea celular 514-1313 (WT) y ARNi-TryS. Los parásitos fueron cultivados en las mismas condiciones detalladas en la sección 3.6.2

Parásitos en fase de crecimiento exponencial ($\sim 2-3 \times 10^6$ células/mL) fueron contados en cámara de Neubauer (Precicolor HBG, Germany) y cosechados por centrifugación a $2.000 \times g$ durante de 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en medio de cultivo fresco a una densidad de 5×10^5 células/mL.

Las soluciones madre de los compuestos se prepararon a concentraciones finales de 3-24 mM en 100% v/v DMSO de acuerdo a la solubilidad de cada uno. A continuación se diluyeron en DMSO puro de forma de obtener una concentración 100X a la seleccionada para ensayar. Se incluyeron controles del vehículo (DMSO) a concentración final hasta 1% (v/v) y nifurtimox (NFX) a su CE_{50} de 15 μ M (control del 50% de viabilidad). Cada condición se ensayó por duplicado o triplicado.

Se colocaron 10 ó 2 μ L de las soluciones de los compuestos o DMSO (control de proliferación) en placas de cultivo de 24 o 96 pocillos (Corning Incorporated, Costar® 3599), respectivamente. Inmediatamente después se colocaron 1000 o 200 μ L de la suspensión celular en cada pocillo, respectivamente, y la placa se incubó a 37°C con 5% CO_2 . Luego de 24 horas de tratamiento, se procedió al recuento celular por cámara de Neubauer o citometría utilizando el equipo CyAn™ADP (Dako Cytomation) para las placas de 24 o 96 pocillos, respectivamente. La línea ARNi-TryS fue inducida con 10 μ g/mL tetraciclina 48 horas previo al ensayo.

Para el caso de los ensayos por citometría, luego de 24 horas, se transfirieron 100 μ L de cada pocillo a tubos de citometría de 1,1 mL (T100, Biotube™ System), se diluyeron con 200 μ L de PBS-glucosa 1% (p/v), pH 7,0, 1,3 μ g/mL ioduro de propidio y se homogeneizó con vortex. Las muestras se analizaron utilizando un láser que excita la

muestra a una longitud de onda de 488 nm. Los eventos positivos correspondientes a las células vivas se separaron en una ventana por los parámetros de dispersión frontal y dispersión lateral y la fluorescencia del ioduro de propidio se recogió a $\lambda_{em} = 613/30$ nm de forma de distinguir las células muertas. Todas las medidas se realizaron a flujo y tiempo de adquisición constante (60 s/muestra) y fueron detectadas en escala logarítmica. Se analizaron los datos utilizando el programa Summit (Dako).

El porcentaje relativo de parásitos muertos para el compuesto X a la concentración Y se expresa de la siguiente manera: % citotoxicidad = $100 - \left\{ \left[\frac{\text{número de parásitos X a la concentración Y}}{\text{número de parásitos en el control}} \right] \times 100 \right\}$.

Los valores de CE_{50} se obtuvieron de curvas dosis - respuesta ajustada a la ecuación sigmoideal de Boltzmann. Se expresa el error como la desviación estándar (DS), estimada como σ^{n-1} .

3.9.2 - Evaluación de citotoxicidad en macrófagos murinos

La línea celular J774 de macrófagos murinos se cultivó en medio DMEM complementado con 10% (v/v) SBF, penicilina 10 U/mL y estreptomina 10 μ g/mL, en estufa a 37°C y atmósfera a 5% CO₂

Las soluciones madres de los compuestos a ser ensayadas se prepararon tal como se describió para los experimentos con las líneas celulares de los parásitos.

La evaluación del efecto citotóxico de los compuestos sobre los macrófagos se evaluó por un ensayo colorimétrico de viabilidad celular con una sal tetrazólica: reactivo WST-1 (Roche). Las células en fase de crecimiento logarítmica media se despegaron con rastrillo de la botella de cultivo y se resuspendieron en medio de cultivo fresco a una densidad de 6×10^4 células/mL. Se colocaron 200 μ L de la suspensión celular en una placa de cultivo de fondo plano de 96 pocillos. Luego de 24 horas de incubación en estufa a 37°C, se reemplazó el medio con 100 μ L de medio de cultivo fresco con el agregado o no (control de crecimiento) del compuesto o DMSO a las concentraciones apropiadas. Luego de 24 horas adicionales de incubación se removió el medio y se realizaron 2 lavados con 150 μ L de medio de cultivo fresco pre-templado a 37°C. Se evaluó la viabilidad celular mediante el agregado de 100 μ L del reactivo WST-1 diluido

1:10 en medio de cultivo fresco e incubación de 3 horas a 37°C y 5% CO₂. La absorbancia del formazan producido es proporcional al número de células viables y se midió a 450 nm (longitud de onda de referencia a 630 nm) con un lector de placas EL 800 microplate reader (Biotek). Se incluyó como blanco pocillos conteniendo solo el reactivo de proliferación celular. Cada condición fue evaluada en triplicado.

Los valores para el cálculo de citotoxicidad se calcularon utilizando la siguiente ecuación y teniendo en cuenta la sustracción de los valores correspondientes a la absorbancia a 630 nm de la medida a 450 nm y los valores de blanco ($A_i^{c450} = A_i^{450} - A_i^{630nm} - A_{blanco}^{450nm}$):

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = 100 - [(\text{valor experimental})/(\text{control de crecimiento}) \times 100].$$

En el caso en que la concentración de DMSO difiera del valor del crecimiento control de células, el mismo fue corregido al restarle lo obtenido para el caso del DMSO.

Los valores de CE₅₀ fueron calculados como se describe en la sección 3.9.1.

3.10 – Bioinformática y programas computacionales

3.10.1. Bases de datos

Se recurrió a la información disponible en el *National Center for Biothechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y las bases de datos específicas sobre tripanosomas (TriTryp, <http://tritrypdb.org/tritrypdb>) u organismos patógenos (GeneDB, <http://www.genedb.org>). Para el análisis cromosómico y de sintenia se recurrió a la herramienta de *Genome View* de la página TriTryp DB.

3.10.2. Búsquedas y alineamiento múltiple de secuencias

Para la búsqueda de nuevas secuencias, se recurrió al servidor PSI-BLAST (*Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI) utilizando diversas secuencias como sonda (*query*).

Las secuencias fueron alineadas mediante la herramienta Clustal Omega del European Bioinformatic Insititute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) o T-Coffee del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>) con los algoritmos de los programas Clustal Omega o MUSCLE (del inglés, *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*), respectivamente (Edgar 2004; Sievers et al. 2011). Para la preparación de las figuras correspondientes los alineamientos se cargaron en el programa BOX Shade del ExPASy, SIB (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

La identidad y similitud de secuencias se calcularon a partir del servidor SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>) utilizando los parámetros por defecto: la matriz de sustitución BLOSUM62 y el criterio de similitud basado en las propiedades fisicoquímicas y espaciales de los aminoácidos determinados por Livingstone y Barton (Barton, 1993).

Los árboles filogenéticos fueron construidos a partir de los alineamientos múltiples de secuencia utilizando el programa BLAST *Tree View* del NCBI, con la herramienta del mínimo evolución (*fast minimum evolution*) o con el Clustal Omega, con la herramienta de *Neighbour-joining tree* y posterior visualización con el servidor iTOL (Interactive Tree of Life, <http://itol.embl.de/>)

El método de mínimo de evolución (ME) utiliza medidas de distancias que corrigen múltiples *hits* en un mismo lugar (Nei et al., 1992) y muestra un árbol con una topología que implica el menor valor de la suma de todas las ramas (S). Dado que los valores de S deben ser evaluados para todas las topologías posibles, la construcción de un árbol por ME consume mucho tiempo. Dado que el número de topologías posibles (árboles sin raíces) aumenta rápidamente con el número de taxones, se dificulta el análisis de todas las topologías. Para estos casos, se recomienda utilizar el método de *neighbor-joining*.

Por otro lado, *neighbor-joining* (NJ) es un método simplificado de la versión del mínimo de evolución (Saitou & Nei 1987). En este caso el valor S no se calcula para

todas las topologías, sino que la examinación de diferentes topologías se encuentra incorporada en el algoritmo mismo, por lo que únicamente se produce un árbol final. Este método produce un árbol sin raíces porque no requiere el supuesto de una tasa de evolución constante. Para encontrar la raíz se debe incorporar un taxón externo. En ausencia de taxones, muchas veces la raíz se da como el punto medio entre los dos taxones más alejados del árbol (*mid-point rooting*).

Si bien normalmente los árboles generados por NJ son iguales a los de ME, si el número de taxones evaluados es pequeño pueden encontrarse diferencias significativas. Cuando se está trabajando con secuencias largas de ADN o aminoácidos, es preferible generar un árbol con el método de ME (Takahashi & Nei 2000).

3.10.3. Gráficas e imágenes

Las imágenes fueron procesadas mediante el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>)

La cuantificación por densitometría de las bandas obtenidas en ensayos de *Western blot* se realizó utilizando el programa Image J®. Para ello, las láminas radiográficas fueron fotografiadas con un scanner SNAPSCAN 1236 (AGFA). A partir de estas imágenes se determinó la intensidad de cada banda por unidad de área, sustrayendo la señal de fondo, si fuera necesario. Para cuantificar los niveles de TryS y/o GspS se siguió el mismo procedimiento ya mencionado, comparando las intensidades de banda obtenidas contra los de las curvas de calibración de proteína recombinante. La curva de calibración se realizó utilizando cantidades conocidas de la proteína recombinante. A partir de la misma y mediante análisis de densitometría se obtuvieron los ng proteína/célula que fueron luego convertidos a concentración molar de enzima teniendo en cuenta el peso molecular de la proteína y el volumen celular correspondiente a un parásito. En la mayoría de los casos los controles de carga se realizaron contra las cantidades de proteína total (por tinción de la membrana con Ponceau-S) o por estandarización frente a la señal de la tripanotión reductasa (TR). En los casos en que no se incluyó una curva de calibración de proteína recombinante, se calcularon los niveles relativos al comparar las intensidades de las bandas.

El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia para la cuantificación de infecciones y/o relación epi:tripomastigotas se realizó con el programa Image J.

La relación epi:tripomastigotas se calculó analizando el número de células en estadio epimastigota respecto al de tripomastigota para una muestra particular. Para esto se utilizó la herramienta *Split Channel* que permite analizar independientemente las imágenes de contraste de fase de las del filtro de fluorescencia de 475-490 nm (DAPI). Para la clasificación y recuento de los estadios epimastigota o tripomastigota se siguió un criterio morfológico (forma, flagelo) y/o posición relativa del núcleo respecto al kinetoplasto característico de cada uno de dichos estadios. El número de células fue contado manualmente cinco veces para cada imagen, y en caso de existir diferencias se realizó un promedio.

La relación tripomastigotas: epi fue calculada como el número de tripomastigotas/número de epimastigotas y multiplicada por 100 para obtener la relación porcentual.

Para la cuantificación de las infecciones se debió calcular en primera instancia el número de células totales (Vero o J774), número de células infectadas y el número de amastigotas totales, empleando la herramienta *Split Channel* como describió más arriba.

Las células de mamíferos se identificaron en base a su morfología, dimensiones y núcleo bajo contraste de fase y epifluorescencia (señal del DAPI). Los amastigotas se diferenciaron por dos señales del DAPI cercanas en el espacio, que se corresponden al núcleo y kinetoplasto de dichos parásitos. Finalmente, las células de mamífero infectadas se definieron como aquellas que presentaron dentro de su citoplasma una (o más) señal de DAPI doble característica de amastigotas.

El número de células fue contado manualmente cinco veces para cada imagen, y en caso de existir diferencias se realizó un promedio.

El promedio de células infectadas fue calculado como el número de células infectadas/número células totales; mientras que el promedio de amastigotas por célula infectada, fue calculado como el número de amastigotas totales/número células infectadas.

Todos los esquemas fueron creados en Power Point® (Microsoft).

Todas las gráficas fueron realizadas utilizando el programa Origin (OriginLab).

Las referencias fueron editadas con el programa Mendeley (<http://www.mendeley.com/>).

4. Resultados y discusión

4.1 Análisis *in silico* de secuencias codificantes para TryS y GspS

4.1.1 Secuencias codificantes para GspS y TryS: identificación y origen de la GspS/TryS de Kinetoplástidos.

Para la obtención de todas las secuencias de GspS y TryS disponibles públicamente, se recurrió a la base de datos del National Center for Biothechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), GeneDB (<http://www.genedb.org>) y el servidor TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>) que reúne información específica sobre tripanosomatideos.

Se recurrió al PSI-BLAST (*Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI) como técnica de búsqueda utilizando como secuencia aminoacídica sonda (*query*) aquellas correspondientes a las proteínas GspS y TryS de *Bodo saltans* (BS79535 y BS36910, respectivamente). *B. saltans* es un kinetoplástido de vida libre no parasítico perteneciente al orden Bodonina, que tuvo una divergencia temprana en la línea de la evolución de los kinetoplástidos. Estas características lo hacen un buen organismo modelo para búsquedas de secuencias y construcción de árboles evolutivos.

PSI-BLAST realiza la búsqueda de secuencias proteicas similares a las de una secuencia polipeptídica sonda que pudieran estar representadas en una base de datos (Altschul, 1997; Schäffer, 2001). Este método utiliza matrices de puntuación de posición (PSSMs) para *rankear* los aciertos entre las secuencias sonda y las de las bases de datos, en contraposición al BLAST que utiliza matrices de puntuación pre-definidas (BLOSUM62, por ejemplo).

Esto hace que PSI-BLAST sea más sensible respecto a BLAST y por lo tanto capaz de encontrar secuencias relacionadas pero evolutivamente distantes, que de otra forma se estarían perdiendo. Normalmente, la primera ronda de búsqueda con PSI-BLAST utiliza una matriz de puntajes estándar (tipo BLAST-P) que luego da lugar a ciclos de búsqueda iterativa dentro de las bases de datos, utilizando un alineamiento múltiple de las secuencias con mayor puntaje encontrado en cada ciclo, generándose así una

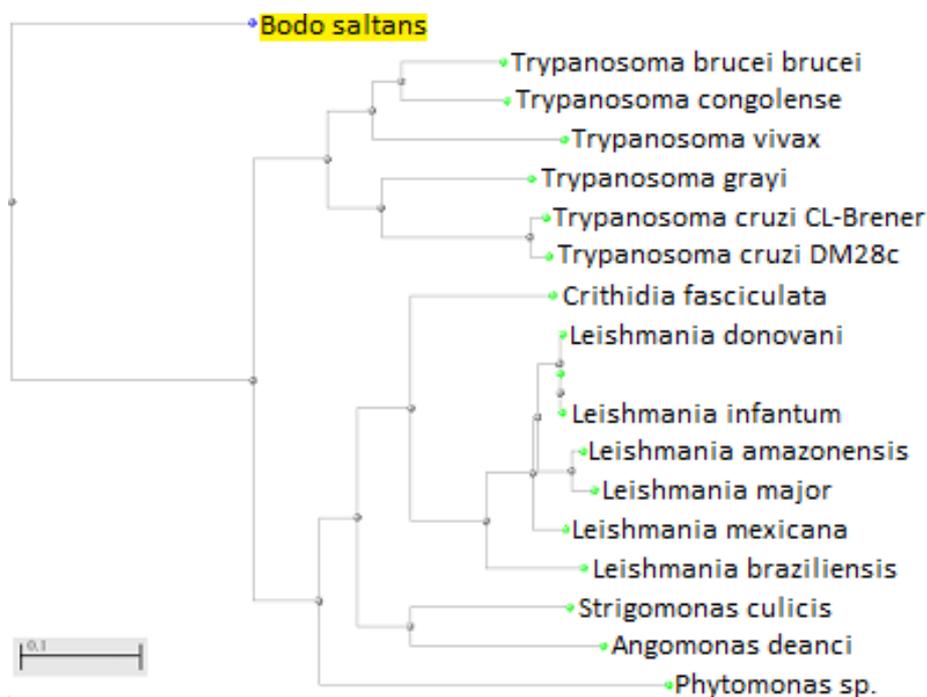


Figura 13. Árbol filogenético de kinetoplastos de acuerdo a la evolución de TryS. Se recurrió al PSI-BLAST para la búsqueda de secuencias de TryS utilizando como secuencia sonda (*query*) la TryS de *Bodo saltans* (BS36910). El árbol fue inferido de acuerdo a los alineamientos múltiples y se construyó utilizando BLAST *Tree View* del NCBI, con la herramienta del mínimo evolución (*fast minimum evolution*). En amarillo se distingue la secuencia sonda. El corte para obtener una homología estadísticamente significativa (>25%) se hizo en $e < 10^{-3}$ y una cobertura de la sonda >55% (Hall, 2013). La escala hace referencia a la distancia evolutiva entre las proteínas de los diferentes organismos.

nueva PSSM para una nueva ronda de búsqueda. El programa va a iterar hasta no encontrar nuevas secuencias.

Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando la herramienta BLAST *Tree View* del NCBI, con la herramienta del mínimo evolución (*fast minimum evolution*), mientras que los análisis filogenéticos de las GspS de Kinetoplástidos se hicieron mediante el software CLUSTAL Omega (*Neighbour-joining tree without distance corrections*).

Utilizando la secuencia de TryS de *B. saltans* (BS36910) y PSI-BLAST, se pudieron recuperar secuencias de TryS de diferentes especies, todas pertenecientes únicamente a organismos de la clase Kinetoplastea (Fig. 13). Este hallazgo re-confirma que este gen y su producto (proteína: TryS y metabolito: tripanotión) son una marca molecular evolutiva exclusiva de estos organismos. La secuencia de *B. saltans* quedó ubicada por

fuera del resto de los kinetoplástidos, lo cual es indicativo de la separación temprana que hubo entre el orden Bodonina y el de los Tripanosomatida.

Dentro del orden Tripanosomatida, se encontraron dos ramas diferentes, por un lado una que contiene las TryS del género *Trypanosoma* (*T. brucei* y *T. cruzi*) y por otro lado aquella que contiene TryS de *Crithidia* (*Crithidia fasciculata*) y *Leishmania*. Dentro de esta última rama también se ubicaron las TryS de *Phytomona*, *Angomonas deanei* y *Strigomonas culicis* (previamente clasificadas como *Crithidia deanei* y *Blastocrithidia culicis*, respectivamente).

Los organismos del género *Phytomona* son causantes de enfermedades en especies vegetales de interés económico, y circulan entre invertebrados, vertebrados y la planta huésped (Paz, 2000; Simpson, 2006).

Dentro de los tripanosomátidos, seis especies presentes en insectos llevan dentro de su citoplasma una bacteria intracelular obligada. *Angomonas deanei* y *Strigomonas culicis* representan las especies mejor caracterizadas dentro de este grupo. En esta asociación obligatoria, el endosimbionte es incapaz de sobrevivir y replicarse en forma libre, es decir independiente de su huésped, y a su vez el protozoario aposimbionte es incapaz de colonizar insectos. La falta de pared celular en el organismo endosimbionte favorece el intenso intercambio metabólico entre el huésped parásito y la bacteria. Estudios bioquímicos revelaron que los endosimbiontes contienen enzimas esenciales para las rutas metabólicas del parásito involucradas en la producción de poliaminas, biosíntesis de hemo y el ciclo de la urea. Estudios basados en secuenciación del ARNr sugirieron que los simbiosomas de estos protozoos comparten una alta identidad y derivan de un único ancestro común, una β -proteobacteria del género *Bordetella* (Du, 1994; Motta, 2013).

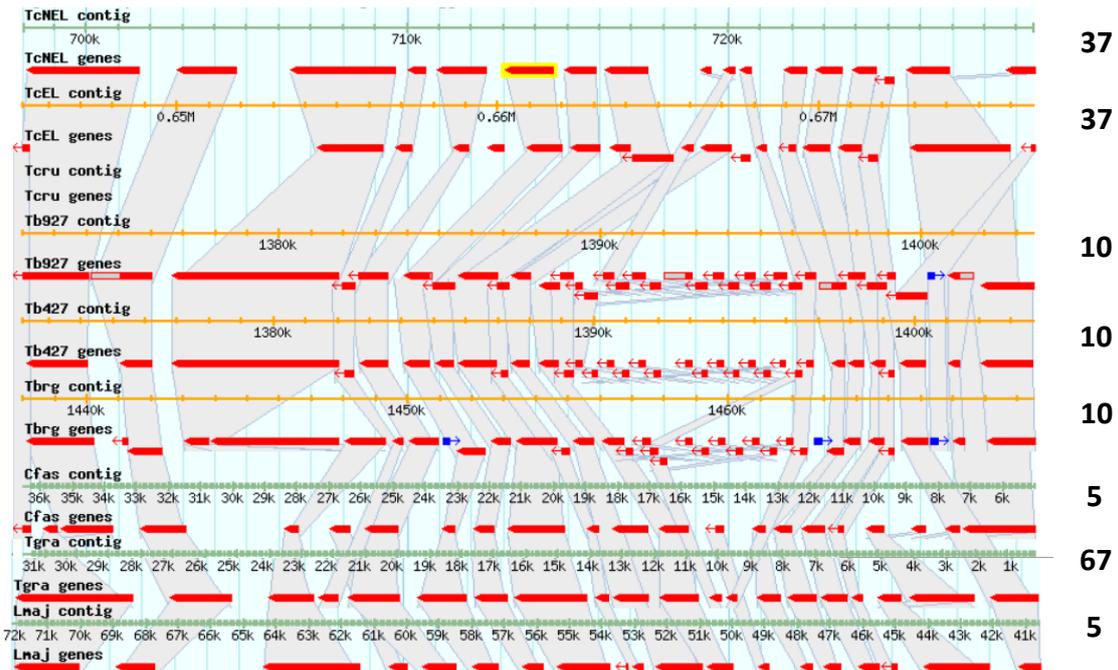


Figura 14. Secuencias y genes sintéticos por ortología. Las escalas en naranja y verde refieren al tamaño molecular de los fragmentos cromosómicos que contienen el locus de *trys* en cada especie (contig). En rojo se indican los genes anotados y en gris las secuencias sintéticas (basadas en OrthoMCL <http://www.orthomcl.org/orthomcl/>). En amarillo se resalta el gen de la *TryS* de *T. cruzi*, que fue el utilizado como sonda de búsqueda. A la derecha se indica el número de cromosoma donde se halla este locus en cada especie. Imagen generada con el visualizador *Genomic context* de la base de datos *TriTryps*.

Al analizar el contexto cromosómico donde está ubicado el gen de la *TryS* en *Tripanosomas*, se observa que es una región sintética (Fig 14). Esto estaría indicando que a lo largo de la evolución estos genes fueron mantenidos como un bloque funcional, lo cual destaca su relevancia.

Por otro lado, utilizando la secuencia de *GspS* de *B. saltans* (BsGspS - BS79535) y PSI-BLAST, se pudieron recuperar secuencias de *GspS* de diferentes organismos procariontes y eucariotes protistas (Fig. 15).

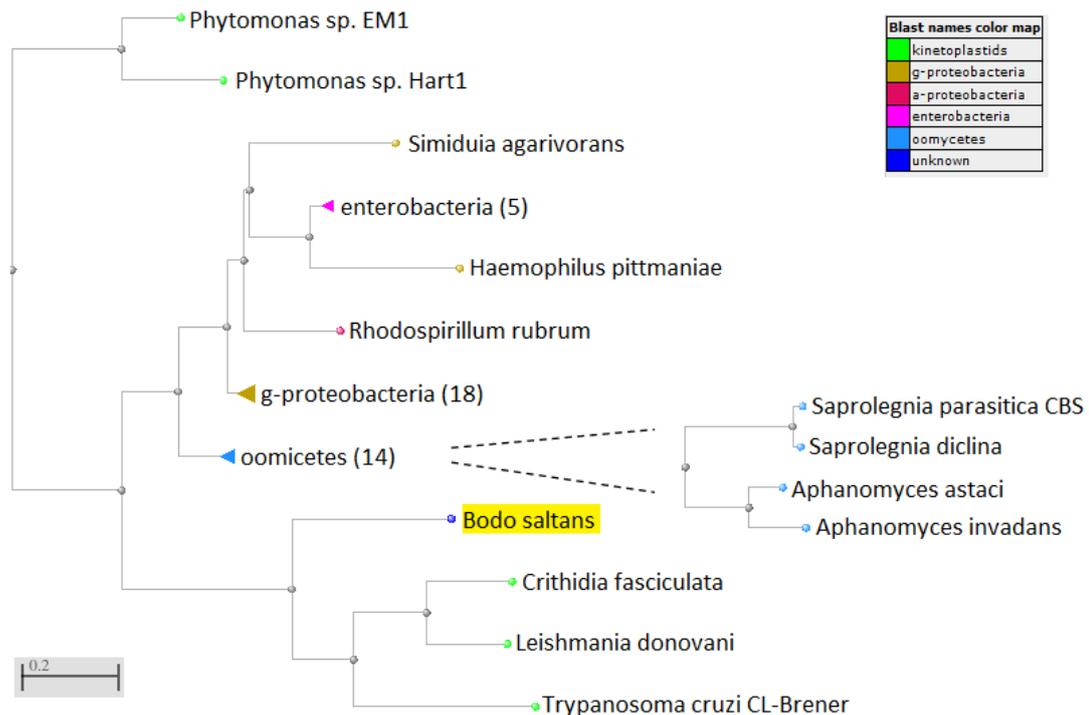


Figura 15. Árbol filogenético de acuerdo a la evolución de GspSs. Se recurrió al PSI-BLAST para la búsqueda de GspSs utilizando como sonda la secuencia de GspS de *Bodo saltans* (BS79535; azul sobre fondo amarillo) y omitiendo cualquier secuencia redundante. El árbol fue inferido de acuerdo a los alineamientos múltiples y se construyó utilizando BLAST *Tree View* del NCBI, con la herramienta del mínimo de evolución (*fast minimum evolution*). Las secuencias GspS se clasificaron según el agrupamiento taxonómico de la base de datos del NCBI de acuerdo a que estas pertenecieran a kinetoplastidos (verde), γ -proteobacteria (marrón), grupo en el cual se ubican las enterobacterias (rosado), α -proteobacterias (rojo) y oomycetes (celeste). Entre paréntesis se indica el número de especies dentro de cada taxón. El corte para homología significativa ($>25\%$) se hizo en $e < 10^{-3}$ y una cobertura de la sonda $>55\%$ (Hall, 2013). La escala hace referencia a la distancia evolutiva entre las proteínas de los diferentes organismos.

A pesar que la distribución filogenética de GspS es más amplia que la de TryS, la presencia de la primera está restringida a algunos grupos de Eubacterias (α - y γ -proteobacteria) y protistas del filo Excavata (kinetoplátidos) y Oomicota (*Aphanomyces* y *Saprolegnia*: pseudo hongos del Supergrupo Chromista que incluye a la mayoría de las algas).

Dentro del orden Tripanosomátida se encontraron secuencias de GspS en ciertas especies de los géneros *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Crithidia*, las cuales mostraron una identidad de secuencia con la BsGpsS en el rango 36-39 % (similitud 40-48%). También el genoma de *Phytomona* codifica para una GspS que, sin embargo, presenta un menor grado de identidad con BsGpsS (21 %; similitud de 29 %).

Dentro del Reino Procariota, la totalidad de los organismos conteniendo secuencias con similitud a GspS perteneció al filo Proteobacteria, siendo la identidad de secuencia con BsGspS superior para las γ -proteobacterias (identidad de 26-29 %) que para las α -proteobacterias (identidad menor a 24-27%). Las GspS de bacterias con mayor grado de similitud pertenecen a los géneros *Pseudoalteromona*, *Glaiecola*, *Psychromona* y *Marinomonas*. Todas estas especies fueron aisladas de un ambiente acuático (Bai, 2014; Bian, 2011; Auman, 2006). Dentro de las γ -proteobacterias, distintas especies de la familia de las Enterobacterias (géneros *Escherichia*, *Providencia*, *Shigella*, *Salmonella*, etc) presentaron secuencias homólogas a BsGspS caracterizadas por poseer un menor nivel de identidad de secuencia (26% de identidad).

Dentro de los Kinetoplástidos tripanosomátidos, se encontraron secuencias codificantes para GspS en *T. cruzi*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. braziliensis* y *C. fasciculata* (ver sección 4.2.2 para detalles del análisis de secuencias) (Fig. 17). De estas secuencias, las halladas en el genoma de *L. major* y *L. braziliensis* corresponden a pseudo-genes. Mientras que para otras especies como *L. amazonensis*, no se detectó ningún gen completo o fragmento con gran similitud para gspS. Si bien con esta aproximación tampoco se identificaron secuencias similares a gspS en *T. brucei*, al repetir la búsqueda de manera menos restrictiva se pudo identificar un fragmento pequeño con identidad moderada por GspS (ver más adelante, sección 4.2.2).

El alto grado de similitud entre las secuencias de GspS de Kinetoplástidos y bacterias (Bringaud, 1998), sumado a la ausencia de dichas secuencias en prácticamente el resto de los organismos, sugiere que estos organismos eucariotas adquirieron la habilidad de sintetizar Gsp de las bacterias, seguido de una duplicación y sucesivas modificaciones génicas de la secuencia de *gspS* que dieron origen a una secuencia codificante para una enzima, la TryS, capaz de sintetizar de tripanotión (Chattopadhyay, 2013; Manta, 2013). Otra posibilidad es que los Kinetoplástidos hayan evolucionado los genes de *gspS* y *trys* de manera independiente y, por lo tanto, la capacidad de sintetizar mono- y bis-glutationil espermidina, y que el ancestro respectivo se haya perdido tempranamente en este linaje. Sin embargo esto es poco probable debido al alto grado

de identidad de secuencias de GspS de kinetoplástidos con la de proteobacterias, además de la conservación del típico ensamblaje de dominios amidasa y sintetasa (ver sección 4.2) que presentan las secuencias de GspS (y también de TryS).

Tanto los euglénidos como los bodonidos presentan la capacidad de fagocitosis para alimentarse de partículas y/o pequeños organismos como bacterias. Euglena puede comportarse tanto como heterótrofo y obtener nutrientes y energía a partir de la incorporación por fagocitosis y metabolización de (macro)moléculas o microorganismos completos; o también puede ser autótrofo y producir azúcares y otras moléculas a partir de la energía metabólica generada por fotosíntesis (Opperdoes, 2007). A partir de este proceso, estos organismos pudieron verse favorecidos no solo de eventos endosimbióticos, sino también de transferencia lateral de genes a partir de los organismos que fagocitaron.

La adquisición del gen de GspS bacteriano por parte de Kinetoplástidos, también tiene su sustento en análisis filogenéticos genómicos a gran escala que demostraron que varios microorganismos eucariotas adquirieron genes metabólicos de organismos procariotas. Muchos protistas codifican genes que no se encuentran distribuidos universalmente en el resto de los eucariotas, los cuales además presentan un patrón de distribución no conservado dentro del propio grupo de protistas. Ejemplos de ellos son los genes para la biosíntesis de novo de pirimidina y las secuencias codificantes para tirosil-ARNt (Opperdoes, 2007; Vodnala, 2009).

Como ya fue explicado en detalle en la sección 1.8.2, todas las proteínas GspS y TryS, están formadas por un dominio con actividad sintetasa y otro con actividad amidasa, generadas muy probablemente por fusión de dos dominios con actividades opuestas. Según los datos obtenidos, se puede especular que este fenómeno de fusión entre un dominio de amidohidrolasa/peptidasa cisteína, histidina-dependiente (*CHAP*, del inglés *cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase*) con actividad hidrolítica de enlaces C-N (por ejemplo, este dominio se haya presente en enzimas responsables de la biogénesis y remodelación de las paredes celulares de bacterias) y un dominio con actividad ligasa C-N ATP-dependiente (como por ejemplo, la glutatión sintetasa (Snoke 1955)) ocurrió en un procariota ancestral (Bateman, 2003; Rigden, 2003). Resulta difícil reconstruir con precisión el escenario evolutivo que tuvo lugar para la conversión de

este híbrido bidominio, en particular de la región sintetasa, en una enzima capaz de conjugarse a glutatión a poliaminas (espermidina), dado que la información genómica actualmente disponible no cubre a todas las especies filogenéticas y/o a la probable extinción o rápida evolución de organismos ancestros. De todas formas está claro que el gen de *gps* fue heredado por las γ -proteobacterias de un ancestro extinto y que esta secuencia fue luego transferida lateralmente al núcleo de un protozoo ancestro por alguna especie de los géneros *Pseudoalteromonas* o *Glaucocystis*, ya que las GspS de estos organismos fueron las que presentaron mayor identidad de secuencia con los genes homólogos de kinetoplastos.

El hecho que las proteínas presentes en tripanosomátidos sean híbridos de dominios con actividades opuestas, apoya la hipótesis de la transferencia lateral. Para los tripanosomátidos, la importancia de estas enzimas reside en la síntesis de T(SH)₂ y/o Gsp (no así para las bacterias, cuyo tiol principal es el GSH), por lo que de haber surgido estos genes de manera independiente en los kinetoplastos, en principio no hubiese sido necesario que los mismos incluyan un dominio amidasa capaz de degradar los productos generados por el dominio sintetasa.

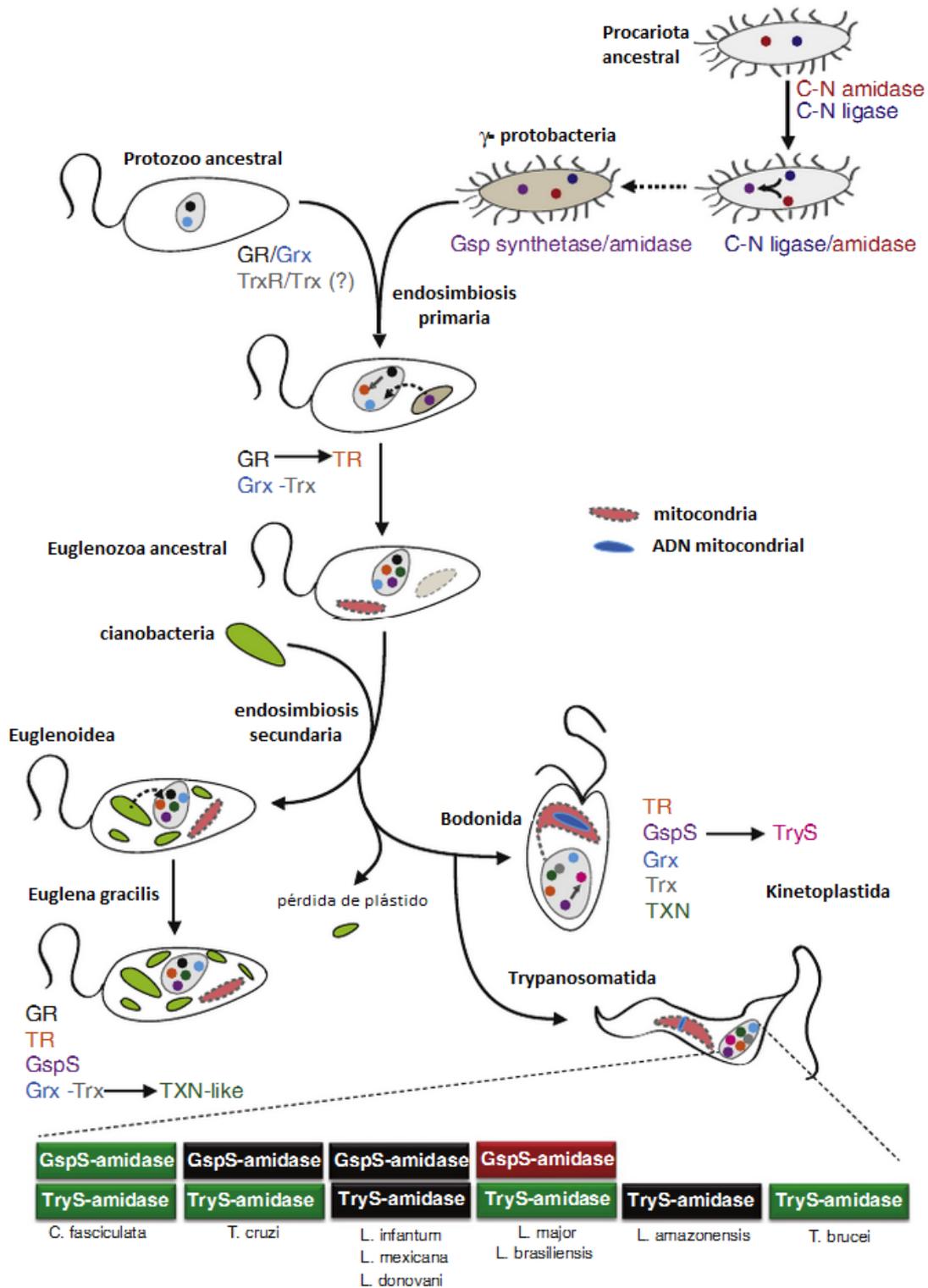


Figura 16. Esquema de la evolución hipotética del metabolismo redox de tripanosomátidos. Tomada y adaptada de Manta, 2013. El filo de las γ -Proteobacteria presenta una GspS compuesta de los dominios catalíticos: N-terminal amidasa tipo CHAP y C-terminal sintetasa tipo ATP. El gen de la GspS fue transferido desde una bacteria al núcleo de un protozoo ancestral durante una etapa primaria de simbiosis. Este organismo eucariota probablemente presentaba genes para GR y Grx, sin embargo la presencia de tioredoxina y tioredoxina reductasa (Trx y TrxR, respectivamente) aún no ha podido ser determinada. Luego de una

duplicación génica de la GR, una copia de dicho gen sufrió mutaciones que determinaron su especificidad por Gsp, convirtiendo la copia de GR en una TR. Luego de la adquisición de una mitocondria, Euglenozoa incorporó una cianobacteria (segundo evento de endosimbiosis). Los euglénidos retuvieron los plástidos, a partir de los cuales parte de su ADN fue transferido al núcleo. La secuenciación parcial del genoma y ARN de *E. gracilis* junto con información bioquímica de este organismo demostró la presencia de secuencias y actividades para GR, TR, GspS, Grx y tipo TXN (Montrichard et al. 1999). Se propone que los kinetoplastos (incluidos los sub-órdenes Bodonida y Trypanosomatida) se originaron a partir de Euglenidos que perdieron sus plástidos y condensaron el ADN mitocondrial en forma discoidal, formándose así el kinetoplasto. En Bodonidos, o algún ancestro de los mismos, ocurrió un evento de duplicación génica de la secuencia de GspS que posteriormente evolucionó en TryS, al ganar especificidad por Gsp, y por lo tanto capacidad para producir tripanotión. La reciente elucidación del genoma de *B. saltans* (Jackson et al. 2008) ha confirmado que todos los componentes básicos del metabolismo redox de tripanosomátidos ya se encontraban presentes en este organismo (Manta, 2013). Los tripanosomátidos están equipados con TrySy, solo algunas especies, adicionalmente con GspS. En el panel inferior se muestran las enzimas que estarían encargadas de la síntesis de tripanotión en diferentes tripanosomátidos de acuerdo a evidencia experimental *in silico* (secuencia de ADN) o bioquímica/biológica (verde: caracterizada funcionalmente, negro: presencia de secuencia putativa en genoma, rojo: pseudo-gen).

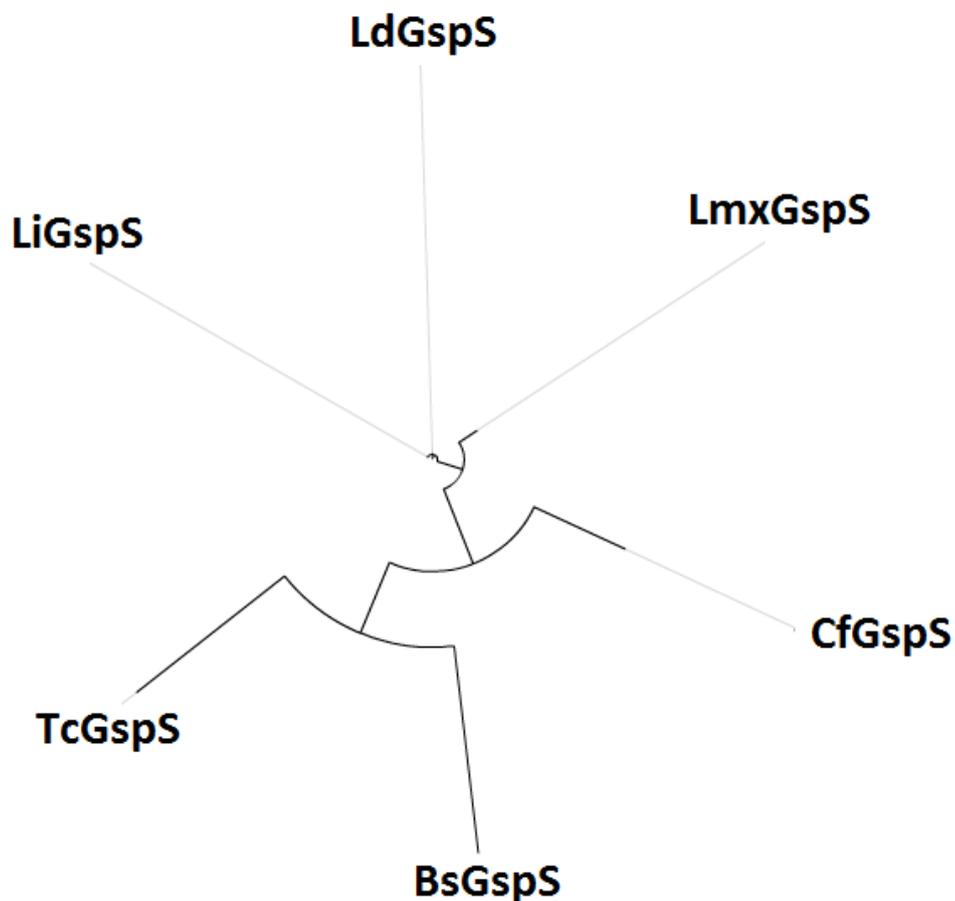


Figura 17. Análisis filogenético de secuencias de GspS de tripanosomátidos. Las secuencias de las proteínas de *T. cruzi* (TcGspS, Nro. Acceso TcCLB.508479.110), *C. fasciculata* (CfGspS, Nro. Acceso AAC48361.2), *L. infantum* (LiGspS, Nro. Acceso LinJ.25.2500), *L. donovani* (LdGspS, Nro. Acceso LdBPK_252500.1), *L. mexicana* (LmxGspS, Nro. de Acceso LmxM.25.2380), y *B. saltans* (BsGspS, Nro. de Acceso BS79535) fueron obtenidas de la base de datos GeneDB. El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con el servidor CLUSTAL OMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), utilizando la herramienta de *Neighbour-joining tree* y los parámetros por defecto del programa. La visualización del árbol filogenético se generó con el servidor iTOL (<http://itol.embl.de/>).

Los Kinetoplástidos pertenecen al clado *Euglenozoa*, el cual además lo integran organismos de la Clase Diplonemida (protozoos marinos) y Euglenida, que representa una de las ramas evolutivas más primitivas del linaje eucariota. Los euglénidos son protozoarios flagelados fotosintéticos no obligados que, se supone, adquirieron plástidos a partir de un evento de endosimbiosis secundario con una cianobacteria y conforman la raíz evolutiva de este clado e incluso de otros protistas como los Oomycota (Opperdoes, 2007). En el caso de los Kinetoplástidos, se postula que al perder los plástidos y condensar el ADN mitocondrial (o kinetoplasto) los euglénidos dieron lugar a los kinetoplástidos. Entre otras evidencias, esta teoría encuentra su sustento en la presencia de secuencias altamente relacionadas a genes plastídicos en los genomas de kinetoplástidos (Opperdoes, 2007). En ese sentido, resulta interesante destacar que datos de secuenciación parcial de genoma y de ARN así como de análisis bioquímicos (Montrichard, 1999; información de ARN sec. brindada por Dr. M. W. Gray, Dalhousie University, Canada), indican que *Euglena gracilis* codifica para una GspS no habiéndose identificado aún secuencias de *trys*. Estos hallazgos sugieren que el gen de la *gspS* estaba presente en un euglenozoario ancestral y a la vez refuerzan la idea del vínculo evolutivo entre euglénidos y kinetoplástidos, quedando aún pendiente de confirmación la presencia de secuencias de *gspS* y/o *trys* en representantes de la tercer Clase de este Filo, los diplonémidos. Dentro del grupo de los Kinetoplástidos, varios estudios filogenéticos concuerdan en que los Tripanosomatida se originaron a partir de los Bodonida (Simpson, 2004). Esto concuerda con el análisis de secuencias GspS, que muestra que el grado de identidad de las GspS de Tripanosomátidos es superior con el de otros protistas como *B. saltans* y oomycotas que respecto a las GspS bacterianas. Dado que en *E. gracilis* y oomycetes se encuentra presente únicamente

un gen para la GspS, y no TryS, podemos especular que el evento de duplicación y conversión del gen *gspS* en uno de *trys* tuvo lugar en Bodonida (o un antecesor únicamente de la rama evolutiva de los tripanosomátidos), donde al menos se tiene evidencia genómica de la existencia de ambas secuencias (ver más adelante, sección 4.2.2). (Fig. 16). Es interesante hacer notar que en el resto de los protistas y representantes de los demás Reinos no se identifican secuencias codificantes para GspS y/o TryS, lo cual sugiere que este gen no fue heredado por los demás linajes o bien fue perdido a lo largo de la evolución.

Dependiendo de la especie, los tripanosomátidos han ido divergiendo respecto a las entidades enzimáticas que necesitan para producir tripanotión (ver más adelante, sección 4.2.2). (Fig 16 y 17). Desde el punto de vista evolutivo, es interesante hacer notar que la GspS de *T. cruzi* es la que presenta mayor homología con la del organismo predecesor *B. saltans*. A continuación se ubica la GspS de *C. fasciculata* y las más distante evolutivamente son las GspSs de *Leishmania*. Esto concuerda perfectamente con lo que se cree fue la evolución filogenética de estas especies (Opperdoes, 2007).

Al analizar el contexto cromosómico donde está ubicado el gen de la GspS en Tripanosomas, se observa que es una región sinténica para todos los organismos que presentan una GspS, menos *T. cruzi* (Fig. 18 y 19). En *Leishmania*, incluso se conserva su posición en el mismo cromosoma para todas las especies, lo cual no hace más que reafirmar el origen monofilético del Género *Leishmania*. Sin embargo, llama la atención la falta de sintenia en *T. cruzi*, más aún el hecho que esta secuencia se encuentra inserta próxima a una región con varios pseudo-genes (Fig. 20).

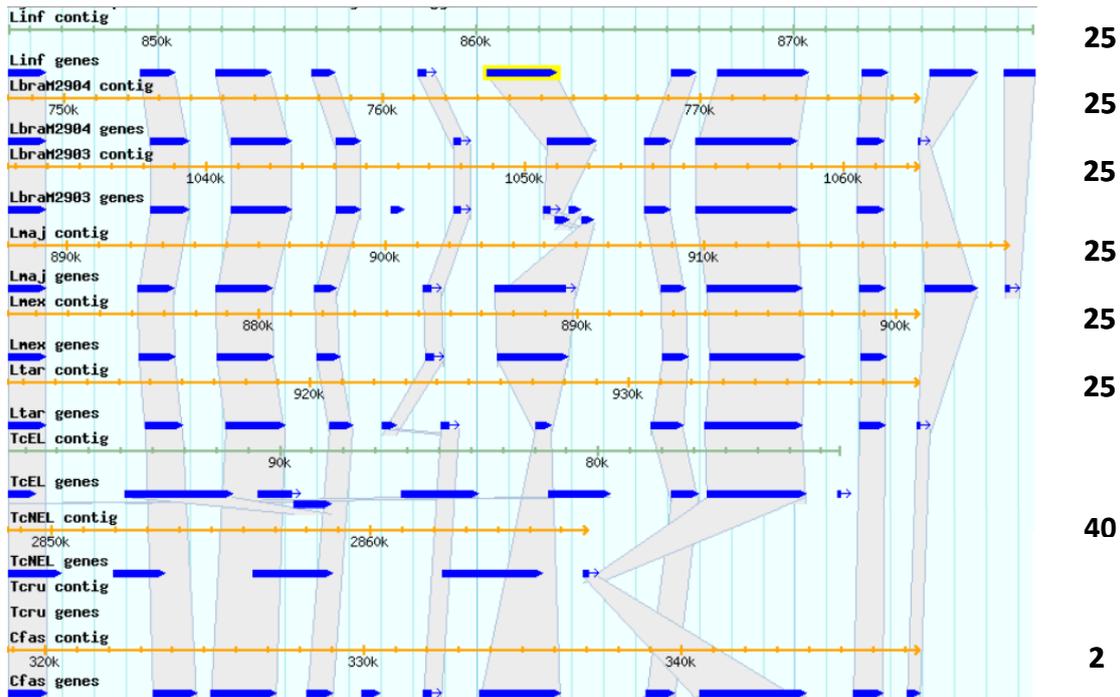


Figura 18. Secuencias y sintenia por ortología en locus codificante para GspS de Kinetoplástidos. En escala naranja o verde se muestran los tamaños de los fragmentos y largos cromosómicos correspondientes a cada especie (contig), en azul los genes anotados (genes) y en gris las secuencias sinténicas (basado en OrthoMCL - <http://www.orthomcl.org/orthomcl/>). En amarillo se resalta el gen de la GspS de *L. infantum*, que fue utilizado como sonda de búsqueda, y a la derecha se indica el número de cromosoma del locus correspondiente. Imagen generada con el visualizador *Genomic context* de la base de datos Tritryps.



Figura 19. Visualización parcial del cromosoma 25 de *L. infantum*. Imagen generada con el visualizador *Genomic context* de la base de datos Tritryps del cromosoma 25 de *L. infantum* (LinJ-25) desde 845 a 880 Kbases. Se observa el contexto cromosómico donde se ubica el gen de la GspS en *L. infantum*, el cual presenta sintenia conservada en todos los tripanosomátidos que codifican para GspS, menos *T. cruzi*. En azul se esquematizan las secuencias con marcos abiertos de lectura o codificantes y en amarillo se resalta el gen de la GspS. Arriba se indica la anotación de los genes. PH, proteína hipotética.

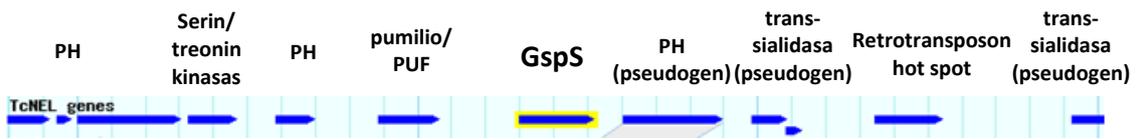


Figura 20. Visualización parcial del cromosoma 40 de *T. cruzi*. Imagen generada con el visualizador *Genomic context* de la base de datos TriTryps del cromosoma 40 de *T. cruzi* (TcChr40-P) desde 1970 a 2000 Kbases. En azul se esquematizan las secuencias con marcos abiertos de lectura o codificantes y en amarillo se resalta el gen de la GspS. Arriba se indica la anotación de los genes, en aquellos casos que la proteína se trataba de un pseudo-gen, se aclara entre paréntesis. PH, proteína hipotética.

4.2. Un único gen codifica para la GspS en diferentes cepas de *T. cruzi*

4.2.1 Detección y amplificación de los genes de gspS de distintas cepas de *T. cruzi*

En el cromosoma 40 del genoma de *T. cruzi* CL-Brener se encuentra una secuencia de copia única y 2160 pb que codifica para una GspS putativa de 720 aminoácidos (El Sayed 2005, TriTryp DB, código de acceso TcCLB.508479.110).

Haciendo uso de la información presente en las bases de datos, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el marco abierto de lectura de dicho gen a partir de ADN genómico de distintas cepas.

La cepa DM28c se clasifica como de tipo TcI y fue aislada de comadreja en Venezuela, mientras que la cepa Esmeraldo cI3 es de tipo TcII y fue aislada de humano en Brasil. Por otro lado las cepas Tulahuen y CL-Brener, cepas híbridas, se clasifican como de tipo VI y fueron aisladas de humano en Chile y de un insecto triatomino en Brasil, respectivamente (Zingales, 2009). Con esta batería de cepas disponibles en el laboratorio, se trató de representar mínimamente la gran diversidad existente en *T. cruzi*.

Se lograron aislar y clonar en el vector T comercial pCR2.1, secuencias putativas para la TcGspS de estas cuatro cepas (Fig. 21). Para las secuencias provenientes de las cepas CL-Brener y Tulahuen 2 fue posible secuenciar el gen completo en ambas hebras. Se obtuvo un 100% de identidad entre ambas secuencias, así como también respecto a las

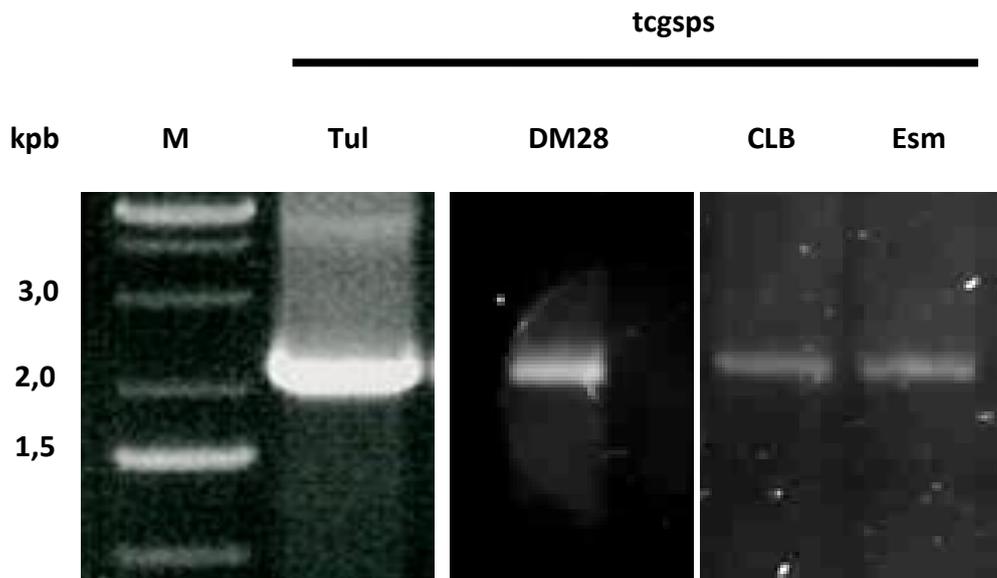


Figura 21. Amplificación por PCR del gen de GspS putativas de diferentes cepas de *T. cruzi*. Para las reacciones de PCR se utilizó como molde ADN genómico de las cepas Tulahuen 2 (Tul), DM28c (DM28), CL-Brener (CLB) y Esmeraldo c13 (Esm) de *T. cruzi*, y oligonucleótidos específicos (ver Tabla 1). Se aislaron amplicones completos (~2,1 kpb) para los cuatro genes, cuya identidad fue confirmada por secuenciación. M: marcador de tamaño molecular.

correspondientes depositadas en la base de datos (códigos de acceso TcCLB.508479.110 y AAX34340.1). Para el caso de las cepas de DM28c y Esmeraldo, se logró una secuenciación parcial de sus extremos 5' y 3'. Las secuencias parciales de DM28c coincidieron un 100% con la secuencia de *gspS* (código de acceso ESS63765.1) depositada en la base de datos del genoma de esta cepa (Grisard, 2014). Dado que el genoma de la cepa Esmeraldo aún no se encuentra secuenciado, no se pudo realizar la misma comparación. Sin embargo, al comparar las secuencias de GspS de las cepas DM28c y CL-Brener se observó que la identidad de secuencia aminoacídica entre ambas era del 95% y la similitud del 96% aproximadamente, siendo ligeramente mayor la diferencia a nivel de secuencia de ADN (aproximadamente 93%). Este porcentaje de divergencia estaría cercano a lo esperado, dado que se estima una variabilidad promedio del 3-4% para las secuencias codificantes de ADN en diferentes cepas de *T. cruzi* (Andersson, 2011).

Estas variaciones genéticas a pequeña escala pueden implicar adaptaciones fenotípicas de mayor o menor grado, principalmente si se considera que en estos organismos la microheterogeneidad puede ocurrir a nivel de varios genes simultáneamente (observado por ejemplo para el gen de la GspS de *C. fasciculata* o 1-C-Grx1 de *T. cruzi*, Fiestas; Fleitas, sin publicar). En el caso que las mutaciones no sean conservadas e involucren residuos con roles funcionales y estructurales importantes, esto podrá tener impacto a nivel biológico que puede redundar en una ventaja evolutiva.

De las mutaciones identificadas en TcGspS cepa DM28c que están asociadas con cambios en aminoácidos (33 de un total de 720), 4 fueron por residuos conservados y las restantes por residuos no conservados. Sin embargo, ninguna de las mutaciones involucra residuos que hayan sido reportados como críticos para la interacción con los sustratos y/o actividad catalítica de estas enzimas (ver sección 4.2.2). Por lo que *a priori*, la GspS de la cepa DM28c no presentaría diferencias funcionales con las de otras cepas de este parásito.

4.2.2 Alineamientos de secuencias y características funcionales de GspS y TryS.

El análisis de secuencia de GspS de *T. cruzi* que se desarrolla a continuación, se realizó tomando como secuencia representativa de estos organismos aquella correspondiente a la cepa CL-Brener.

A partir de una búsqueda en bases de datos se logró identificar las secuencias codificantes para GspS de *T. cruzi* (TcGspS - TcCLB.508479.110), *L. infantum* (LiGspS - LinJ.25.2500), *L. donovani* (LdGspS - LdBPK_252500.1), *L. mexicana* (LmxGspS - LmxM.25.2380), *L. major* (LmjGspS - LmjF.25.2380), *C. fasciculata* (CfGspS - AAC48361.2) y *E. coli* (EcGspS - ACB04078.1), indicándose en todos los casos el número de acceso correspondiente entre paréntesis. Se utilizó el servidor T-Coffee acoplado al método "clustalW_msa" para realizar el alineamiento múltiple de secuencias y el programa BoxShade para su visualización.

Cálculo de Identidad

TcGspS	100%					
LiGspS	48.64%	100%				
LdGspS	48.64%	99.59%	100%			
LmxGspS	48.5%	92.95%	93.08%	100%		
CfGspS	48.64%	70.86%	71%	72.49%	100%	
EcGspS	22.08%	23.71%	23.57%	24.25%	25.2%	100%
	TcGspS	LiGspS	LdGspS	LmxGspS	CfGspS	EcGspS

Cálculo de similitud

TcGspS	100%						
LiGspS	58.67%	100%					
LdGspS	58.8%	99.59%	100%				
LmxGspS	58.67%	95.39%	95.52%	100%			
CfGspS	59.34%	80.62%	80.75%	81.3%	100%		
EcGspS	33.73%	35.36%	35.23%	35.09%	35.77%	100%	
	TcGspS	LiGspS	LdGspS	LmxGspS	CfGspS	EcGspS	

Figura 22. Cálculos de identidad y similitud entre secuencias de GspS. Se calculó la identidad (izquierda) y similitud (derecha) de secuencias de GspS mediante el software en línea SIAS utilizando la matriz BLOSUM62 y los parámetros por defecto del mismo. TcGspS (TcCLB.508479.110), LiGspS (LinJ.25.2500), LdGspS (LdBPK_252500.1), LmxGspS (LmxM.25.2380), CfGspS (AAC48361.2) y EcGspS (ACB04078.1).

Se decidió dejar de lado la secuencia de *L. braziliensis* (LbrM.25.1980) por tratarse de un pseudo-gen que, en caso de expresarse, daría lugar a un polipéptido de 70 aminoácidos, lo cual representa apenas un 10% del largo promedio de secuencias completas de GspS. Por otro lado, la secuencia de *L. major* presenta una delección de 34 aminoácidos, que genera la aparición de un codón *stop* 5 residuos corriente abajo, generando una proteína trunca de 240 aminoácidos, únicamente con un dominio amidasa (Oza, 2005). Por otro lado, para el caso de *T. brucei*, que en principio se sabe que no presenta un gen que codifique para una GspS funcional, se encontró una región de 130 aminoácidos inserta en un fragmento mayor de 270 aminoácidos (EAN79834.1), con una identidad de secuencia mayor para GspS (31 y 35% con TcGspS y CfGspS respectivamente) que para TryS (23% y 26% con CfTryS y TbTryS, respectivamente). Mediante la herramienta BLAST se descubrió que el resto del fragmento podría pertenecer a una secuencia parcial de una D-alanil-glicil endopeptidasa. Esta evidencia estaría respaldando la hipótesis que *T. brucei* inicialmente contó con un gen para la GspS y que a lo largo de su evolución pudo prescindir de su producto hasta lograr eliminarlo por fragmentación y recombinación en otros sitios del genoma. En relación a esto, vale la pena destacar que entre los tripanosomátidos, *T. brucei* se destaca por poseer el genoma de menor tamaño, por lo que es común observar que el repertorio metabólico de este organismo tiende a ser minimalista (El-Sayed, 2005). Como ya fue comentado en la sección 1.2, esta – y otras – adaptaciones metabólicas que ha sufrido el clado *brucei* a lo largo del tiempo podrían

llegar a estar relacionadas a los años de evolución de parasitismo humano respecto al clado *cruzi*, que emergió mucho después.

La identidad y similitud de secuencias se calcularon con el servidor SIAS utilizando los parámetros por defecto detallados en la sección 3.11.2. Se pudo determinar que, en promedio, TcGspS presenta una identidad y similitud de secuencia de 49% y 59 % con las homólogas de *Leishmania* o *C. fasciculata* y de 22% y 34% con la proteína de *E. coli*, respectivamente (Fig. 22). Si bien el número de especies analizadas es bajo, estos datos nos permiten realizar estas dos conclusiones preliminares: (1) que el gen de la *gspS*, originalmente heredado de una γ -proteobacteria, sufrió presión evolutiva en un ancestro de kinetoplásticos (como Euglenozoa), ya que para las distintas especies de kinetoplásticos analizadas el porcentaje de identidad de la GspS con la secuencia homóloga de *E. coli* está por debajo del 25%; (2) que la secuencia de GspS de *C. fasciculata* tiene una fuerte relación filogenética con las presentes en especies del Género *Leishmania* (identidad de secuencias >70%). Esto último es coincidente con la estrecha relación evolutiva entre estos organismos (Maslov, 2001). El bajo nivel de identidad de secuencia que presentan las secuencias de GspS de kinetoplastos respecto a las bacterianas se debe principalmente a deleciones y/o inserciones que pudieron ocurrir a lo largo de la evolución, y no tanto a mutaciones puntuales de residuos aminoacídicos (Fig. 62, anexo).

A partir del alineamiento y datos bibliográficos, pudieron identificarse en TcGspS los dos dominios característicos de esta familia de proteínas: el dominio amidasa que comprende los residuos 1 al 200 unido al dominio sintetasa (residuos 230 al 700) por una región de aproximadamente 30 residuos.

Del análisis comparativo de múltiple secuencias se pudo identificar que la TcGpS posee conservados la gran mayoría de los residuos previamente reportados como claves para la actividad enzimática de TryS y GspS (Fyfe, 2008; Pai, 2006; Oza, 2002; Comini, 2005a; Koch, 2013; Pai, 2011), entre los cuales se encuentran: la triada catalítica del dominio amidasa, así como residuos de unión a Gsp, ATP, GSH, Sp y de coordinación del Mg^{2+} (Fig. 63, anexo).

Dentro de los residuos que participan directamente en la interacción con los sustratos, se detectaron cuatro variaciones respecto a otras GspS: Gln75Leu, Val77Leu,

Glu360Ala y Leu558Val. Las primeras dos se ubican en el dominio amidasa y de acuerdo a datos bioquímicos estructurales participan en la unión a Gsp (Koch, 2013). Las otras dos mutaciones se encontraron en el dominio sintetasa, en residuos que participan de la unión de ATP. De las cuatro variaciones, dos lo hicieron por aminoácidos similares (Val77Leu y Leu558Val), mientras que las otras dos (Gln75Leu y Glu360Ala) involucran un cambio de un residuo polar a uno hidrofóbico. La mutación que *a priori* puede resultar más significativa es la Glu360Ala, residuo que participa también en la coordinación de Mg^{2+} , ya que implica la pérdida de una carga negativa. No es posible determinar si esta única mutación puede o no afectar la funcionalidad de la proteína y a futuro sería interesante investigar el rol de esta mutación en la actividad enzimática de al menos proteínas homólogas (por ej. CfGspS).

Es interesante hacer notar que la identidad/similitud de secuencia encontrada entre GspS de especies de *Leishmania* claramente distinguibles desde el punto de vista filogenético, como *L. donovani* o *L. mexicana*, es comparable a la observada para diferentes cepas de una misma especie, como el caso de *T. cruzi* (CL-Brener contra DM28c). Esto sugiere que la secuencia de GspS no ha sufrido mutaciones una vez heredada por las distintas especies o variantes de cepas de cada Género, y que los mecanismos de silenciamiento génico de su expresión en algunas especies (*L. major* y *L. braziliensis*) han sido drásticos ya que involucraron la disrupción del marco abierto de lectura dando lugar a pseudo-genes.

Por otra parte, siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente se realizó un alineamiento de la secuencia de TcGspS contra las secuencias de TryS de diferentes especies, entre las que se encuentran: *T. cruzi* (TcTryS - AAG15409.1), *T. brucei* (TbTryS - CAC87573.1 y TbTryS_2 - AAO00721.1), *L. major* (LmTryS - CAC83968.1), *L. infantum* (LiTryS - CAM69145.1) y *C. fasciculata* (CfTryS - AAC39132.1).

Mediante esta aproximación, fue posible determinar que la secuencia de TcGspS presenta una identidad y similitud que promedia el 27% y 38%, respectivamente, con las secuencias ortólogas de TryS de otros kinetoplastidos (Fig. 23).

Cálculo de Identidad

TcGspS	100%						
TcTryS	27.23%	100%					
TbTryS	28.42%	71.57%	100%				
TbTryS_2	28.28%	71.44%	99.47%	100%			
LmTryS	25%	62.5%	63.94%	63.68%	100%		
LiTryS	25.52%	63.42%	64.73%	64.47%	95.92%	100%	
CfTryS	25%	64.6%	64.21%	63.94%	80.26%	81.57%	100%
	TcGspS	TcTryS	TbTryS	TbTryS_2	LmTryS	LiTryS	CfTryS

Cálculo de similitud

TcGspS	100%						
TcTryS	37.76%	100%					
TbTryS	39.47%	77.1%	100%				
TbTryS_2	39.47%	76.97%	99.6%	100%			
LmTryS	36.18%	71.57%	73.02%	72.89%	100%		
LiTryS	36.44%	72.1%	73.15%	73.02%	97.36%	100%	
CfTryS	36.44%	71.44%	71.44%	71.31%	88.15%	88.94%	100%
	TcGspS	TcTryS	TbTryS	TbTryS_2	LmTryS	LiTryS	CfTryS

Figura 23. Cálculos de identidad y similitud de secuencias parálogas entre TcGspS y TryS. Se calculó la identidad (izquierda) y similitud (derecha) de secuencias entre GspS de *T. cruzi* y TryS de diversos trypanosomátidos mediante el servidor SIAS utilizando la matriz BLOSUM62 y los parámetros por defecto del mismo. TcGspS (TcCLB.508479.110), TcTryS (AAG15409.1), TbTryS (CAC87573.1), TbTryS_2 (AAO00721.1), LmTryS (CAC83968.1), LiTryS (CAM69145.1) y CfTryS (AAC39132.1).

Si bien GspS y TryS comparten la gran mayoría de los residuos indicados como determinantes en la actividad enzimática, ambas enzimas se diferencian en que la primera no es capaz de emplear Gsp como sustrato para producir tripanotión. La base estructural de esta selectividad fue elucidada a partir del análisis comparativo de las estructuras cristalográficas disponibles para LmTryS (código de la base de datos de proteínas, PDB 2VPS, 2VPM y 2VOB; (Fyfe, 2008) y EcGspS (PDB 2IO7, 2IO8, 2IO9, 2IOA y 2IOB; (Pai, 2006). En ese estudio, Koch y col. definieron los residuos y regiones que determinan dicha especialización. En la TryS de *L. major* se reconocieron seis residuos de unión a Gsp (Trp362, Glu614 y Phe626 que interaccionan con GSH y Glu355, Glu407, Gly621 y Phe626 que interaccionan con GSH) y una secuencia de doce aminoácidos (Gly250 a Val262) que serían claves en la formación del bolsillo de unión de Gsp y que están ausentes o presentan mutaciones en las GspS (anexo, Fig. 63, flechas y rectángulo azul respectivamente) (Koch, 2013). En el caso de la TcGspS, identificamos sustituciones no conservadas en dos de los seis residuos de unión a Gsp, Gly621Lys y Phe626Val y una conservada en el residuo Trp362Phe, aparte de la ausencia de la secuencia de doce aminoácidos que en TryS da forma a este sitio. Estas características de la TcGspS son un fuerte indicio que esta proteína no será capaz de reacomodar el producto de la ligación entre GSH y Sp, para permitir la adición de una segunda molécula de GSH.

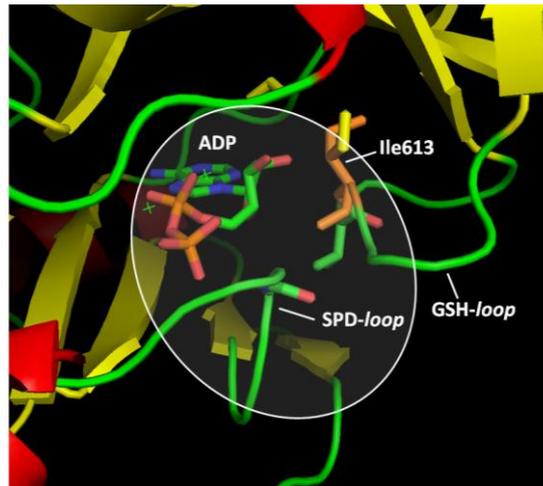


Figura 24. Sitio activo y de unión de sustratos de GspS de *E. coli*. Modelo estructural del sitio activo de GspS obtenido a partir de datos de difracción de cristales de la enzima de *E. coli* en presencia de ADP y Gsp (PDB 3098). En la imagen se muestra el sitio catalítico y de unión a sustratos (marco ovalado) y destacan las regiones no estructuradas (*loop*) involucradas en contactar al GSH y SPD así como una molécula de ADP ligada al sitio de unión de ATP. En naranja se muestra el residuo Ile605, correspondiente a la posición 613 de la TbTryS, localizado en el *loop* de unión de GSH y en proximidad con el ADP y región de unión a poliamina. El código de colores para el esqueleto de la estructura es: verde, regiones no estructuradas: rojo, hélices α y amarillo, láminas β . La imagen fue generada con el programa PyMOL (Molecular Graphic System).

Los estudios moleculares y bioinformáticos presentados hasta aquí aportan evidencias claras que distintas cepas de *T. cruzi* poseen en su genoma una secuencia codificante completa para GspS compuesta por dos dominios, amidasa N-terminal y sintetasa C-terminal, y, en principio, funcional por conservar los residuos claves para la producción de Gsp, como es el caso de la enzima homóloga de *C. fasciculata*.

A partir del alineamiento de secuencias, se pudo observar que la TcTryS presenta todos los residuos claves para la unión con los sustratos, y carece de inserciones o deleciones que puedan alterar la actividad de la enzima (Fig. 63, anexo) (Koch, 2013).

Por otro lado, al realizar este análisis detectamos que la secuencia reportada por Comini y col. (TbTryS_2; Nro. de acceso AAO00721.1 (Comini, 2003) difiere en cuatro residuos de aquella aislada de la misma cepa y línea celular de *T. brucei brucei* y depositada en la base de datos del genoma (TbTryS; Nro. de acceso Tb11.v5.0653,

Berriman, 2005; www.tritryp.org) y caracterizada cinéticamente (Nro. de acceso CAC87573.1, (Oza 2003). Los aminoácidos que distinguen una secuencia de otra se localizan: uno en el dominio amidasa (Ser167Gly) y los otros tres en la región con actividad sintetasa (Val445Ala, Ile493Val e Ile613Thr); residuos resaltados en rojo en la Fig 63, anexo.). Estas mutaciones podrían ser auténticas o bien haberse originado durante el proceso de aislamiento/amplificación y/o secuenciación de los genes) y dado que ninguna involucra residuos previamente identificados como críticos para la actividad de la enzima, hubiesen pasado desapercibidas sino fuera porque al realizar el cribado de una quimioteca de compuestos (Charquero D. 2014, Tesina de Grado, Univ. de la República) y la caracterización enzimática de estas proteínas (Benítez, Fiestas y col. en preparación) detectamos marcadas diferencias en la capacidad de cada una de ellas para interactuar con ligandos (sustratos e inhibidores). Con el fin de indagar acerca del origen de estas mutaciones se procedió a determinar nuevamente la secuencia del producto aislado originalmente por Comini y col. así como la del gen de TryS presente en el genoma de *T. brucei brucei* cepa 427. En ambos casos, los resultados confirmaron que la secuencia obtenida se corresponde exactamente con la secuencia salvaje reportada por Oza y col. (Oza 2003). Por lo tanto se deduce que estas mutaciones aparecieron por error durante la reacción de PCR original destinada al aislamiento y amplificación del ADN codificante (Comini, 2003). De acuerdo a la localización de estas mutaciones no se prevé que las mismas alteren la actividad de la enzima ya que no están directamente involucradas en los sitios de unión de los diversos sustratos de la TryS, excepto por el residuo que ocupa la posición 613 el cual se halla próximo al sitio activo, en un *loop* que conferiría estabilidad a la unión de GSH (Koch, 2013) y espacialmente adyacente a los sitios de unión de ATP y Sp. En la secuencia de TbTryS_2 esta posición es ocupada por una treonina que sustituye a una isoleucina estrictamente conservada tanto en GspS (menos TcGspS) como en TryS de diferentes especies. En ese sentido, es interesante destacar que el mutante TbTryS_2 posee parámetros cinéticos alterados respecto de la forma salvaje de la enzima que indican la pérdida de afinidad en la unión de sustratos. Precisamente el cambio más destacado involucra la interacción con GSH: (i) el K_m para GSH de la TbTryS_2 es 30 veces superior al determinado para la forma salvaje de la proteína (K_M GSH $4348 \pm 430 \mu\text{M}$ vs. $146 \pm 91 \mu\text{M}$, respectivamente) y (ii) mientras que la forma salvaje de la TbTryS

mostró una marcada inhibición por GSH (K_i $245 \pm 152 \mu\text{M}$) la proteína mutante fue refractaria a la inhibición por sustrato (no se observó inhibición a 10 mM GSH) (Benítez, Fiestas y col. en preparación). Para confirmar el rol de Thr613 en el comportamiento enzimático atípico de la TbTryS_2 procedimos a reemplazar este residuo por la isoleucina presente en la forma salvaje de la proteína. La reversión de la mutación Thr613Ile se tradujo en la normalización de la mayoría de los parámetros cinéticos y en especial de aquellos relacionados a la unión de GSH: el K_M y el K_i para GSH en este nuevo mutante fueron de 59 ± 25 y $294 \pm 122 \mu\text{M}$, respectivamente (Fiestas, Benítez y col. en preparación). Si bien aún resta validar estos resultados sobre un mutante Ile613Thr de TbTryS, el análisis del modelo estructural en conjunto con los datos cinéticos recién mencionados nos habilita a especular que el reemplazo de un residuo no polar como la isoleucina por una treonina desestabilizaría una red de interacciones hidrofóbicas que involucra a varias láminas β adyacentes que dan forma al sitio activo y contribuyen a fijar la posición del *loop* que forma parte del bolsillo de unión a GSH (Fig. 24). La pérdida del anclaje del *loop* de GSH induciría cambios conformacionales en esta región que debilitarían la interacción de la proteína con este ligando y otros (inhibidores) que ocupen este sitio, pero que concomitantemente podrían facilitar la accesibilidad y unión de otros ligandos (inhibidores) al sitio activo. Aquí es importante destacar que los experimentos de expresión de una copia ectópica de TryS en *T. cruzi* se realizaron empleando la secuencia TbTryS_2.

4.3. TryS pero no GspS es expresada en distintos estadíos y cepas de *T. cruzi*

4.3.1. Generación y respuesta de anticuerpos de ratón anti-TbTryS

Si bien en el laboratorio se contaba con un suero policlonal de conejo anti-TbTryS, éste poseía un título bajo que comprometía su sensibilidad y especificidad, y nos obligaba a realizar el enriquecimiento de los anticuerpos específicos mediante purificación por afinidad contra la TbTryS recombinante. Debido a que los anticuerpos así purificados no eran lo suficientemente estables en el tiempo, éste procedimiento lo debíamos repetir de manera frecuente. Por este motivo, decidimos generar una nueva tanda de

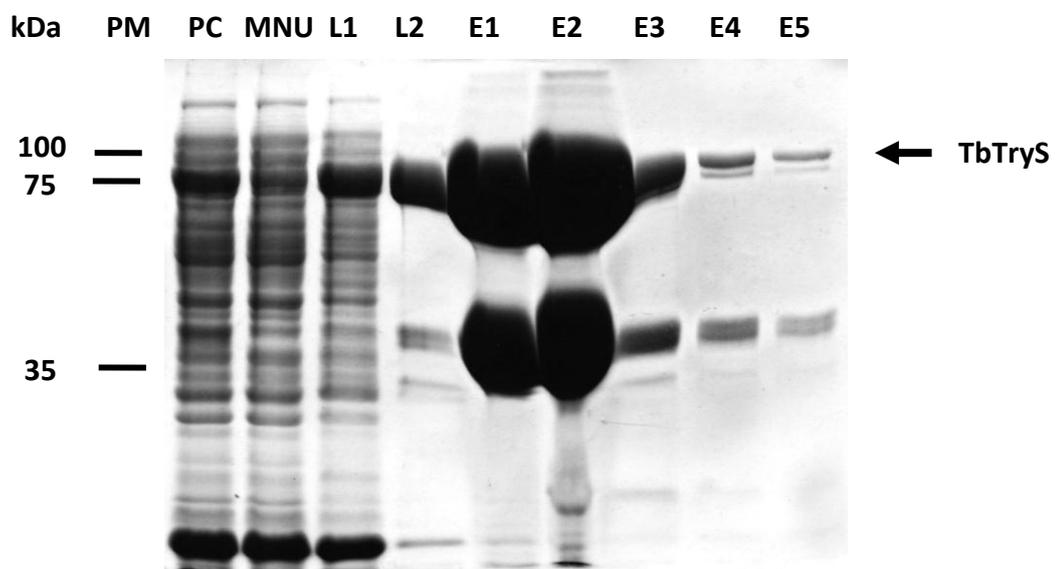
anticuerpos policlonales específicos contra TbTryS empleando una especie animal diferente (ratones BALB/cJ), y realizando un monitoreo de las distintas etapas de inmunización. La elección de la TbTryS como antígeno estuvo basada en que la forma recombinante de esta proteína se logra obtener en niveles altos de masa y pureza, y que el alto grado de identidad (72%) de secuencia con la enzima de *T. cruzi* darán lugar a anticuerpos con respuesta cruzada sobre esta última, como se evidenció con los anticuerpos anti-TbTryS generados en conejo.

Para la expresión de la forma recombinante de TbTryS en *E. coli* y su purificación se siguió el protocolo puesto a punto por Fiestas y Medeiros (Tesina de Grado L. Fiestas, Universidad de la República) y las modificaciones descritas en Materiales y Métodos (sección 3.4). La expresión y purificación de la TbTryS fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) y condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 10%, Fig. 25A). En la fracción soluble del lisado de bacterias auto-inducidas se observa una banda prominente cercana a los 75KDa (Fig.25A, carril PC) correspondiente a la TbTryS recombinante. Esta misma banda se encuentra en una proporción minoritaria en muestras de material no unido (MNU), lo cual indica una retención eficiente de la proteína etiquetada a la resina. En la primera fracción del lavado con imidazol (L1) se puede apreciar la remoción de proteínas contaminantes que se unieron de manera inespecífica y con menor afinidad a la columna HisTrap, mientras que en la fracción subsiguiente (L2) se comienza a detectar una elución parcial de la TbTryS. La elución completa de la proteína recombinante, y un contaminante importante de ~30 kDa, se logra a altas concentraciones de Imidazol (500 mM; E1-E5). Del análisis de las fracciones, se observa que la mayor parte de TbTryS eluyó principalmente en las fracciones 1 a 3, por lo que se decidió juntar las mismas para proceder con el próximo paso cromatográfico.

Para eliminar el contaminante que se encontraba casi en la misma proporción que la TbTryS y poseía un peso molecular significativamente más bajo, se realizó una cromatografía de filtración en gel sobre una matriz de Superdex G200 en una columna 16/60. Durante la cromatografía de exclusión molecular, se observaron tres picos con distintos volúmenes de retención (Fig. 25B). El primero de ellos correspondía a

oligómeros de alto peso molecular de la TbTryS, ya que en SDS-PAGE 10% se visualiza principalmente una única banda cercana a los 70 kDa para esta muestra. De acuerdo a los datos de calibración de la columna con estándares de diferentes masas moleculares, el pico que eluye a 78 mL, estaría correspondiendo a una especie con un volumen hidrodinámico compatible con una proteína de 85 kDa, es decir próximo al peso molecular de la forma monomérica de TbTryS. El análisis por SDS-PAGE de fracciones de este pico confirmó la presencia de TbTryS en estado homogéneo (pureza $\geq 95\%$). Finalmente, el contaminante eluyó de la columna con un volumen de retención de 90 mL (pico 3, Fig. 25B) que se corresponde con una especie de 40 kDa similar a la observada por SDS-PAGE desnaturalizante (Fig. 25C). El comportamiento de la proteína contaminante en ambas cromatografías nos permite concluir que ésta ha sido co-purificada con la TbTryS en la columna de His-Trap por su alta afinidad a metales y no por haber interactuado con esta última.

A



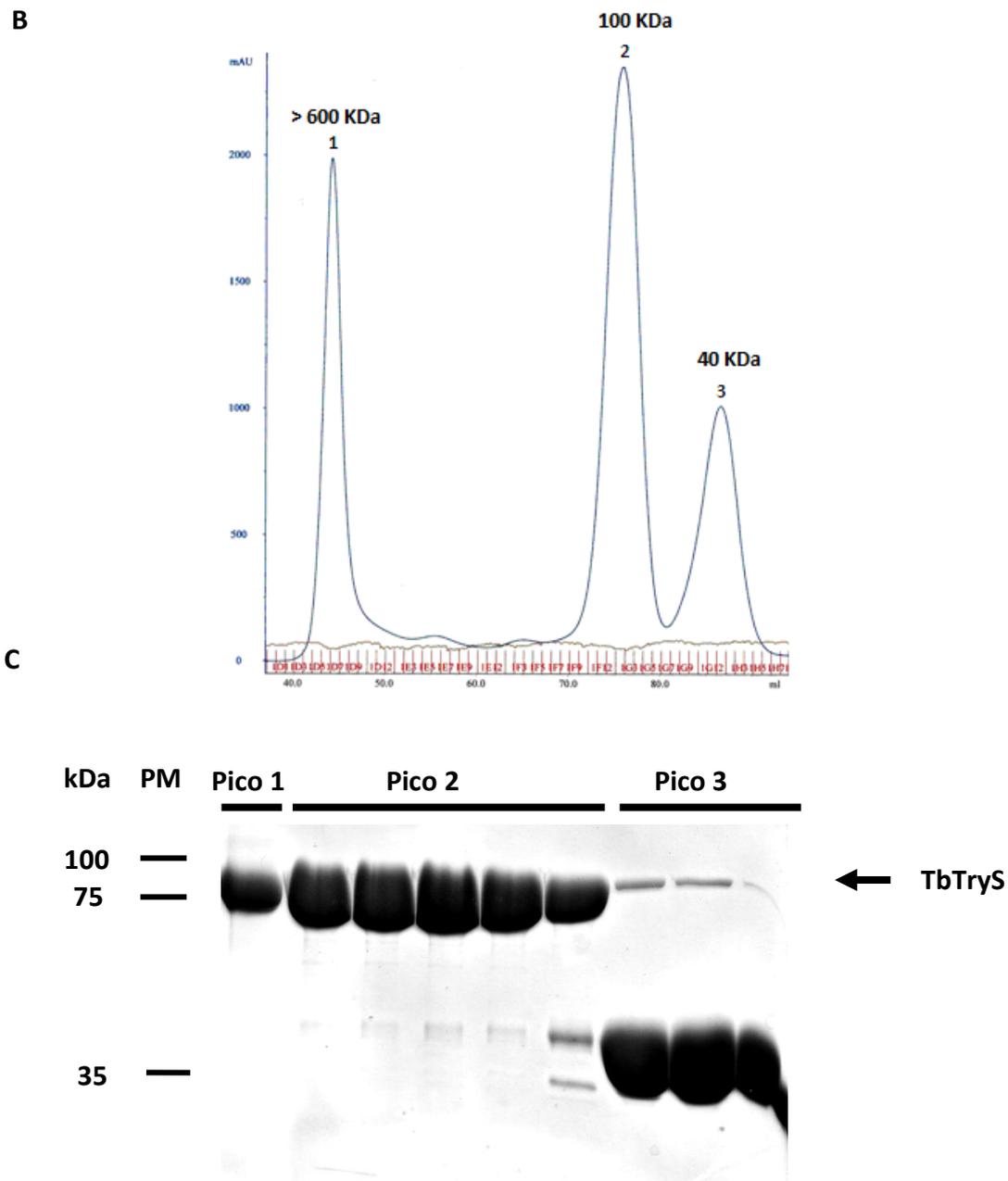


Figura 25. Análisis de la expresión y pureza de TbTryS. Análisis por SDS-PAGE al 10% de la expresión heteróloga en *E. coli*. y purificación de TbTryS. (A) Por carril se cargaron fracciones correspondientes a los diferentes pasos de purificación por afinidad a níquel (HisTrap). PC: fracción soluble de extractos de bacterias inducidas; MNU: 5 μ L de material no unido a la resina, L1-2: 10 μ L de lavados con amortiguador con 10 y 25 mM de imidazol, respectivamente; E1-5: 20 μ L de eluciones con amortiguador con 500 mM de imidazol, tal como se detalló en Materiales y Métodos (sección 3.4). (B) Cromatografía de exclusión molecular, donde los picos 1, 2 y 3 corresponden a especies que eluyen con centro de masa a 40 mL, 78 mL y 90mL, y representan proteínas con masas moleculares >600 kDa, 85 kDa y 40 kDa, respectivamente. (C) Fracciones de los principales picos de elución de la cromatografía de exclusión molecular de la muestra de TbTryS previamente purificada por columna de afinidad a níquel. PM: marcador de peso molecular. La flecha indica la banda correspondiente a la TbTryS recombinante.

Las modificaciones incorporadas durante este trabajo al protocolo de expresión y purificación de la TbTryS con cola de histidina N-terminal nos permitieron obtener 8 mg de proteína con una pureza superior al 95% por litro de cultivo. Esto representa un incremento de 4 veces en la masa de proteína pura obtenida respecto a lo reportado por Comini y col. (2003) y de 8 veces a lo informado por Ariyanayagam y col. (2003).

Con esta proteína se inmunizaron tres ratones hembras de la cepa BALB/cJ alojados en condiciones “libres de patógenos específicos” (SPF por sus siglas en inglés *specific pathogen free*) del bioterio del IPMon. El protocolo de inmunización consistió en inyecciones de 100 µg de TbTryS recombinante aplicadas por vía subcutánea el día 0, 21 y 42 (para mayores detalles ver sección 3.5.1) y se realizó con la asistencia técnica de personal de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del IPMon. Los títulos de anticuerpos específicos contra TryS en muestras de suero de ratones tomadas en distintas etapas de la inmunización, se determinaron por técnica de *Western blot* utilizando diferentes cantidades de proteína recombinante como estándar o extractos de parásitos *T. brucei* y *T. cruzi* (Fig. 26A y B). Como se muestra de manera representativa en la Fig. 26B, los sueros policlonales de los tres animales fueron capaces de reconocer con una alta especificidad a la TbTryS recombinante y endógena así como a la TcTryS endógena, por lo que no fue necesaria su purificación. Los niveles de título anti-TryS alcanzados en ratones fueron significativos respecto a los obtenidos en conejo, ya que además de no requerirse el enriquecimiento por purificación por afinidad contra la proteína recombinante del antisuero de ratón este pudo ser empleado a una dilución mayor (1/1000) que el de conejo (1/500). Estos antisueros fueron combinados y se les agregó glicerol al 50% v/v para almacenarlos a -20°C hasta su uso en ensayos de *Western blot* (sección 4.3.2) e inmunofluorescencia (sección 4.4).

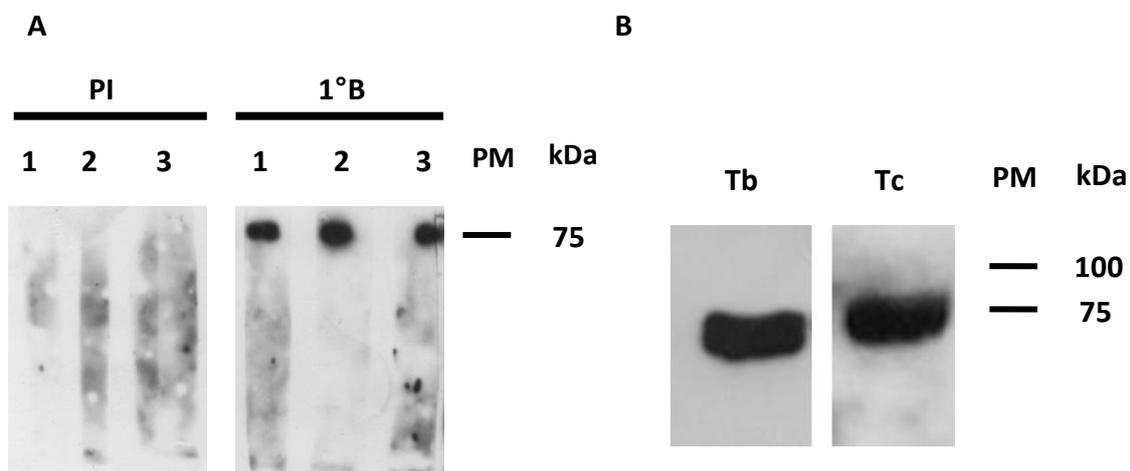


Figura 26. Evaluación de anticuerpos de ratón anti-TbTryS. (A) *Western-blot* de los sueros pre-inmunización (PI) y primer refuerzo (1°B) contra TbTryS recombinante. El panel de la izquierda muestra el resultado para los sueros PI de tres ratones diferentes y ensayados a una dilución 1/2000 contra la TbTryS recombinante (300 ng por carril). El panel de la derecha muestra la reactividad de los tres sueros 1°B ensayados a una dilución 1/1000 contra la TbTryS recombinante (50 ng por carril). (B) *Western-blot* del pool de sueros 1°B ensayados a una dilución 1/1000 contra un extracto celular soluble preparado a partir de 2×10^7 parásitos *T. brucei* (Tb, izquierda) y *T. cruzi* (Tc, derecha). PM: marcador de peso molecular. En todos los casos el tiempo de revelado y el de exposición fue de 30 segundos y 20 minutos, respectivamente.

4.3.2. Análisis de expresión y concentración intracelular de TryS en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

Para determinar si parásitos de la especie *T. cruzi* expresan activamente la TryS, se realizaron ensayos de *Western blot* que incluyeron el análisis de dos cepas, CL-Brener y DM28c, y los diferentes estadios de diferenciación del patógeno.

Como se muestra en la Fig. 27, si bien se detectó expresión de TryS en todos los estadios del ciclo de vida de cada cepa analizada, el contenido de esta proteína vario para cada caso. Estas diferencias se cuantificaron mediante análisis desintométrico de las señales detectadas con asistencia del programa ImageJ, y se transformaron en valores de concentración intracelular con la ayuda de una curva de calibración con distintas concentraciones de TcTryS recombinante y el dato de los volúmenes celulares reportados para cada estadio (Oza, 2005; Rangel-aldao, 1987)Tovar, 1996). Estos resultados se muestran en la Tabla 2.

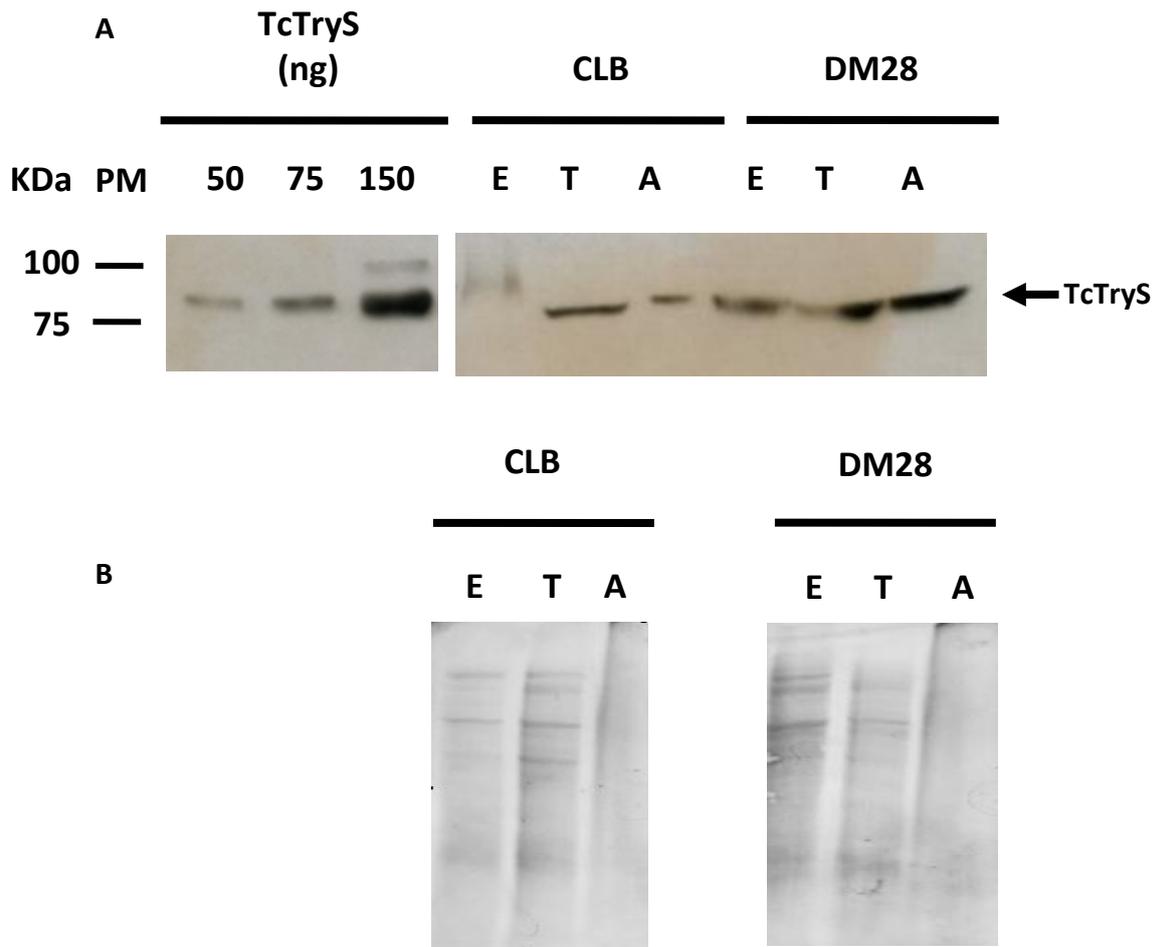


Figura 27. Evaluación de la expresión de la TryS en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. (A) *Western-blot* para TcTryS recombinante a diferentes concentraciones (izquierda) y de extractos solubles de $1,6 \times 10^7$ parásitos/carril para epimastigotas (E), tripomastigotas (T) y amastigotas (A) de las cepas CL-Brener (CLB) y DM28c (DM28) (derecha). Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-TbTryS a una dilución de 1/500. (B) Tinción por Ponceau-S de las proteínas de los extractos de parásitos, como referencia de la carga de parásitos en cada caso.

Para el estadio celular que reside en el intestino del vector insecto, tripanosomas epimastigotas, la concentración intracelular estimada de TryS fue similar en ambas cepas (Tabla 2). Tampoco se notaron diferencias en el contenido intracelular de TryS para el estadio infeccioso extracelular, tripomastigota, de ambas cepas (Tabla 2). Sin embargo, es interesante remarcar el incremento de 2 a 6 veces en los niveles de TryS cuando el tripanosoma se diferencia del estadio no infeccioso (epimastigota) a la forma infecciosa de tripomastigota.

Tabla 2. Cuantificación de la concentración intracelular de TryS en distintas cepas y estadios de *T. cruzi*. Las concentraciones intracelulares de TryS (μM) fueron estimadas mediante análisis densitométrico de los *Western-blot* ($n=2$) con el programa ImageJ, considerando un volumen celular de 30 o 55 (utilizando para el cálculo un promedio entre ambos valores), 12 y 9,7 fL para epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes (Rangel-Aldao R, 1987, (Tovar, 1996; Oza, 2005). Los niveles de TryS fueron normalizados al contenido de proteínas totales, obtenidos con la tinción con Ponceau-S.

Concentración intracelular aproximada		
(μM)		
	CL-Brener	DM28c
Epimastigotas	1,3	2,0
Tripomastigotas	6,1	8,1
Amastigotas	5,2	12,5

Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado en la literatura para diferentes cepas de *T. cruzi*, donde en promedio el contenido de TryS se duplicaba en el pasaje de epimastigota a tripomastigota metacíclico (Piacenza et al. 2009).

En el caso de la forma infectiva intracelular, amastigota, el contenido estimado de TryS es de 5,2 y 12,5 μM para CL-Brener y DM28c, respectivamente, nuevamente 4 a 6 veces superior al calculado para la forma epimastigota. Justamente en este estadio intracelular es donde la diferencia en el nivel de TryS se hace marcada entre las dos cepas analizadas, llegando a ser casi el doble para la cepa DM28c. Aquí vale la pena destacar que la cepa DM28c es reconocidamente más virulenta que la CL-Brener (ver sección 4.5).

Estas dos observaciones están de acuerdo con los resultados reportados por Piacenza y col. (Piacenza, 2009), quienes han observado que las cepas más virulentas de *T. cruzi* presentan un contenido más elevado de algunas enzimas del sistema antioxidante como por ejemplo la TryS, y la isoforma citosólica y mitocondrial de peroxidasas dependientes del tripanotión, con valores promedio 2,3 y 2,5 veces mayores en cepas

virulentas, respectivamente. Una posible explicación a este aumento en la expresión de TryS, es que respondería a un mecanismo adaptativo del patógeno para hacer frente al ataque oxidativo al que se vería expuesto durante la invasión de macrófagos (Piacenza, 2009). Al presentar mayores niveles de TryS, y por lo tanto tripanotión, el parásito cubriría la demanda de poder reductor para abastecer a la triparredoxina y esta a las peroxidasas que descompondrían las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno producidas por el hospedero. De esta forma la TryS operaría como un factor de virulencia en *T. cruzi*.

4.3.3. Construcción del vector de expresión pET15b-TcGspS

Dado que uno de los objetivos de esta tesis era lograr la caracterización bioquímica y biológica de la GspS de *T. cruzi* con la finalidad de estimar la importancia funcional de esta enzima y su producto, en primera instancia nos planteamos el objetivo específico de expresar y purificar la GspS de la cepa CL-Brener de *T. cruzi*.

Por esta razón, la secuencia del gen de la TcGspS fue subclonada en el plásmido de expresión pET15b (Novagen) a partir del vector pCR2.1-tcgspS (ver sección 4.2.1). El plásmido pET15b agrega en el extremo N-terminal de la TcGspS un tag de 6 histidinas que facilita la purificación de proteína recombinante por cromatografía de afinidad con metales (IMAC). La identidad del gen clonado, su correcta inserción y ausencia de mutaciones fue confirmada mediante secuenciación.

4.3.4. Ensayos de optimización de la expresión de la TcGspS en *E. coli*

Para lograr obtener la TcGspS en buena cantidad y de manera soluble, se llevaron a cabo diversos ensayos de expresión empleando el vector pET15b-TcGspS, diferentes cepas de *E. coli* y condiciones de cultivo, así como pruebas de purificación en condiciones nativas y desnaturizantes a pequeña y mediana escala.

En primer lugar, se probó de expresar la proteína recombinante empleando las condiciones reportadas en Comini y col. para la CfTryS (Comini, 2005) las cuales incluyen el uso de la cepa Tuner de *E. coli*, el cultivo en medio TB con 1% (p/v) glucosa e inducción convencional con IPTG a 25°C durante 16 horas. Bajo estas condiciones no

fue posible detectar expresión de TcGspS tanto en la fracción soluble como insoluble (datos no mostrados) de extractos de bacterias.

A partir de estos resultados, se decidió realizar una optimización manual de las condiciones de expresión para intentar obtener una forma soluble y estable de la proteína. Se resolvió cultivar la cepa de expresión en medio TB aplicando inducción convencional con IPTG (0,5 mM y 1 mM) por un período de 30 horas y variando las temperaturas de inducción (20°C, 25°C y 30°C) y los huéspedes de expresión (Tuner (DE3), BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Origami (DE3) y Origami(DE3) pLysS).

Rosetta es una cepa modificada que expresa algunos ARNt para codones poco frecuentes en *E. coli*, como lo son aquellos que median la incorporación de arginina, isoleucina, leucina, prolina y glicina al polipéptido que está siendo sintetizado (Tegel, 2010). La presencia de codones “raros” en la secuencia del gen de interés determinará que la traducción de la proteína se vea enlentecida (por escasez del ARNt correspondiente), lo cual redundará en una expresión anómala (formas truncadas), baja o nula de la proteína en cuestión. Si bien nuestro análisis de uso de codones por la secuencia de *gspS* de *T. cruzi* no indicó la presencia de un número importante de codones “raros” (un único codón “raro” y nueve de frecuencia moderada), decidimos de todas formas emplear esta cepa como huésped de expresión para evitar cuellos de botella durante la elongación del polipéptido.

Origami es una cepa doble mutante en tioredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*), por lo que si la proteína contiene algún puente disulfuro, se va a favorecer el correcto plegamiento por ofrecer un ambiente citoplasmático más oxidativo. La secuencia de TcGspS presenta 14 cisteínas, por lo que algunas podrían estar formando parte de puentes disulfuro, y por lo tanto esta cepa otorgaría una ventaja para la generación y estabilidad de los mismos.

La cepa Origami pLysS contiene un vector (pLysS) que dirige la expresión de lisozima, la cual se une e inactiva a la T7 ARN polimerasa en condiciones de no inducción, evitando de esta forma la expresión basal del gen de interés. Este tipo de inducción controlada de la expresión es muy útil en casos donde la proteína recombinante resulte tóxica

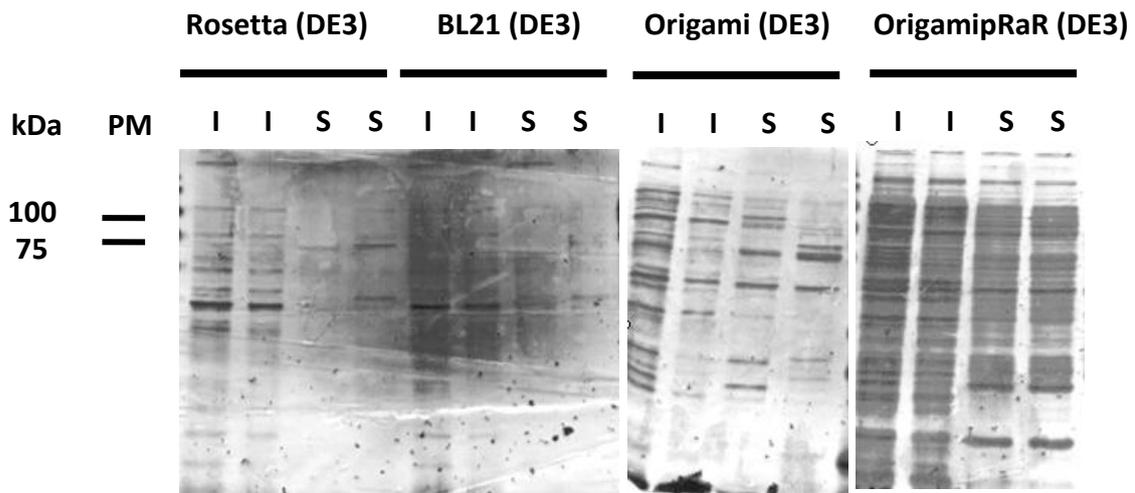


Figura 28. Cribado de condiciones de expresión heteróloga para TcGspS. Análisis de expresión de TcGspS a partir del plásmido pET15b por distintas cepas de *E.coli*: BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Origami (DE3) y Origami pRARE. Los cultivos se realizaron en medio TB con 1% glucosa (p/v), induciendo la expresión con 500 mM IPTG cuando se alcanzó una D.O. entre 1-1,4 e incubando a 20°C (1) o 25 °C (2) por 16-18 hs. Las imágenes corresponden a muestras de proteínas purificadas por IMAC en condiciones nativas (S) y desnaturalizantes (I) analizadas por SDS-PAGE al 10%. PM: marcador de peso molecular.

para la célula o por problemas de estabilidad de la misma se pretenda inducir su producción en una determinada etapa del cultivo. En principio, no se espera que la TcGspS resulte tóxica para *E. coli* ya que esta bacteria posee una GspS endógena (ver sección 4.1) y porque, como se ha reportado previamente (Oza, 2005) o mostraremos más adelante (sección 4.3.5), ha sido posible expresar en este procarionta la proteína homóloga de *C. fasciculata*. Por otro lado, nos interesó evaluar este sistema de expresión para intentar expresar la proteína durante las fases logarítmica tardía/estacionaria de crecimiento, y de esta forma aproximarnos a las condiciones en las que su homóloga se expresa normalmente en *E. coli* (Smith, 1995).

En total se ensayaron 25 condiciones diferentes de expresión combinando variables de tipo de inducción (concentración de IPTG para la inducción), temperatura de inducción (20°C, 25°C y 30°C) y cepas de expresión (4 diferentes). En todos los casos se procedió a la purificación en condiciones nativas o desnaturalizantes (amortiguadores con urea 8 M) de la proteína recombinante. En la Fig. 28 se muestra un resultado representativo de los resultados de expresión obtenidos en medio TB con 1% (p/v) glucosa. Como se

puede observar en esa figura, en ningún caso se logró una mejora significativa en la expresión de la proteína respecto a los resultados obtenidos con la cepa Tuner DE3 en medio de TB.

Finalmente, se ensayaron las mismas condiciones aplicadas para producir la TryS recombinante (sección 3.3), incluyendo el empleo de un medio de auto-inducción. La expresión de la TcGspS recombinante en fracciones solubles e insolubles de extractos de bacterias cultivadas en medio ZY-5052 y 25°C fue evaluada por SDS-PAGE al 10% a diferentes tiempos de cultivo (24, 27, 30, 33 y 48 horas). Como se observa en la Fig. 29, tanto en el material soluble como insoluble fue posible reconocer la presencia de una banda de aproximadamente 85 kDa, lo cual es compatible con el peso molecular estimado para la forma recombinante de TcGspS (masa molecular teórica de 81 kDa). La identidad de esta banda fue confirmada mediante análisis de espectrometría de masas realizado como servicio por la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del IPMon (mapeo de péptidos trípticos por MALDI-TOF; Fig. 30), el cual confirmó, únicamente en la muestra de material insoluble, la presencia de 14 péptidos con masas compatibles para secuencias peptídicas correspondientes a la secuencia de TcGspS. Los péptidos identificados logran una cobertura del 51 % de la secuencia aminoácida de la TcGspS, lo cual es significativo teniendo en cuenta la longitud de la proteína (720 aminoácidos). Para la banda de 85 kDa presente en la fracción soluble se identificaron péptidos cuya masa se correspondía con la estimada para productos trípticos de una fusión entre UDP-L-Ara4N formiltransferasa y UDP-GlcA C-4'-decarboxilasa de *E. coli* y ningún péptido compatible con una secuencia de TcGspS. Se observó como el pico máximo de expresión de la proteína en la fracción insoluble se alcanza a las 30 horas, y luego vuelve a disminuir hasta desaparecer completamente a las 48 horas (dato no mostrado), lo que demuestra la poca estabilidad de la proteína expresada.

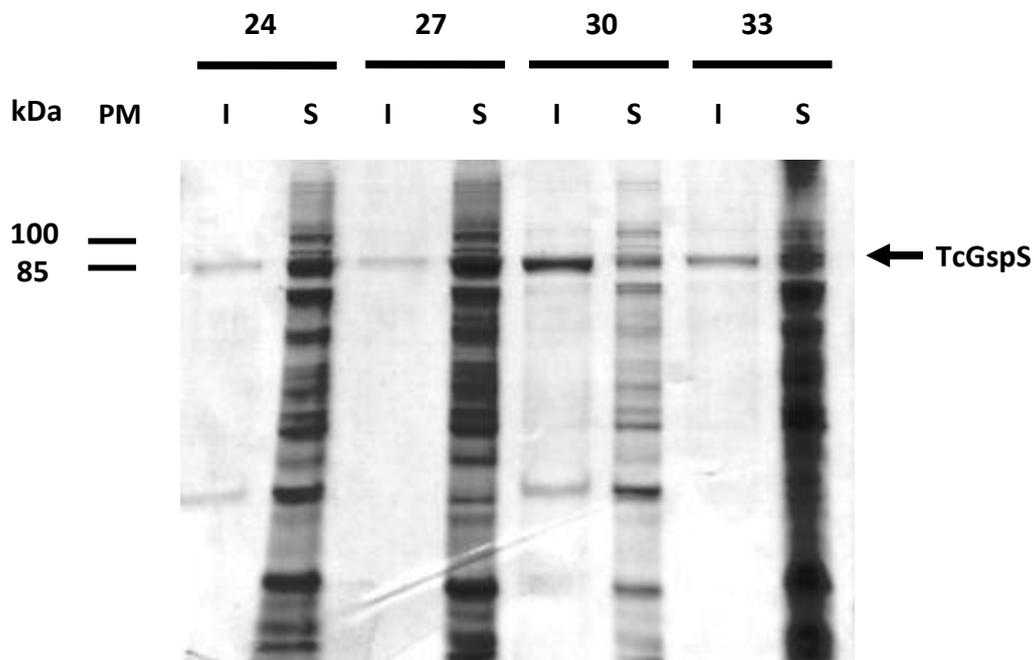


Figura 29. Expresión heteróloga de GspS de *T. cruzi* en *E. coli*. Bacterias *E. coli* Tuner (DE3) transformadas con el vector pET15b-TcGspS se crecieron en medio de auto-inducción (ZYM-5052) a 25°C, 120 rpm por 48 horas. La expresión de la proteína recombinante fue evaluada a diferentes tiempos (24, 27, 30 y 33 horas) por SDS-PAGE 10%. Las muestras corresponden a la fracción proteica soluble (S; 40µg/carril) e insoluble solubilizada en amortiguador PBS con 3% (v/v) triton x-100 (I; 5 µg/carril). La flecha indica la banda correspondiente a la TcGspS recombinante detectada en la fracción insoluble e identificada por mapeo de péptidos trópticos por MALDI-TOF. PM: marcador de peso molecular.

En su conjunto, estos resultados muestran que no es posible expresar de manera soluble la TcGspS etiquetada con una cola de histidina N-terminal en *E. coli*, al menos en la variedad de condiciones evaluadas en este trabajo. Si bien este resultado es opuesto al reportado para la CfGspS recombinante ((Oza, 2002)sección 4.3.5), resulta llamativo que también haya sido infructuosa la expresión de GspS de *L. infantum* en *E. coli* (Castro, 2014).

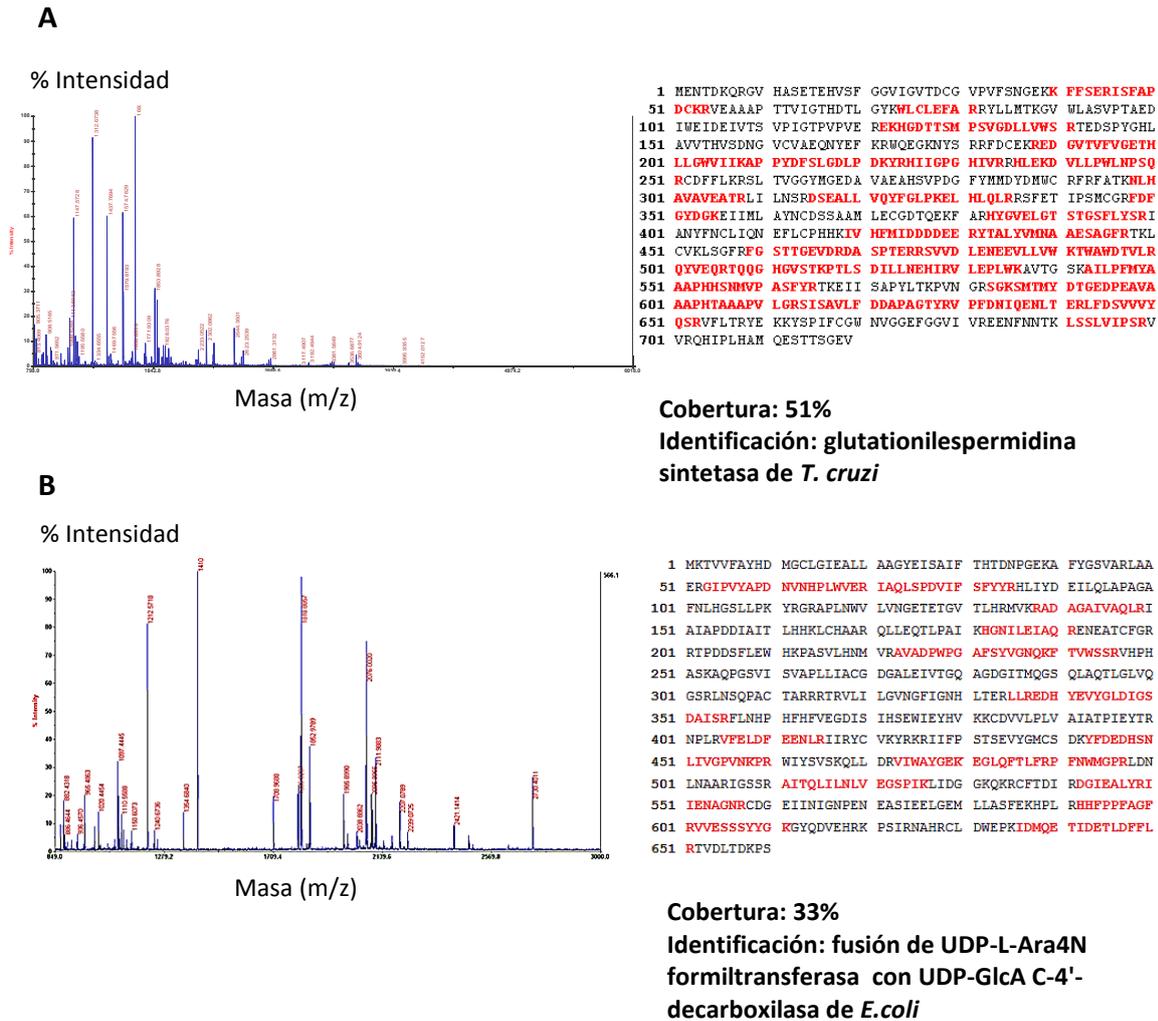


Figura 30. Análisis de espectrometría de masas por mapeo de péptidos trípticos por MALDI-TOF. Resultado de la identificación de proteínas por mapeo tríptico para bandas de la fracción insoluble (A) o soluble (B) del ensayo de expresión de TcGspS en medio de ZY-5052 que poseen un peso molecular aproximado de 85 kDa. A la izquierda, se presenta el espectro de masas obtenido para cada muestra y a la derecha se muestra la cobertura de secuencia obtenida con la digestión peptídica (en rojo) y la identificación estadísticamente significativa de la proteína con el software MASCOT (MatrixScience).

El análisis comparativo de las secuencias de GspS de distintas especies (Fig. 62, anexo) no nos permite identificar con claridad patrones de mutación que expliquen una inestabilidad de las proteínas de *T. cruzi* y *L. infantum*. Aquí vale la pena traer a colación el caso de la TryS de *C. fasciculata* cuya expresión en *E. coli* en forma soluble y activa resultó inicialmente fallida pero ocho años más tarde, el trabajo con una secuencia que variaba en 3 residuos respecto de la anterior permitió obtener la

producción más alta alguna vez reportada para un miembro de esta familia de proteínas empleando un sistema de expresión heterólogo, 160 mg proteína por L de medio de cultivo (Comini, 2005). Tampoco aquí resultó evidente que residuo de los mutados fue responsable por este drástico cambio en la estabilidad de la proteína, lo cual da una idea de lo intrincado que puede ser desentrañar este interrogante para las GspS.

Por esta razón y otras discutidas más adelante, además que las cantidades obtenidas de proteína recombinante insoluble fueron bajas (<2 µg/L cultivo) y lo reportado para LiGspS (Souza, 2014), se optó por descartar la exploración de distintas estrategias tendientes a obtener TcGspS soluble y activa, y que incluían: (i) ensayos de re-naturalización de la forma insoluble, (ii) expresión de GspS como fusión a proteínas que incrementan la solubilidad y expresión de la proteína blanco (como por ejemplo GST o MBP), y (iii) cribado a gran escala de condiciones de expresión en plataforma robótica semi-automatizada disponible en la Unidad de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo.

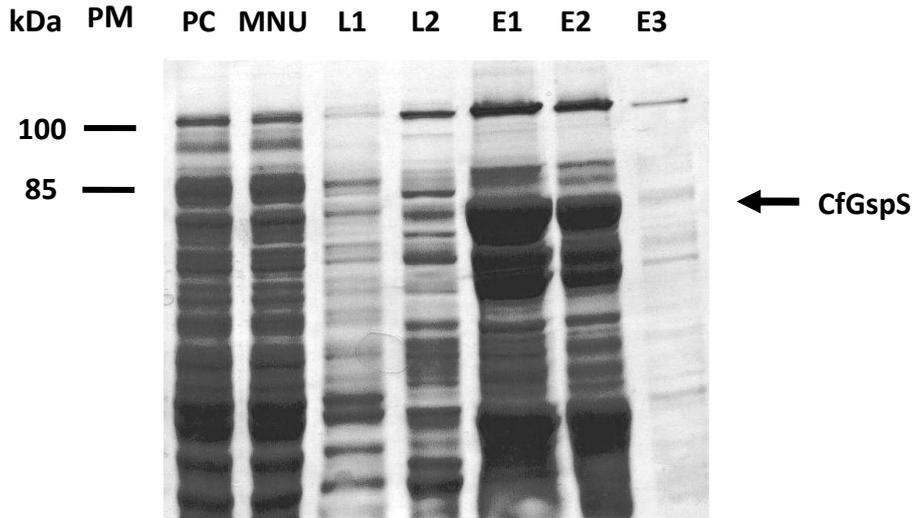
4.3.5. Generación y respuesta de anticuerpos de ratón anti-CfGspS

Uno de los objetivos de esta tesis implicaba determinar si *T. cruzi* en sus diferentes estadios de diferenciación y cepas expresa la GspS. Dado que no se contaba en el laboratorio con un anticuerpo anti-GspS y por la imposibilidad de obtener la TcGspS recombinante en cantidad suficiente para la generación de anticuerpos, se recurrió a producir antisuero de ratón contra la proteína homóloga de *C. fasciculata*. Esta comparte una identidad de secuencia del 48%, por lo que *a priori* se espera que el anticuerpo reconozca de manera cruzada a la proteína de *T. cruzi*.

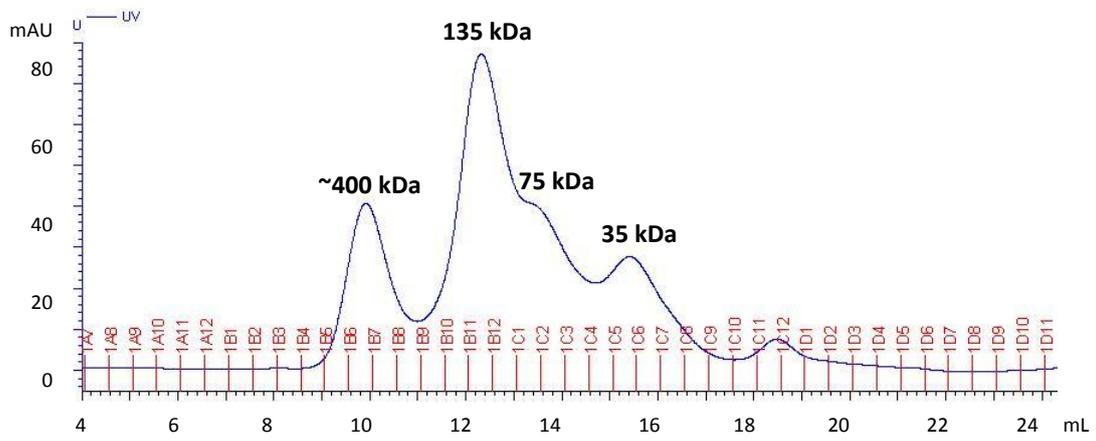
La CfGspS recombinante empleada en las inmunizaciones fue producida en *E. coli* y purificada hasta homogeneidad siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos (sección 3.4). En el sobrenadante de extractos de bacterias autoinducidas se observa una banda cercana a los 85kDa (Fig. 31A) que se corresponde con el peso molecular esperado para la CfGspS con cola de histidina (peso molecular estimado de 83 kDa). Luego de la purificación por columna de afinidad HisTrap esta misma banda se

hace prominente en las fracciones 1 y 2 de elución, y se la encuentra en una proporción significativamente menor en las fracciones correspondientes a material no unido (MNU), lavado (L1 y L2) y la fracción 3 de elución (E3). Debido a que la CfGspS fue retenida en la columna junto con una gran cantidad de otras proteínas de *E. coli* fue necesario realizar cromatografías complementarias para alcanzar una homogeneidad superior al 90%. Las fracciones de elución 1 y 2 fueron combinadas, concentradas y aplicadas sobre una columna de filtración por gel Superdex G200 10/300. Durante la cromatografía de exclusión molecular, se observaron cuatro picos con volúmenes de retención de 10, 12,5, 13,5 y 15,5 mL que se corresponden con proteínas con masas moleculares aparentes de 400, 135, 75 y 35 kDa, respectivamente (Fig. 31B y C, respectivamente). El análisis de estas fracciones por SDS-PAGE al 10% (Fig. 31D) reveló que el pico 2 (vol. de retención de 12,5 mL) corresponde a la proteína recombinante en estado monomérico, mientras que los picos 1, 3 y 4 contienen proteínas contaminantes de diversos pesos moleculares. Si bien este paso cromatográfico permitió eliminar una gran cantidad de contaminantes, fue necesario realizar una tercera cromatografía, esta vez de intercambio aniónico sobre una columna MonoQ HR 5/5. Aplicando un gradiente incremental de fuerza iónica se logró eluir la CfGspS recombinante con una concentración de NaCl de 200 mM. Con este protocolo de expresión y purificación se logró un rendimiento de 0,18 mg de CfGspS por litro de medio de cultivo con una pureza mayor al 90%. Este rendimiento no es demasiado elevado, debido a los niveles moderados de expresión alcanzados y principalmente al hecho de tener que realizar tres pasos de purificación, aunque suficiente para realizar mediciones de actividad enzimática (ver sección 4.8) y la inmunización de ratones.

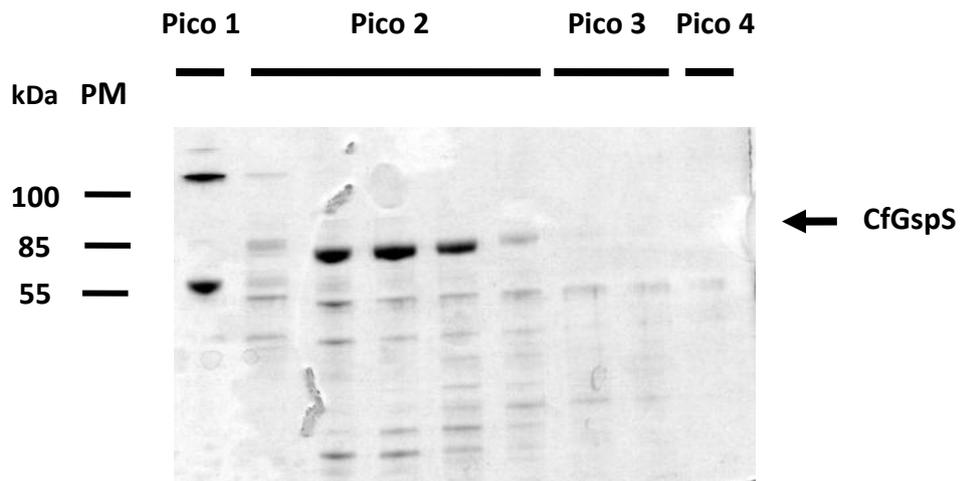
A



B



C



D

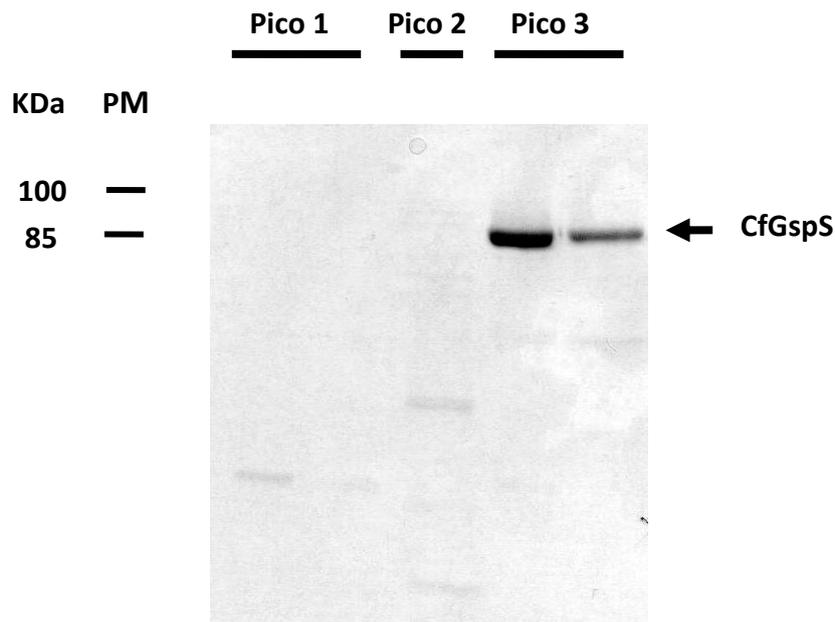


Figura 31. Expresión y purificación de CfGspS. La expresión y purificación de CfGspS recombinante se analizó por SDS-PAGE al 10%. (A) Cromatografía de afinidad con resina HisTrap. PC: 5 μ L de fracción soluble de extractos de bacterias inducidas; MNU: 5 μ L de material no unido a la columna; L1-2: 10 μ L de lavados con amortiguador con 10 y 25 mM de imidazol, respectivamente; E1-3: 20 μ L de eluciones con amortiguador con 500 mM de imidazol. (B) Cromatografía de exclusión molecular (gel Superdex G200) de la muestra de CfGspS previamente purificada por IMAC. (C) Análisis de las distintas fracciones de los cuatro principales picos de elución correspondientes a proteínas con una masa molecular aparente de: 400 (pico 1), 135 (pico 2), 75 (pico 3) y 35 kDa (pico 4), respectivamente. (D) Cromatografía de intercambio aniónico (resina MonoQ) de la muestra de CfGspS purificada por gel filtración. Durante el gradiente se obtuvieron picos de elución a 0 (pico 1), 45 (pico 2) y 200 mM de NaCl (pico 3). PM: marcador de peso molecular. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína recombinante CfGspS.

Con la proteína CfGspS se inmunizaron dos ratones hembras de la cepa BALB/cJ alojados en condiciones SPF en el bioterio del IPMon. El protocolo de inmunización consistió en inyecciones de 50 μ g de CfGspS recombinante aplicadas por vía subcutánea el día 0, 21 y 42 (para mayores detalles ver sección 3.5.1), realizadas con la asistencia técnica de personal de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del IPMon. El título y especificidad de los anticuerpos de ratón contra CfGspS fue evaluado en muestras de suero obtenidas en distintas etapas del protocolo de inmunización, mediante técnica de *Western blot* y empleando diferentes cantidades de distintas proteínas recombinantes (CfGspS, TcGspS, TcTryS, TbTryS) o extractos de *C. fasciculata*. Los anticuerpos policlonales presentes en los sueros fueron capaces de

reconocer con una alta especificidad a la CfGspS recombinante y endógena así como también la TcGspS recombinante, por lo cual no fue necesaria su posterior enriquecimiento/purificación. Si bien en menor grado, también se observó reactividad cruzada de este antisuero con las proteínas recombinantes TcTryS y TbTryS (Figura 32). Estos antisueros fueron combinados y se les agregó glicerol al 50% v/v antes de ser almacenados a -20°C para su posterior uso en ensayos de *Western blot* (sección 4.3.6).

4.3.6 Detección de TcGspS por ensayos de *Western blot* y RT-PCR

Para determinar si *T. cruzi* expresa activamente la GspS, se realizaron ensayos de *Western blot* sobre diferentes estadios de diferenciación de dos cepas diferentes, CL-Brener y DM28c, de este patógeno. En ninguna de estas muestras fue posible detectar expresión de GspS utilizando anticuerpos anti-CfGspS que anteriormente mostramos que reaccionan en forma cruzada con la proteína homóloga de *T. cruzi* (Fig. 33A y 32, respectivamente). La figura que se muestra es representativa de seis ensayos independientes. A su vez, se decidió incluir en este estudio muestras de epimastigotas en fase exponencial y estacionaria, ya que para *E. coli* se ha reportado un incremento de la expresión de GspS en esta última etapa del crecimiento (Smith et al. 1995b).

La tinción de la membrana de *Western blot* con Ponceau-S muestra que la transferencia y separación de las proteínas de los extractos celulares fue buena (Fig 33B).

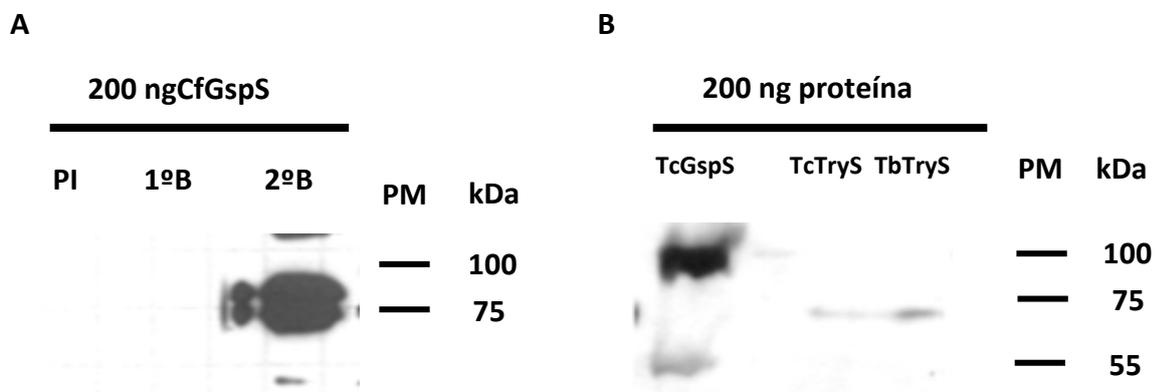


Figura 32. Evaluación de anticuerpos de ratón anti-CfGspS. (A) *Western-blot* de los sueros pre-inmunización (PI), primer y segundo refuerzo (1°B, 2°B) contra CfGspS recombinante. Solo se muestran los resultados para los sueros de uno de los dos ratones. Los sueros se ensayaron a una dilución 1/500 contra 200 ng de CfGspS recombinante. (B) *Western-blot* del pool de sueros del segundo refuerzo ensayado a una dilución 1/500 contra 200 ng de las formas recombinantes de TcGspS, TcTryS y TbTryS. PM: marcador de peso molecular. En todos los casos el tiempo de exposición y revelado fue de 20 minutos y 30 segundos, respectivamente.

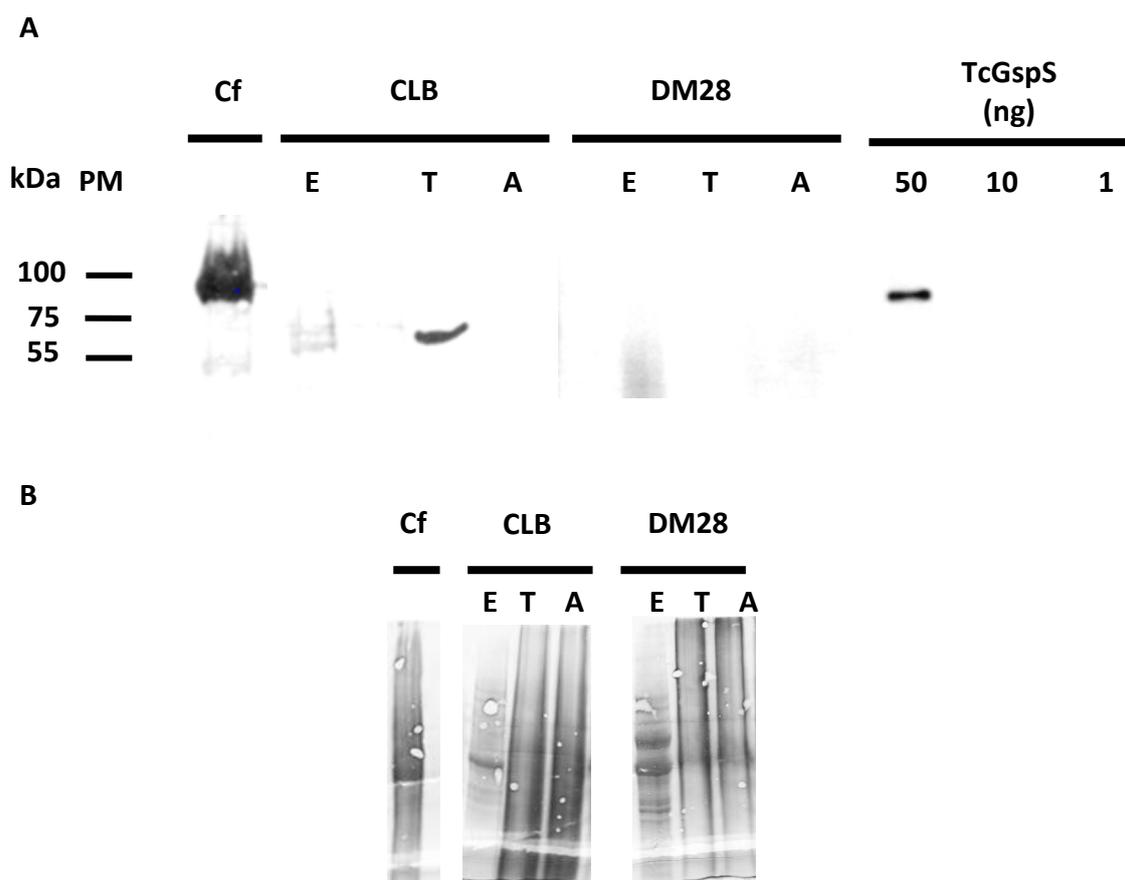


Figura 33. Evaluación de la expresión de GspS en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. (A) Ensayo de *Western blot* para la TcGspS recombinante a diferentes concentraciones (derecha) y para extractos de 5×10^7 , $2,6 \times 10^7$ y $1,3 \times 10^8$ parásitos/carril del estadio epimastigota (E), tripomastigota (T) y amastigota (A), respectivamente, de las cepas CL-Brener (CLB) y DM28c (DM28) (izquierda). Como control positivo, se incluyó una muestra de extracto soluble de 1×10^8 parásitos/carril de *C. fasciculata* (Cf). El anticuerpo policlonal de ratón anti-CfGspS se usó a una dilución de 1/500. (B) Como referencia de la carga y separación de las proteínas transferidas se empleó la tinción de membrana por Ponceau-S. PM: marcador de peso molecular.

Teniendo en cuenta la sensibilidad del anticuerpo anti-CfGspS (que permitió detectar 50 ng de la TcGspS recombinante), el peso molecular de la proteína, el número de parásitos analizados en cada caso y el volumen celular de cada estadio, pudimos estimar que bajo estas condiciones de ensayo seríamos incapaces de detectar la presencia de esta enzima si su concentración intracelular fuera inferior a 0,4, 2 y 0,5 μ M en epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas, respectivamente. Por otro lado, podría también ocurrir que esta proteína no fuera expresada por ninguno de los estadios del parásito.

Para comprobar cuál de estas dos hipótesis podría ser cierta, se recurrió a determinar la presencia del ARN mensajero de GspS en *T. cruzi* por técnica de RT-PCR. La ausencia de mensajero estaría indicando que el gen no se estaría expresando, por ejemplo, por algún tipo de regulación epigenética, mientras que su presencia nos podría llevar a dos conclusiones que son mutuamente excluyentes: i) la proteína se expresa por debajo de los niveles señalados anteriormente, o ii) la proteína no se expresa, posiblemente debido a algún mecanismo de regulación pos-transcripcional que desestabiliza el ARNm o impide su traducción, común en los tripanosomátidos (Clayton, 2013; Günzl, 2010).

La reacción de RT-PCR se realizó combinando un oligonucleótido sentido específico con un oligonucleótido poliT antisentido y ARN total de *T. cruzi* CL-Brener y DM28c purificado de epimastigotas en fase de crecimiento exponencial y estacionaria. Al combinar un oligonucleótido específico de la secuencia que se desea amplificar con un oligonucleótido poliT (que hibridará con la cola poliA de los ARNm), se asegura que

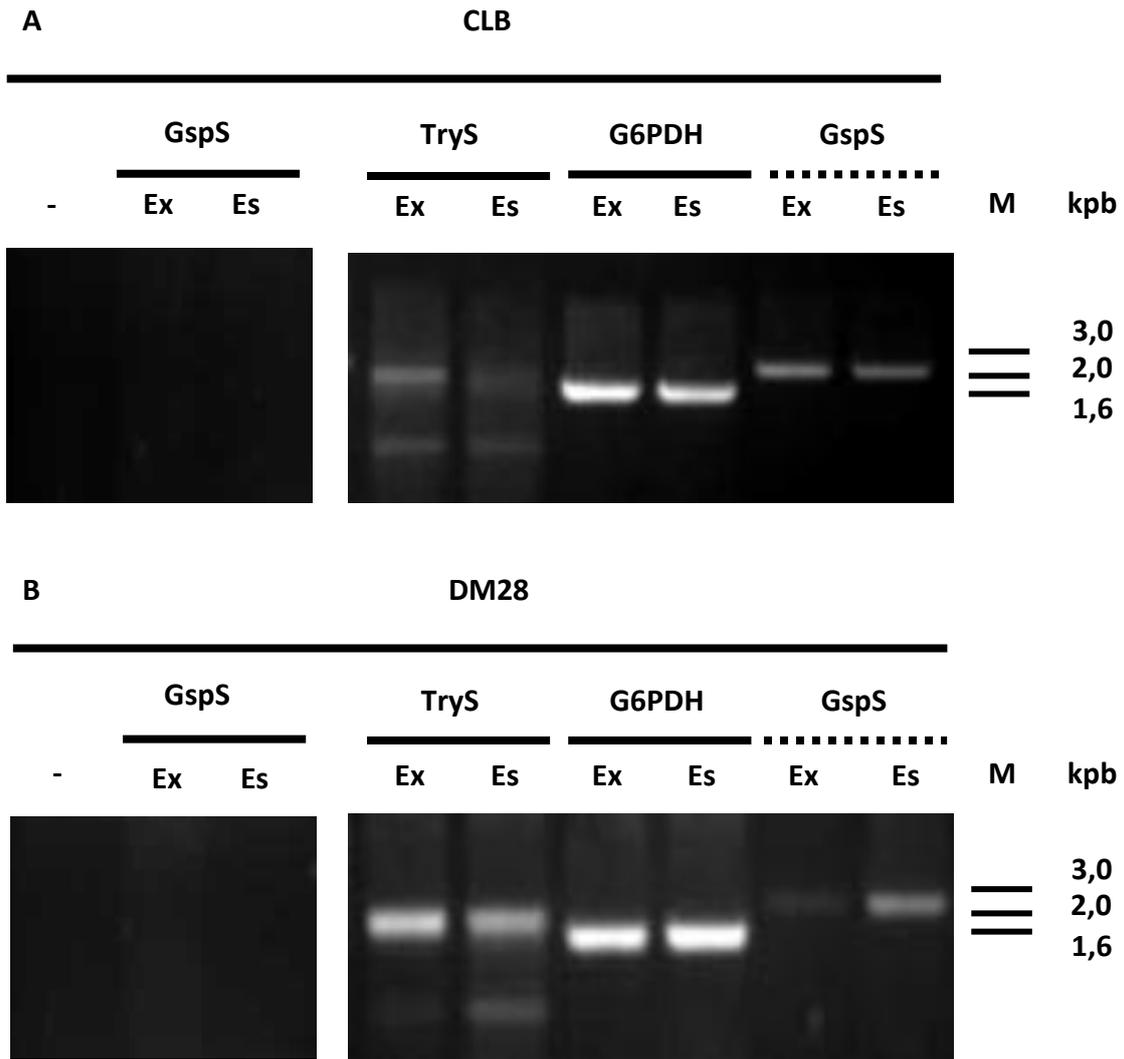


Figura 34. Evaluación de la presencia del ARNm de GspS en *T. cruzi*. RT-PCR para la detección de diferentes ARNm a partir de ARN total de epimastigotas de *T. cruzi* CL-Brener (CLB, A) y DM28c (DM28, B) en fase de crecimiento exponencial (Ex) o estacionaria (Es). Se cargaron 10 μ L/carril de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 1% teñido luego con BrEt. Las secuencias a amplificar corresponden a: TcGspS (2,1 kpb, GspS), y los controles positivos TcTryS (TryS, 1,9 kpb) y TcG6PDH (G6PDH, 1,5 kpb). Como control negativo, se realizó una reacción de PCR sin ADN (-). En paralelo, se realizó una PCR con ADN genómico con oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la TcGspS (línea punteada). M: marcador de tamaño molecular.

durante la amplificación únicamente se esté amplificando una secuencia específica de este mensajero y no un falso positivo por amplificación de la secuencia de dicho gen a partir del ADN genómico. El análisis de una muestra de esta reacción en un gel de agarosa al 1% mostró la ausencia de amplicones correspondientes al ARN mensajero de la TcGspS (banda de 2,1 kpb; Fig. 34). Como controles positivos se utilizó un

oligonucleótido específico sentido combinado con un oligonucleótido antisentido poliT para dos proteínas con función *house-keeping* y por lo tanto que se expresan activamente en este parásito, la TcTryS y la TcG6PDH. En ambos casos se obtuvo una banda específica del tamaño esperado (1,9 y 1,5 kpb respectivamente).

A partir de estos mismos parásitos también se extrajo ADN genómico, y con el mismo par de oligonucleótidos específicos de la secuencia codificante se logró amplificar el gen de la TcGspS. Esto demuestra que las condiciones de amplificación utilizadas permiten la correcta amplificación del gen de la TcGspS, que la muestra de ADNc no estaba contaminada con ADN genómico y que la ausencia de amplicon no se debe a un artefacto originado por una falla en la PCR.

De esta forma, se pudo confirmar que el gen de la TcGspS no se estaría transcribiendo en *T. cruzi* CL-Brener y DM28c, al menos en la forma epimastigota, respaldando así los resultados obtenidos anteriormente. Si bien es probable que una situación similar se de en los estadios infectivos, sería interesante evaluar si se encuentra ARNm para esta proteína en las formas tripomastigota y amastigota. Dada la gran cantidad de parásitos epimastigota necesarios para obtener un buen rendimiento de ARN total durante el proceso de extracción y las limitaciones asociadas a alcanzar *in vitro* títulos altos de los estadios infectivos, este experimento no fue llevado a cabo.

Las evidencias surgidas de este trabajo son respaldadas además por datos de análisis proteómico y transcriptómico de los distintos estadios de *T. cruzi* (TriTrypsDB, www.tritryps.org; Minning, 2009), que muestran que la TcGspS no se estaría expresando.

De todas formas, el conjunto de resultados obtenido para *T. cruzi* concuerda con lo observado por Souza y col. para la forma extra e intracelular de *L. infantum*, especie en la cual tampoco fue posible detectar expresión de LiGspS tanto a nivel de proteína como de ARN mensajero (Souza, 2014). Este hallazgo pondría a *T. cruzi* dentro de los kinetoplastidos que, posiblemente por redundancia funcional con la TryS, han bloqueado la expresión del gen de GspS. Dado que estas TryS evolucionaron para ser capaces de aceptar tanto GSH como Gsp como sustratos de reacción con igual

eficiencia, tiene sentido pensar que el parásito prescindiera de la GspS. Distinto es el caso de otros parásitos, como por ejemplo *C. fasciculata*, donde CfTryS posee un K_M por la espermidina 126 veces superior que la CfGspS y una relación k_{cat}/K_M para este sustrato que es dos órdenes de magnitud inferior al de esta última enzima (Comini, 2004). Por lo tanto, se ha propuesto que este organismo ha conservado la expresión de la GspS ya que esta enzima, especializada únicamente en catalizar la primera reacción de la ruta de biosíntesis del tripanotión, proveería a la CfTryS del intermediario de la síntesis de tripanotión (Gsp), sustrato por el cual, a diferencia de la espermidina, esta última tiene gran preferencia.

Sin embargo, llama la atención por qué el gen codificante para la GspS no ha sido aún eliminado del genoma de *T. cruzi*, aunque sea parcialmente, como ocurrió en *T. brucei*, *L. major* y *L. braziliensis*. De todas formas, al no existir evidencias de transcripción y/o traducción de esta secuencia en los diferentes estadios celulares de *T. cruzi* implica que el organismo incurre en un gasto energético mínimo en mantener la copia de este gen en cada ciclo de duplicación celular.

4.4. Localización subcelular de TryS en distintos estadios de *T. cruzi*

4.4.1. Inmunofluorescencias con anti-TbTryS en *T. cruzi* CL-Brener y DM28c.

El estudio de la localización subcelular de la TryS en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* se realizó por inmunofluorescencia indirecta. Todas las imágenes de inmunofluorescencia de los diferentes estadios de *T. cruzi* muestran una localización citosólica de la proteína, con una distribución predominantemente granular (Fig. 35). Esta imagen difiere de la observada para la TR, otra proteína citosólica, que presenta un patrón de distribución más homogéneo de tipo no granular (Fig. 64, anexo). Este mismo patrón de distribución fue observado para la TryS en *T. brucei* (Fiestas, Tesina de Grado). La señal verde correspondiente a la TbTryS (inmunodetección de la proteína con anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488) no estaría co-localizando ni con núcleo o kinetoplasto como se observa a la derecha en la imagen de superposición. Si bien esta distribución particular de la TryS puede tratarse de un artefacto de la técnica, no podemos descartar que la misma provenga de la asociación

de la proteína a gránulos citoplasmáticos (como por ejemplo poliribosomas), complejos proteicos supramoleculares o microvesículas.

Analizando los controles negativos, se observa que el anticuerpo secundario no presenta reactividad cruzada con ninguna macromolécula o estructura de los parásitos, ya que no se detecta señal fluorescente en ninguna de las líneas celulares y condiciones ensayadas (datos no mostrados), lo cual nos permite aseverar que la señal detectada proviene exclusivamente del anticuerpo primario.

Las inmunofluorescencias realizadas sobre el estadio amastigota con el anticuerpo anti-TryS revelaron una señal intensa y definida cercana a lo que sería el bolsillo flagelar (Fig. 35 y 36). El bolsillo flagelar es una gran invaginación de la membrana plasmática en la base donde se ubica el origen de la estructura del flagelo. Este sitio presenta un alto grado de especialización en procesos de endocitosis, secreción de proteínas al medio extracelular y adición/reciclado de proteínas integrales de membrana. En estos organismos, el bolsillo flagelar es la región subcelular donde tienen lugar estos procesos de manera casi exclusiva y altamente eficiente. El lumen del bolsillo flagelar se observa con material electrón denso y lleva proteínas específicas que son secretadas a dicho espacio (Landfear, 2001). Por otro lado, para las cepas CL-Brener y DM28c, si bien se obtiene un patrón similar de distribución subcelular para la TryS, la señal detectada es mucho menos intensa en la primera de ellas. Esto se condice con los menores niveles de TryS detectados en CL-Brener respecto de DM28c por ensayo de *Western blot* (sección 4.3.2).

Frente a esta novedosa localización subcelular de la TryS en la forma intracelular del parásito nos planteamos como hipótesis que la TryS, y por lo tanto T(SH)₂, podría estar cumpliendo un rol como amortiguador redox para neutralizar o regular el estado redox de las (macro)moléculas que son incorporadas desde o secretadas hacia el hospedero por el patógeno.

Los parásitos en cualquiera de sus tres estadios son capaces de incorporar poliaminas del medio extracelular a través de transportadores que contienen residuos tiólicos críticos para su actividad (Le Quesne, 1996). Dado que los amastigotas son una de las formas replicativas y necesariamente necesitarán de poliaminas para ello, una de las

posibles funciones de T(SH)₂ allí podría ser para mantener en estado reducido a los tioles del transportador, permitiendo así la entrada de poliaminas al interior celular. Con el fin de contar con mayores evidencias que permitan confirmar esta particular localización de la proteína en la forma intracelular del parásito, decidimos examinar los preparados por una técnica de microscopía de super-resolución como lo es la microscopía electrónica de transmisión (ver sección 4.4.2).

A

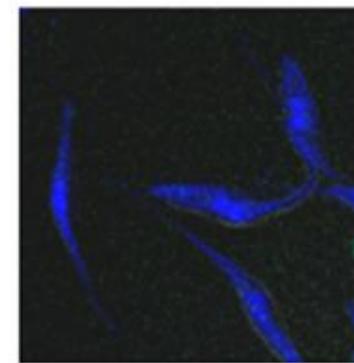
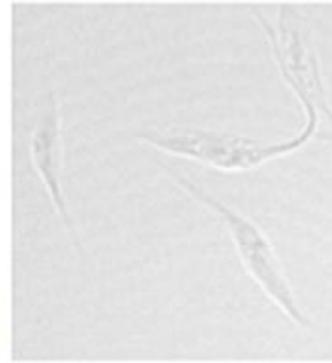
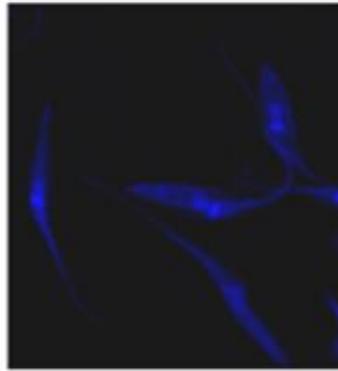
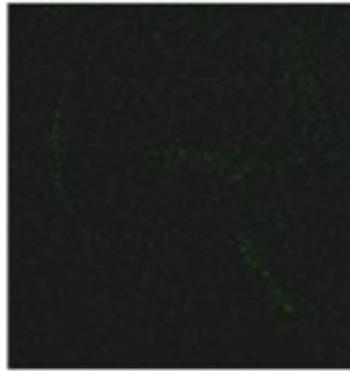
FITC

TOPRO

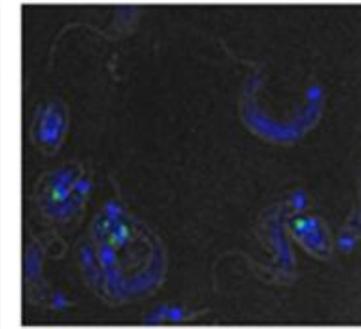
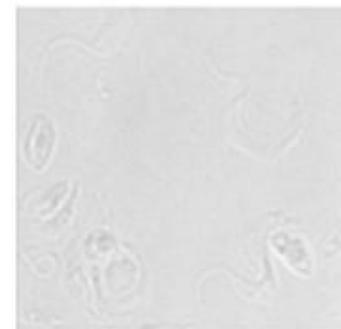
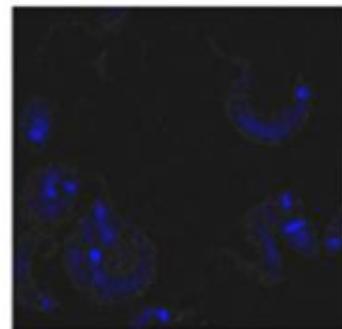
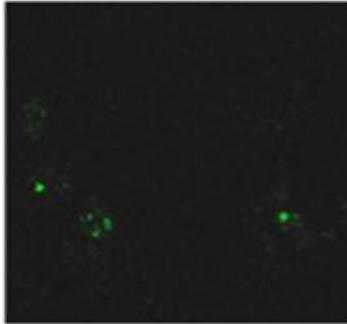
CC

Merge

Epimastigota



Tripomastigota



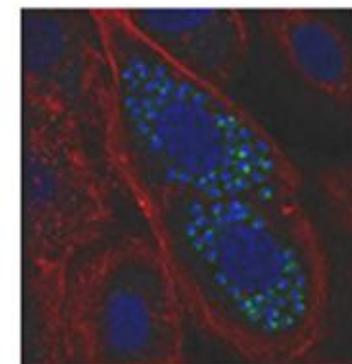
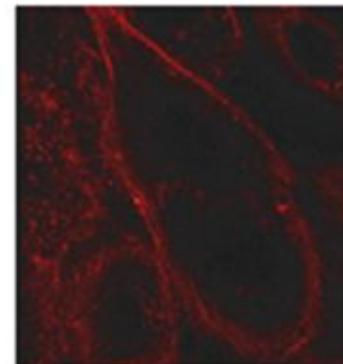
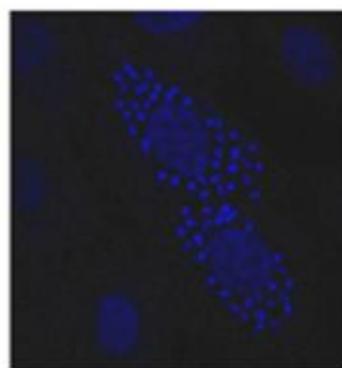
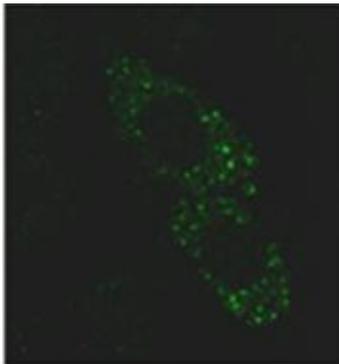
FITC

TOPRO

Faloidina

Merge

**Amastigota
+Vero**



B

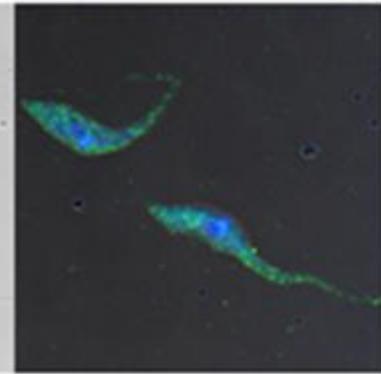
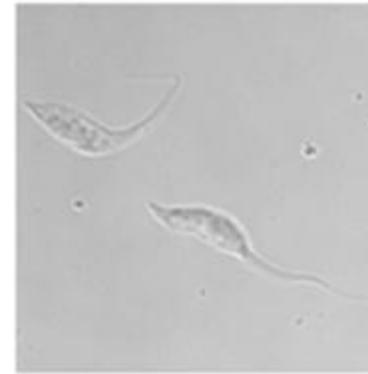
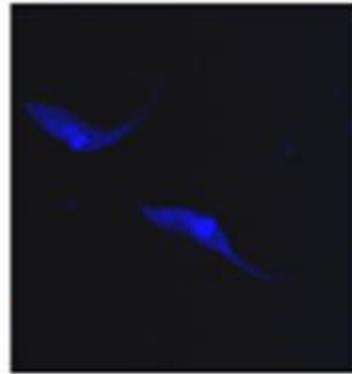
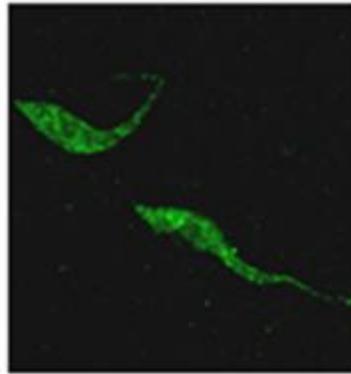
FITC

TOPRO

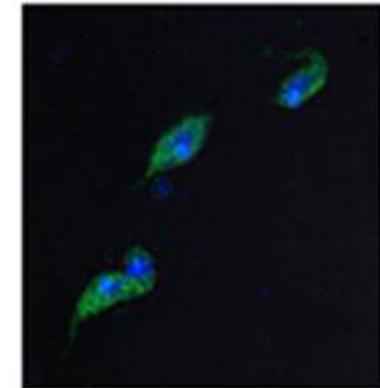
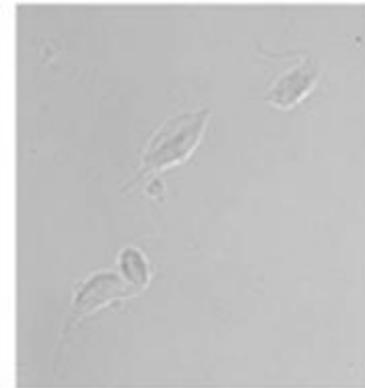
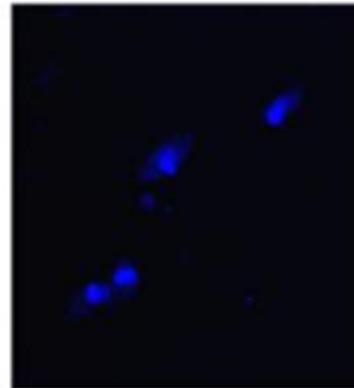
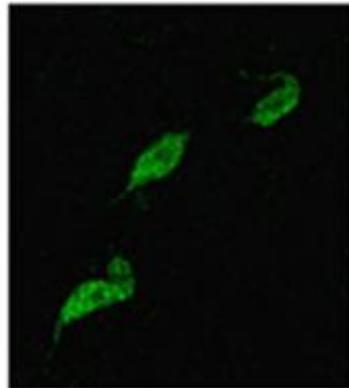
CC

Merge

Epimastigota



Tripomastigota



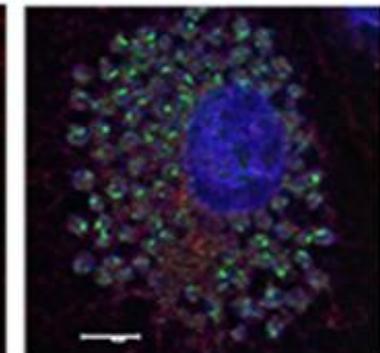
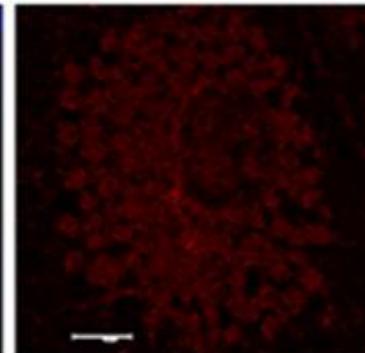
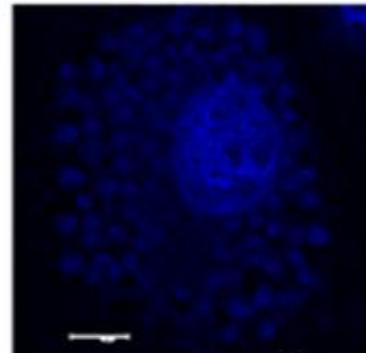
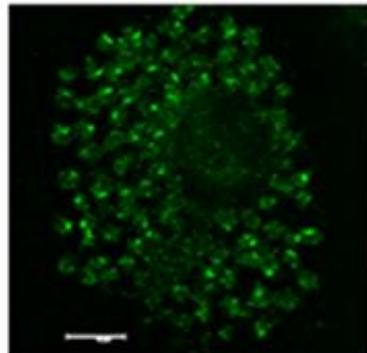
FITC

TOPRO

Faloidina

Merge

**Amastigota
+Vero**



C

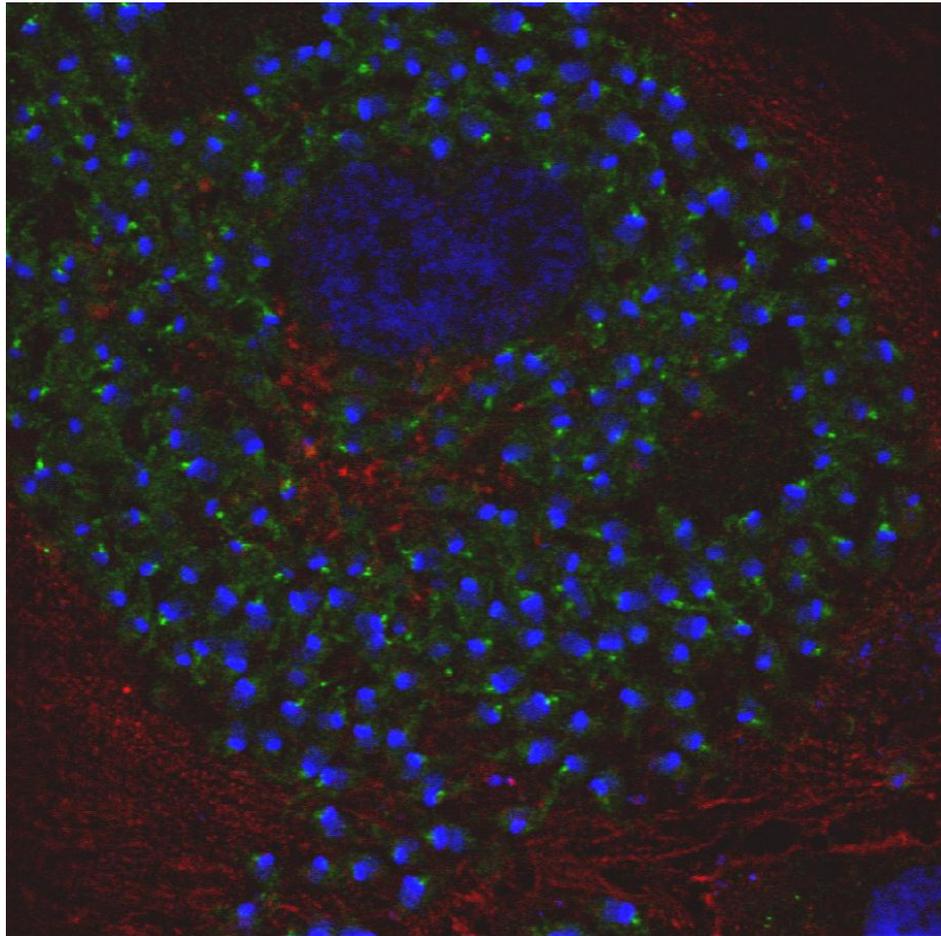
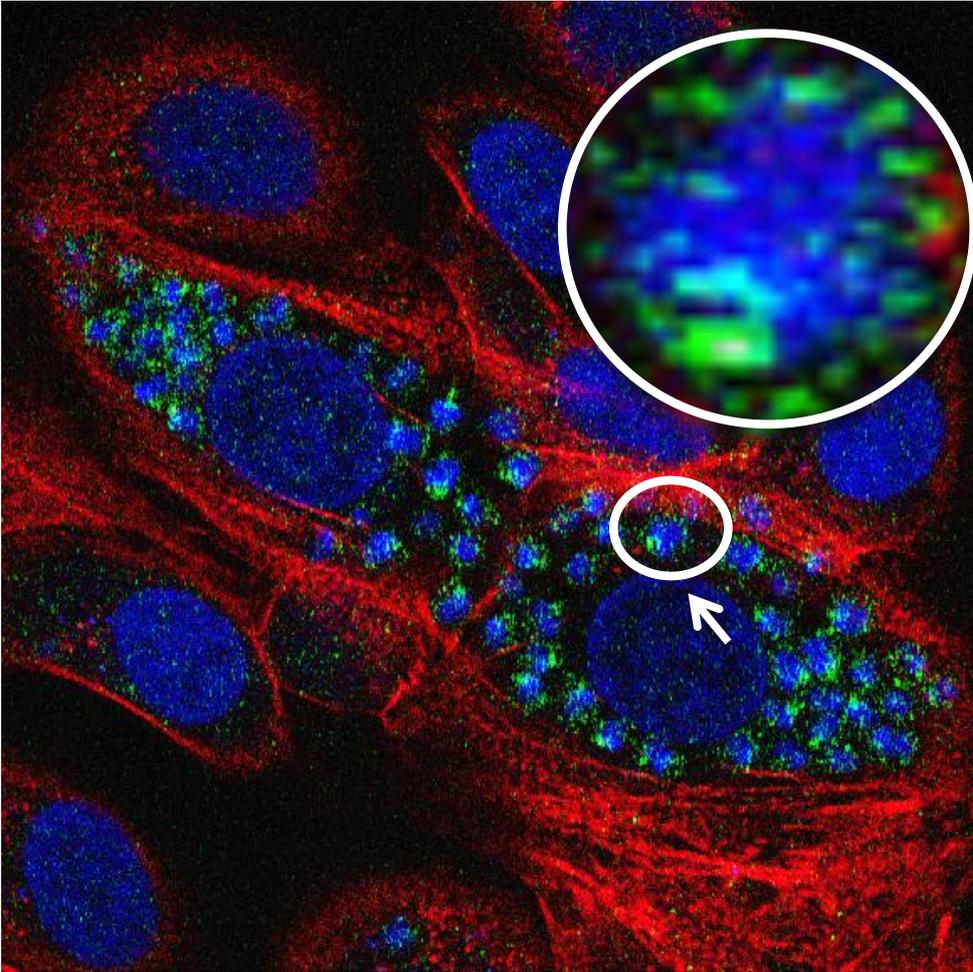


Figura 35. Localización subcelular de TryS en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* cepa DM28c y CL-Brener. Inmunofluorescencia indirecta sobre las formas epimastigota, tripomastigota y amastigota de *T. cruzi* CL-Brener (A) y DM28c (B) utilizando un suero de conejo purificado anti-*T. brucei* TryS y el anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Alexa 488 (verde, FITC). TOPRO (azul) y faloidina (rojo) marcan ADN y filamentos de actina, respectivamente. CC: campo claro y Merge: superposición de las imágenes de FITC, TOPRO y CC. Los amastigotas se encuentran dentro de las células Vero. (C) Imagen de una célula Vero infectada con amastigotas de *T. cruzi* CL-Brener.

A



B

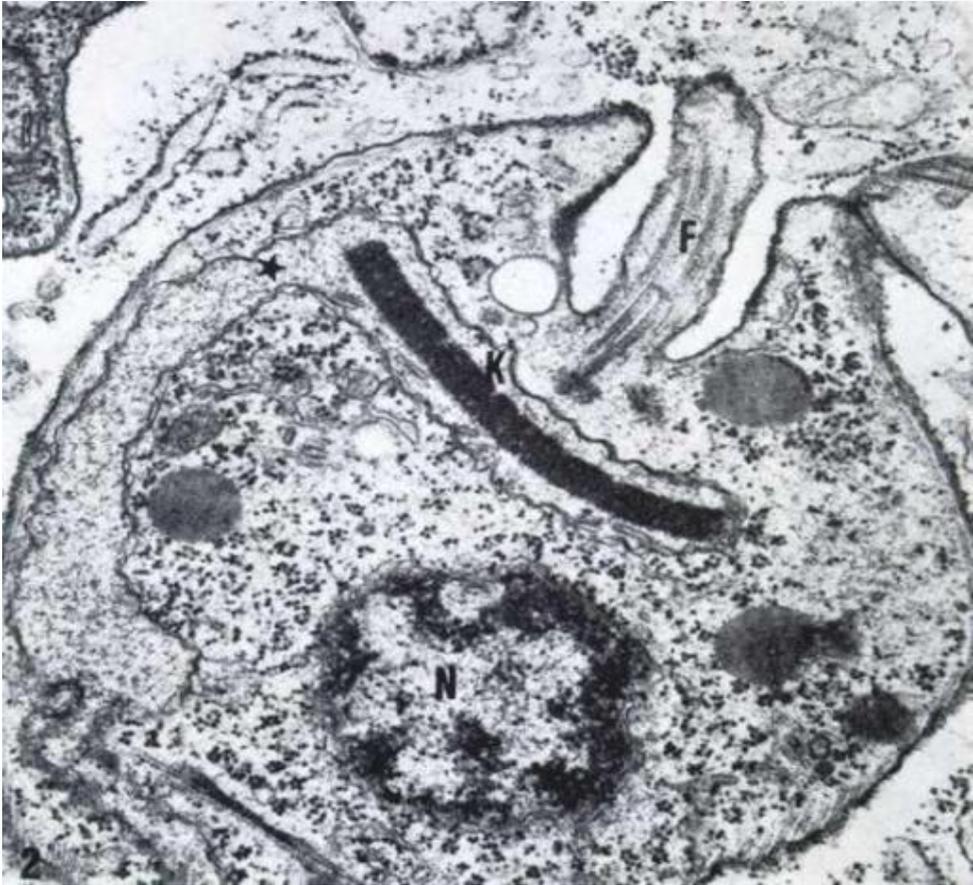


Figura 36. Localización subcelular de TryS en amastigotas de *T. cruzi* cepa CL-Brener. (A) Inmunofluorescencia indirecta sobre células Vero infectadas con amastigotas de *T. cruzi* CL-Brener utilizando un suero de conejo purificado anti-*T. brucei* TryS y el anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Alexa 488 (verde, FITC). TOPRO (azul) y faloidina (rojo) marcan ADN y filamentos de actina, respectivamente. En el recuadro de arriba se muestra la imagen ampliada digitalmente de la célula amastigota marcada con flecha. (B) Microscopía electrónica de la ultraestructura de un amastigota de la cepa DM28c (imagen tomada de De Souza, 2002).

4.4.2. Microscopías electrónicas de amastigotas.

Para confirmar la particular distribución intracelular de la TcTryS en la forma amastigota de *T. cruzi* de las cepas CL-Brener y DM28c, se decidió examinar los preparados por una técnica de microscopía de super-resolución. La localización subcelular de la enzima fue determinada por microscopía electrónica de transmisión, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-TbTryS y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con partículas de oro coloidal.

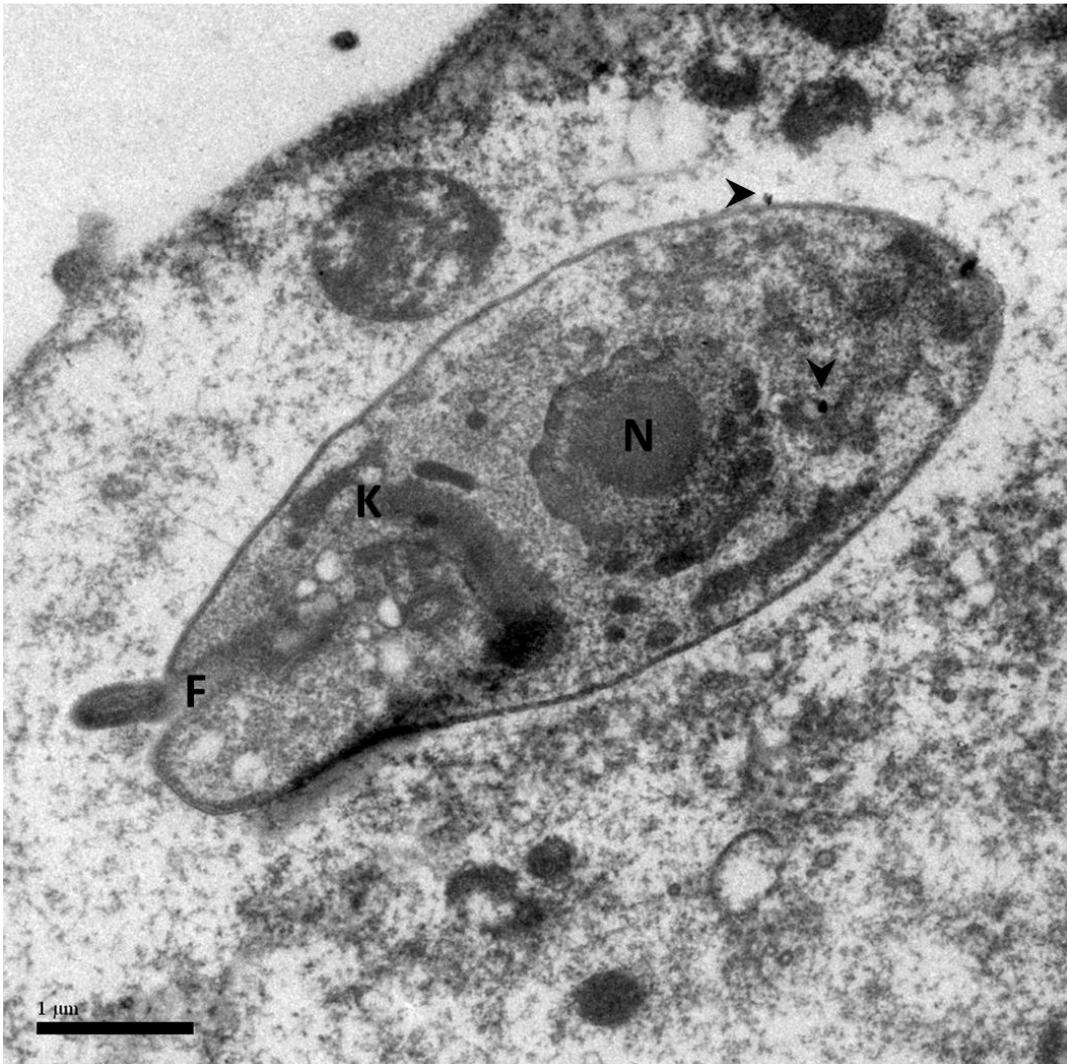
Tanto para amastigotas de la cepa CL-Brener como DM28c, el análisis de la ultraestructura muestra partículas de oro coloidal predominantemente en el cuerpo celular, y en menor medida en la región del bolsillo flagelar (Fig. 37, flecha negra y blanca, respectivamente), concordante con lo observado en las imágenes de la inmunofluorescencia obtenidas por microscopía confocal. También se observaron partículas de oro coloidal cercanas a la mitocondria y en la superficie celular externa. Por otro lado, no se observó marcación en los controles negativos (sin anticuerpo primario)(datos no mostrados).

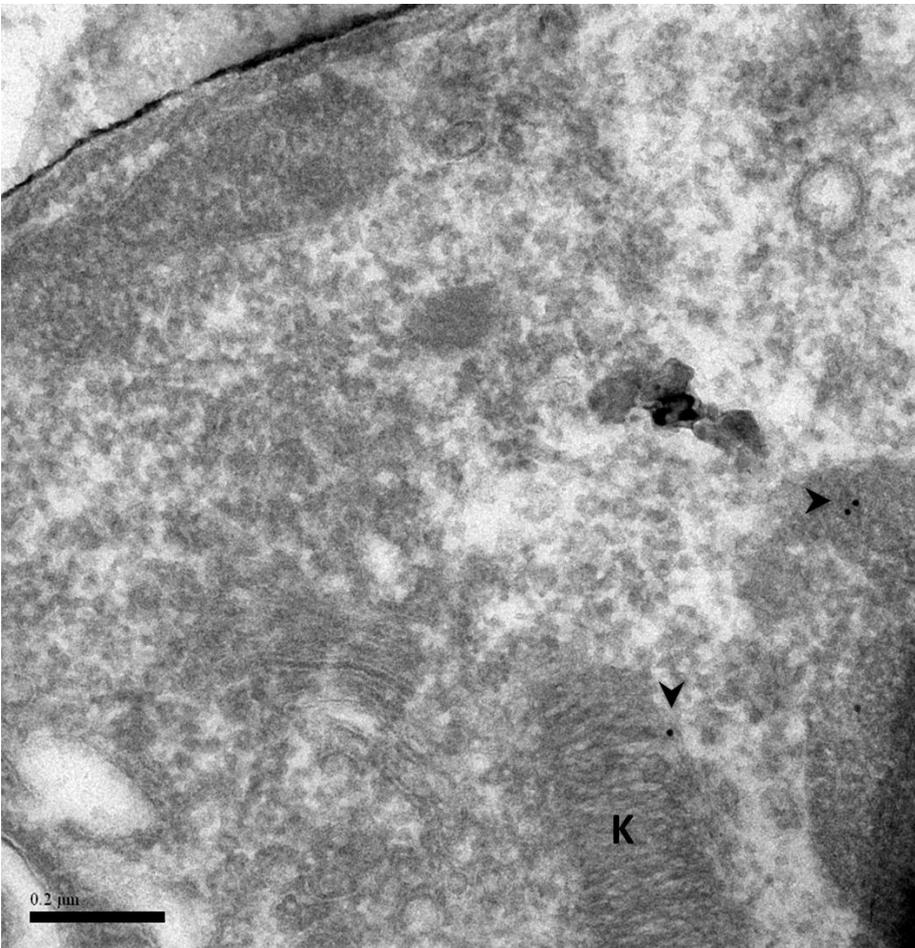
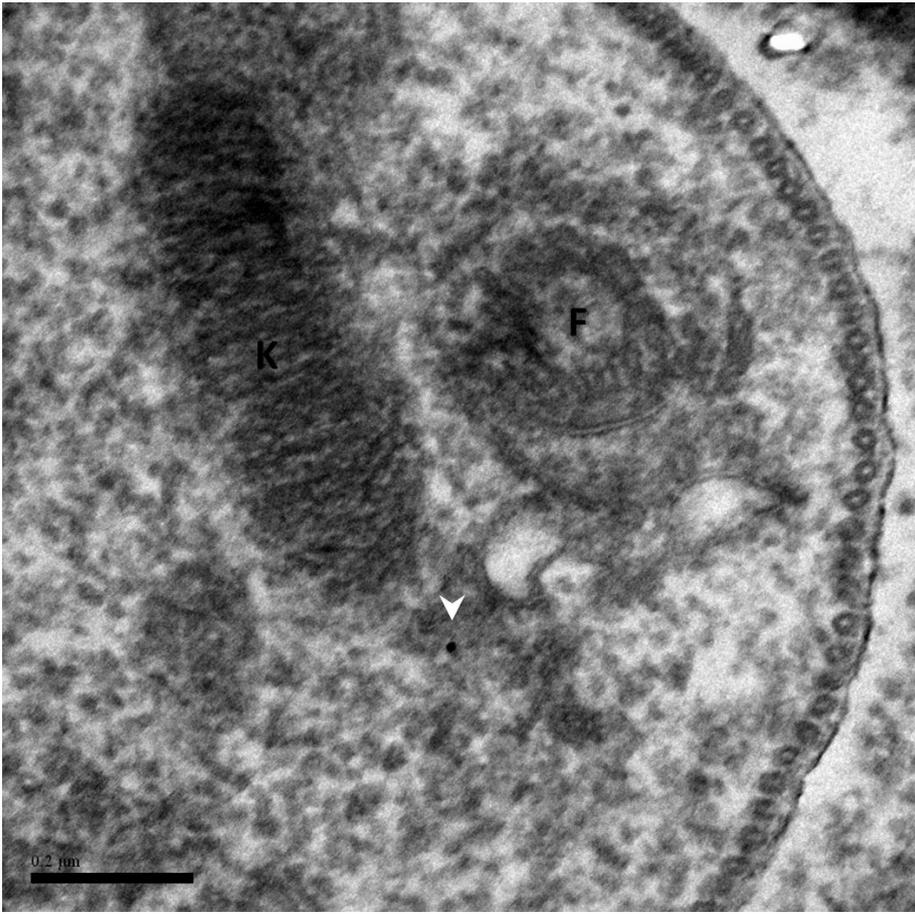
Es importante hacer notar que no fue posible obtener una señal significativa (medida como el número de partículas de oro coloidal totales por amastigota) para lo que se esperaba dada la elevada concentración aparente de esta proteína en determinadas zonas del parásito. Por este motivo, sería precipitado sacar conclusiones definitivas sobre si realmente TryS se encuentra ubicada en el bolsillo flagelar.

Una de las razones por las que la inmunomarcación pudo haber dado una señal baja es el hecho de haber utilizado el anticuerpo policlonal anti-TryS en conejo, el cual, como se comentó anteriormente (sección 4.3.1), presentaba títulos bajos que comprometían su sensibilidad. Como recientemente hemos producido el nuevo suero anti-TryS en

ratón con títulos elevados, el mismo fue enviado a nuestros colaboradores con el fin de repetir estos experimentos. Actualmente, nos encontramos a la espera de dichos resultados.

A





B

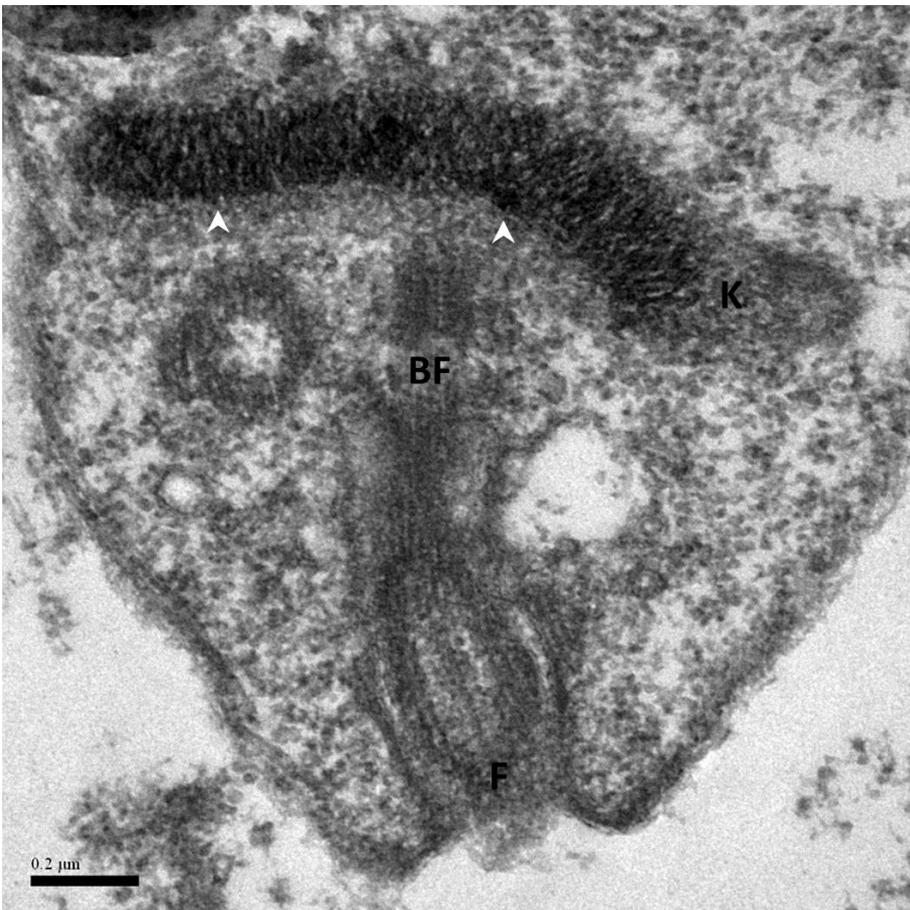
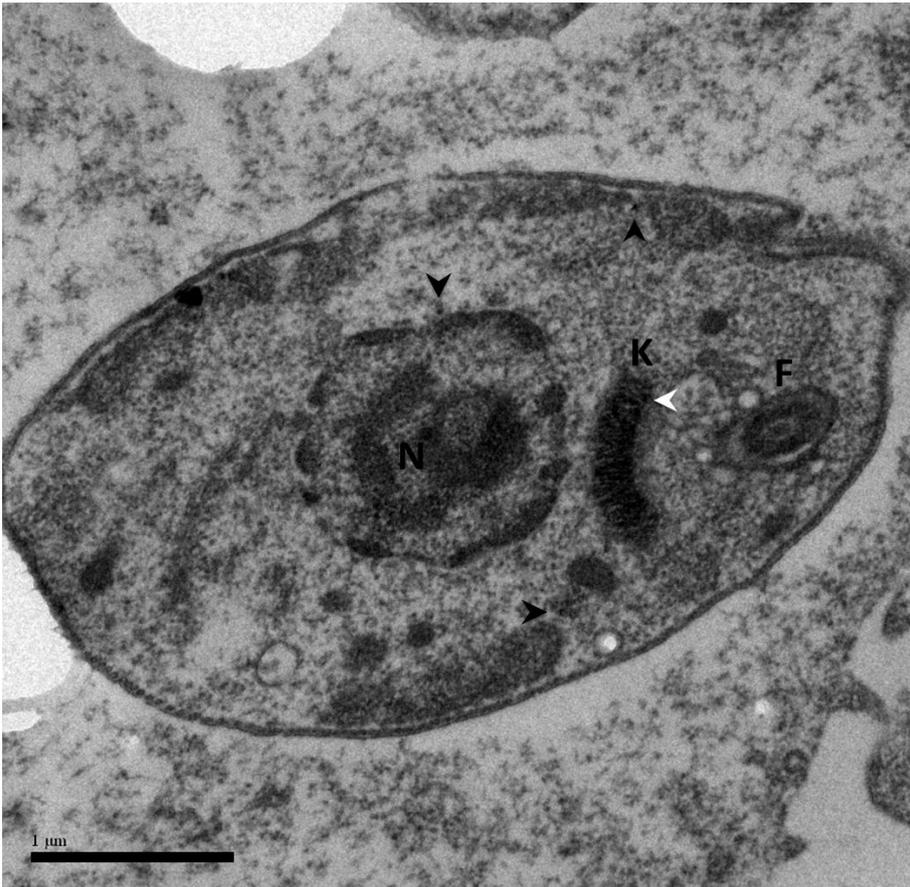


Figura 37. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión para amastigotas de *T. cruzi* Imágenes sobre células Vero infectadas con amastigotas de *T. cruzi* CL-Brener (A) o DM28c (B) utilizando un suero de conejo purificado anti-*T. brucei* TryS y el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a partículas de oro coloidal. Las flechas negras o blancas indican la detección de partículas de oro coloidal, según estas se ubiquen en citosol o próximas al bolsillo flagelar, respectivamente. N, núcleo; K, kinetoplasto; F, flagelo; BF, bolsillo flagelar.

4.5. Estudio de virulencia de *T. cruzi* CL-Brener y Dm28c

Varios trabajos señalan a distintos componentes del metabolismo redox de *T. cruzi*, entre ellos a la TryS, como factores asociados a la virulencia de diversas cepas de este patógeno (Alvarez, 2011; Irigoín, 2008; Piacenza, 2008, 2009, 2013; Piñeyro, 2011). En la sección 4.3.2 se mostró que el contenido de TryS en los estadios infectivos tripomastigotas y amastigotas de la cepa Dm28c es 1,3 y 2,4 veces superior, respectivamente, si se compara con la cepa CL-Brener.

Por lo tanto, con el fin de obtener una aproximación inicial a una posible conexión entre niveles de TryS y virulencia, decidimos investigar la capacidad infectiva de estas dos cepas de *T. cruzi* empleando un modelo celular de infección.

Las infecciones se realizaron en células Vero tal como se describió en la sección 3.6.1.1, con un mínimo de cinco experimentos independientes. Previo a cada infección, se tomó una alícuota de los parásitos para determinar el número de tripomastigotas en cada infección. Para cuantificar las infecciones, se seleccionaron sistemáticamente tres regiones diferentes al azar de cada pocillo y el recuento del número de células infectadas (calculado como el número de células infectadas / número de células totales) en tres campos dentro de cada una de las regiones se realizó por microscopia.

Para la cepa Dm28c, en promedio, a partir de las 72 hs se comenzaron a observar células infectadas, mientras que para la cepa CL-Brener esto ocurrió unas 24hs posteriores (96 hs). Por el contrario, a ese tiempo ya se comenzaba a observar la lisis de las células infectadas con Dm28c y la liberación de tripomastigotas al medio extracelular.

El porcentaje de células infectadas por *T. cruzi* CL-Brener y Dm28c a las 96 hs fue de $9,2 \pm 2,8$ y de 50 ± 12 %, respectivamente (Fig. 38). A pesar de estas marcadas diferencias en lo que respecta al establecimiento de la infección o invasión, tanto la amastigogénesis (diferenciación de tripomastigota a amastigota) como la tasa de replicación de los amastigotas no mostró diferencia entre ambas cepas, alcanzándose en ambos casos un número similar de amastigotas en las células infectadas. En su conjunto, estas observaciones nos llevan a proponer que la cepa Dm28c presenta una mayor capacidad invasiva y no infectiva que la cepa CL-Brener.

Sin embargo, aún no es posible concluir que esta característica de la cepa Dm28c tenga relación directa con el mayor contenido de TryS que presentan los estadios infectivos, cuando este se compara con el detectado en la cepa CL-Brener. En ese sentido debe tenerse en cuenta que el atributo de virulencia es una característica multifactorial determinada por varios componentes moleculares y estructurales del patógeno (por ej. glicoproteínas de superficie, trans-sialidasa, cruzipaina; (Souza, 2010). Dado que el proteoma de las cepas aquí comparadas difiere entre sí (Fig. 39) es muy probable que sean otras las moléculas que estén determinando esta mayor capacidad invasiva de la cepa Dm28c. Ambas cepas presentan un perfil similar en cuanto a la abundancia de proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y lípidos. Sin embargo, se han encontrado unas 50 y 92 proteínas reguladas a la alta y baja, respectivamente, de manera diferencial para esta cepa, así como 90 proteínas únicas de la cepa Dm28c (Fig. 39) (Galdino, 2014).

A pesar de estas conjeturas, no podemos descartar que la TryS (y tripanotión) tenga un rol importante para favorecer la colonización de macrófagos aportando poder reductor para contrarrestar el ataque oxidativo de estas células del sistema inmune (Alvarez, 2011; Piacenza, 2009).

Para independizarnos del trasfondo proteómico de estas dos cepas y poder indagar acerca del rol de TryS en el proceso de invasión, llevamos a cabo estudios de infectividad con la cepa CL-Brener salvaje o sobrepresante de TbTryS los cuales se abordan más adelante (ver sección 4.7).

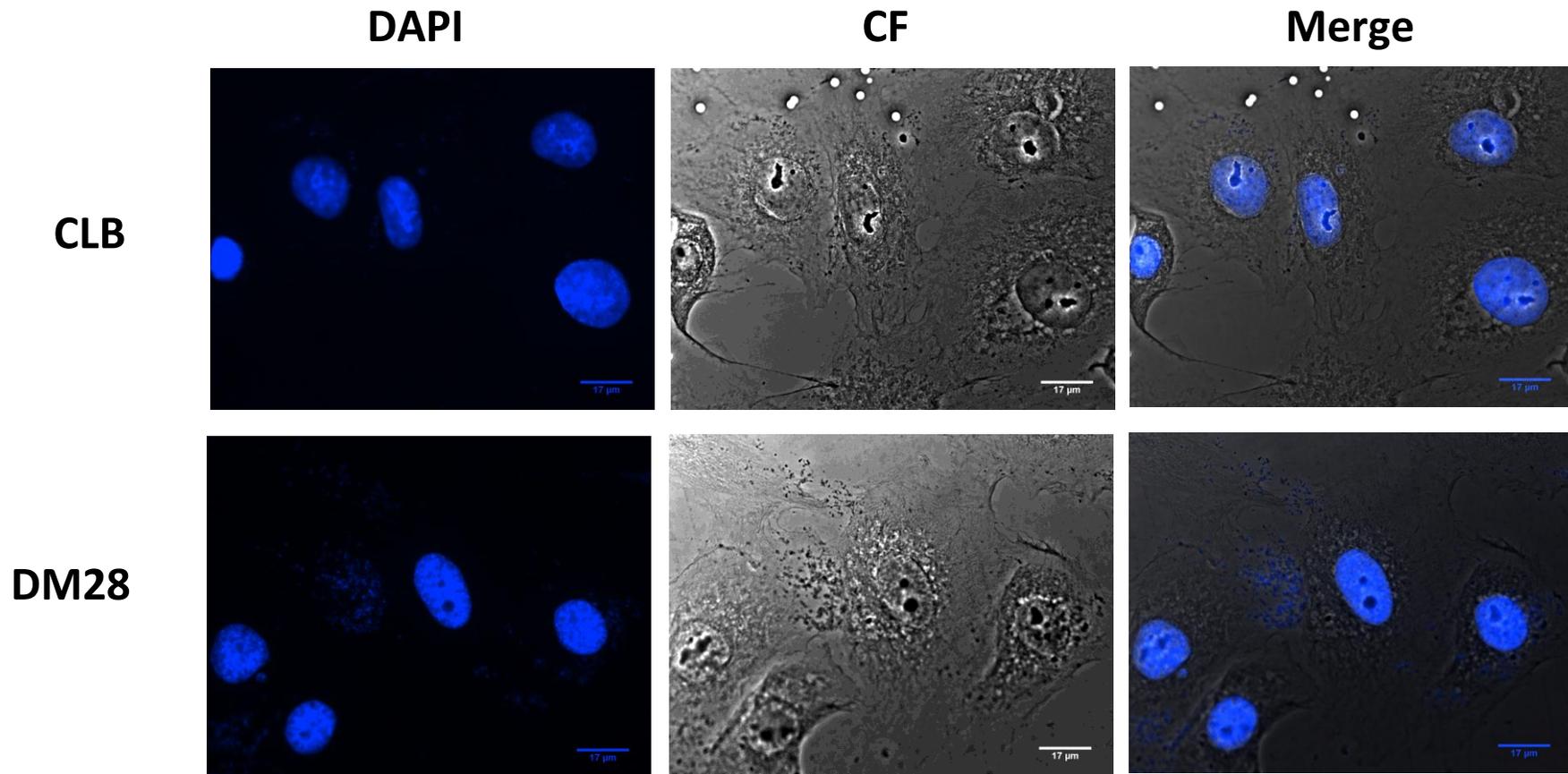


Figura 38. Infección de células Vero por *T. cruzi* cepas CL-Brener y Dm28c. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células Vero infectadas con *T. cruzi* cepa CL-Brener (CLB, panel superior) y DM28c (DM28, panel inferior) a las 96 horas post-infección. DAPI: tinción de ADN de las células y parásitos, CF: contraste de fase y Merge: superposición de las imágenes de DAPI y CF.

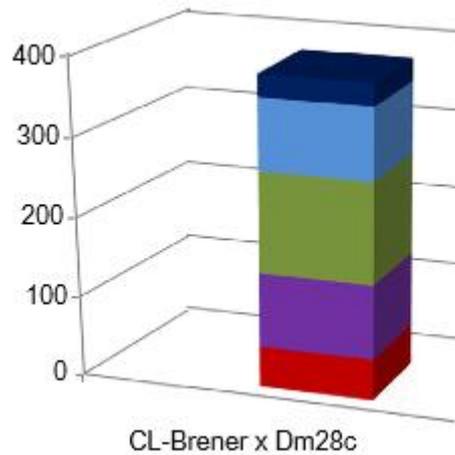


Figura 39. Análisis proteómico comparativo de la expresión de proteínas en diferentes cepas de *T. cruzi*. Se utilizó a la cepa CL-Brener como referencia y a Dm28c como la cepa problema. En azul oscuro se muestran las proteínas que no modificaron sus niveles de expresión (30). En azul claro y en verde se muestra el número de proteínas únicas de la cepa Dm28c (94) y CL-Brener (126) respectivamente. En violeta y rojo se indica el número de proteínas reguladas a la baja (92) y alta (50), respectivamente, en la cepa Dm28c. Tomada y adaptada de Galdino, 2014.

4.6 Generación de knock-out clásico/condicional para TcTryS en *T. cruzi*

Se planteó realizar la validación genética de la esencialidad de TcTryS en *T. cruzi*. A diferencia de los tripanosomas africanos (Bellofatto, 2008), *T. cruzi* es refractario al silenciamiento postranscripcional de genes mediado por ARN doble cadena (ARNi) (Barrett, 2004), lo cual imposibilita la aplicación de esta técnica para realizar estudios funcionales de genes. En su lugar se recurre a la eliminación de las secuencias codificantes de los genes blancos mediante técnicas clásicas de recombinación homóloga que pueden o no incluir la co-expresión regulada de un gen complementario de la misma u otra especie (*knock out* condicional o clásico, respectivamente).

El gen ha ser objeto de estudio se elimina por recombinación homóloga, utilizando un casete de ADN que transporta un gen de resistencia a un antibiótico, marcador de selección, flanqueado por secuencias de las regiones no traducidas (UTRs) del gen diana.

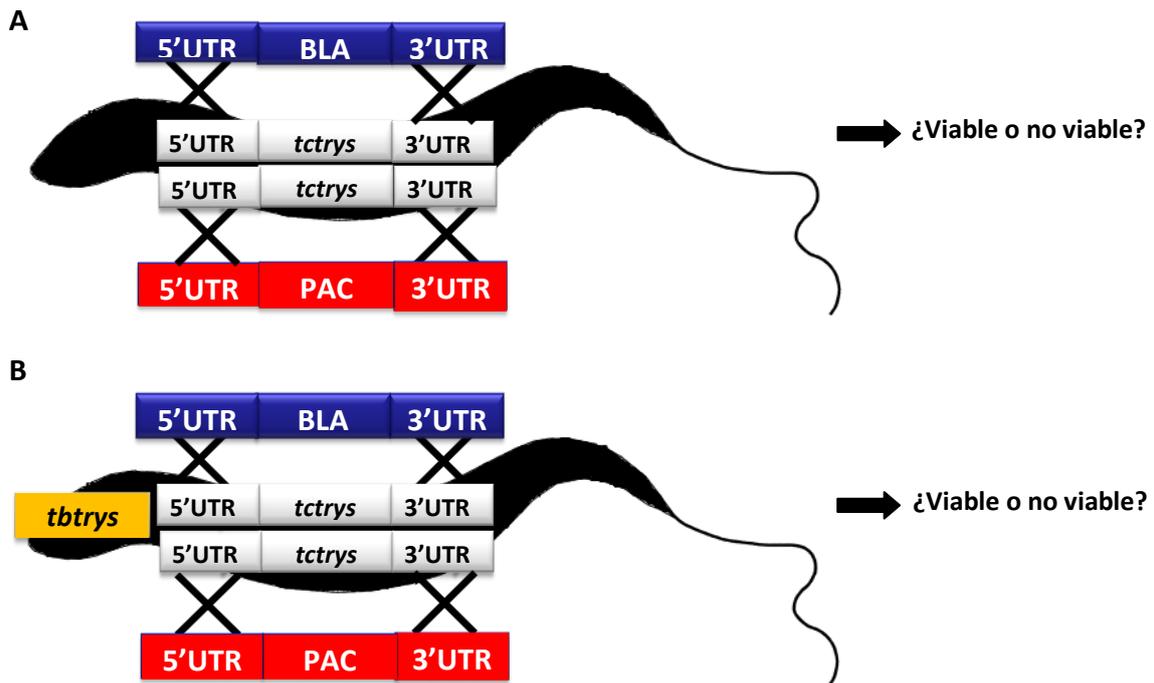


Figura 40. Esquema de la estrategia de *knock-out* de TryS en *T. cruzi*. (A) Esquema de la estrategia de *knock-out* clásico donde ambos alelos del gen para TcTryS se eliminan por recombinación homóloga, utilizando un casete de ADN que presenta un gen de resistencia a los antibióticos blasticidina (BLA) o puromicina (PAC) como marcador flanqueado por secuencias de las regiones no traducidas (UTRs) del gen blanco (*tctrys*). (B) Esquema de la estrategia de *knock-out* condicional, donde además de lo ya mencionado, previo a iniciar el reemplazo alélico se debe introducir una copia ectópica e inducible del gen de la TbTryS.

Aunque es una técnica robusta, si para su construcción se aplican métodos estándares de biología molecular esta termina resultando laboriosa ya que requiere la identificación de múltiples sitios de restricción compatibles para las ligaciones y linealización de los vectores, e involucra una gran cantidad de pasos de reacciones de digestión, ligación y clonados. Por otro lado, la obtención de parásitos *knock-outs* es un proceso sumamente tedioso que puede insumir meses y cuyo resultado final es de difícil pronóstico (Chung, 1994; Gillespie, 1993; Wirtz, 1999). A la fecha, se han reportado únicamente 10 *knock-outs* exitosos en *T. cruzi* (Xu, 2009).

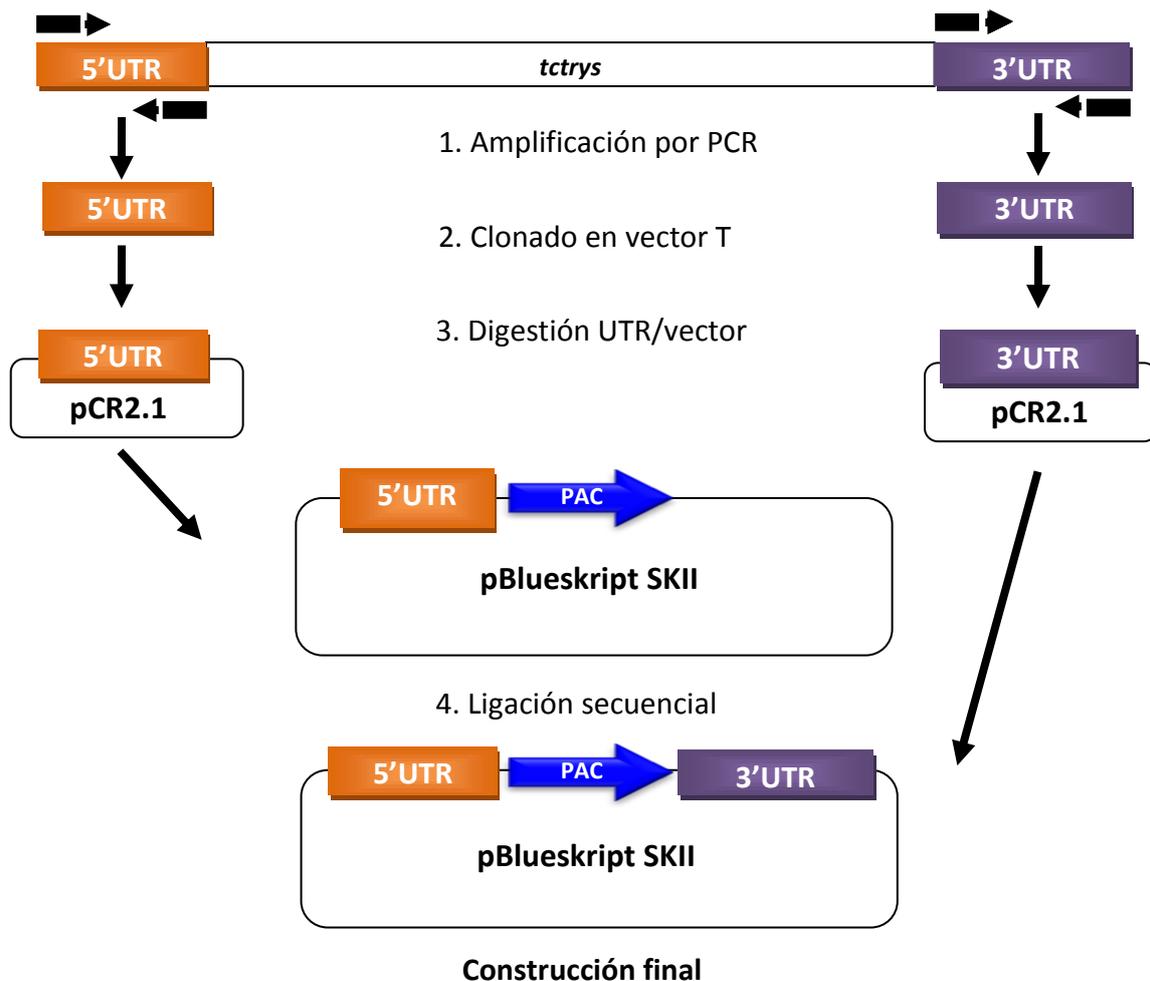


Figura 41. Esquema de la construcción de vectores para reemplazo alélico de *trys* en *T. cruzi*. La estrategia para la generación de los cassetes para el reemplazo alélico de las secuencias genómicas de *trys* consiste de tres pasos: 1) PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar los 5' y 3' UTR a partir del ADN genómico de *T. cruzi* CL-Brener; 2) clonado de los amplicones en un vector comercial T, pCR2.1; 3) inserción secuencial de las secuencias 5' y 3' UTR de cada uno de los alelos de *tcrysts* de manera que flanquean a los genes de resistencia a antibióticos (BLA, blasticina y PAC, puromicina) presentes en los vectores pBlueskript SKII+.

Es importante recalcar que dado que el gen de la TcTryS es de copia única se puede utilizar la estrategia de *knock out*. La presencia en ambos alelos de secuencias UTRs diferentes nos obligó a realizar construcciones de ADN individuales para dirigir la recombinación hacia cada uno de ellos. Con los antecedentes previos de indispensabilidad reportados para el gen de TryS en *T. brucei* (Ariyanayagam, 2005; Comini, 2004), al inicio de este trabajo sospechamos que en *T. cruzi* podría darse un escenario similar. En el transcurso de este proyecto esta suposición se vería respaldada

por la ausencia de expresión de TcGspS (sección 3.4.3) y estudios de validación genética de TryS en *L. infantum* publicados recientemente (Sousa, 2014). De enfrentarnos a esta situación, la estrategia de *knock-out* clásico sería incompatible con la obtención de transfectantes homocigotas viables, lo cual si bien nos permitiría validar a la enzima como un componente esencial de este organismo, por otro lado nos impediría abordar estudios biológicos más detallados. Por ello, optamos por aplicar una estrategia de *knock out* condicional donde en primera instancia se genera un sobreexpresante inducible de una copia ectópica del gen de la TryS de un organismo homólogo, *T. brucei*, y luego sobre esta línea celular y en condiciones de inducción se procede a forzar la recombinación homóloga en los locus genómicos correspondientes de manera de eliminar ambas copias de la *trys* endógena. De tener éxito esta estrategia permitiría estudiar el fenotipo resultante bajo condiciones reguladas de expresión de TryS.

En la Fig. 40 y 41 se esquematiza la aproximación y el procedimiento seguido, respectivamente.

4.6.1. Generación de las construcciones pBSK-UTRs

Según información disponible en la base de datos, los 5' UTRs del *tctrys* del alelo 1 y 2 presentan un tamaño de 720 y 690 pb, mientras que los 3'UTRs tienen un tamaño de 2170 y 826 pb, respectivamente (TriTrypS DB - El-Sayed, 2005).

Las cuatro secuencias correspondientes a las 5' y 3' UTRs del gen de la TcTryS pudieron ser aisladas a partir del ADN genómico de la cepa CL-Brener de *T. cruzi* y subsecuentemente clonadas en el vector T comercial pCR2.1 (Fig. 42). Los resultados de secuenciación confirmaron la identidad de las secuencias aisladas así como la ausencia de mutaciones.

Si bien los resultados de acondicionamiento (digestión con enzimas de restricción; sección 3.2.4) de las secuencias UTRs y el vector pBluescript fueron exitosos (Fig. 42 y no mostrado, respectivamente) y permitieron proceder con la ligación de insertos al vector, fuimos incapaces de recuperar clones positivos.

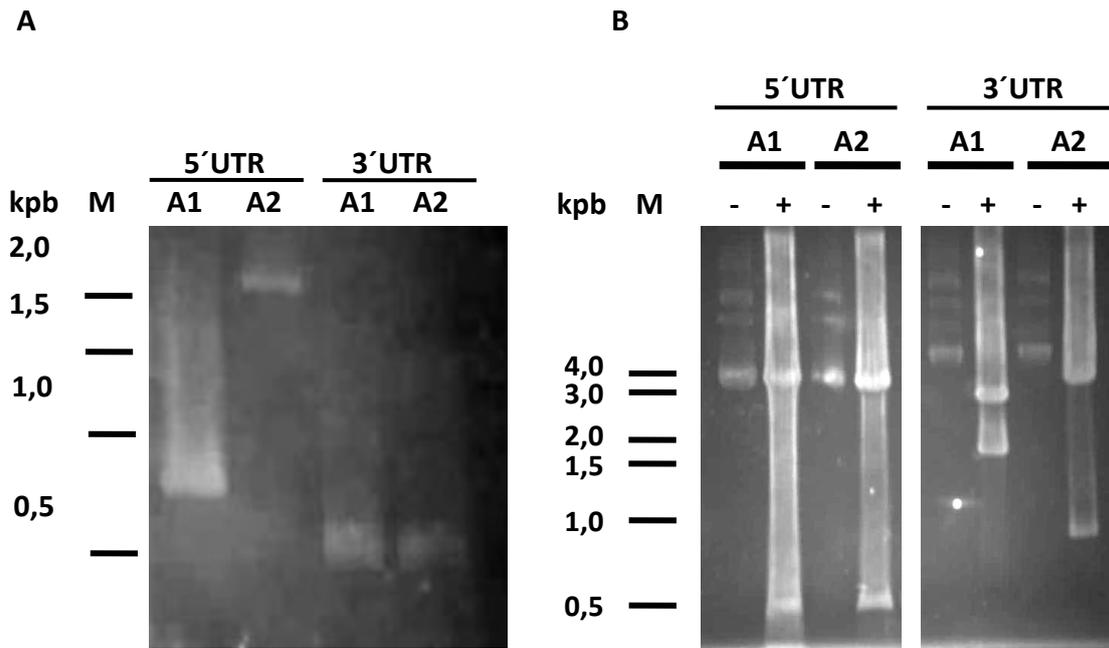


Figura 42. Amplificación y clonado de las regiones no traducidas (UTRs) del gen *trys* de *T. cruzi*. Geles de agarosa 1% p/v teñidos con BrEt donde se visualiza: (A) 10 μ L de la amplificación por PCR de las secuencias UTR para cada alelo (A1 y A2) del gen *tctrys* de la cepa CL-Brener de *T. cruzi*. Se utilizaron oligonucleótidos específicos que agregaron sitios de restricción en sus extremos para las enzimas *SacI/BamHI* o *HindIII/XhoI* para los 5' o 3' UTRs, respectivamente. Los tamaños moleculares esperados eran de: 720, 690, 2170 y 826 pb para el 5'UTR alelo 1 (5'A1), 5'UTR alelo 2 (5'A2), 3'UTR alelo 1 (3'A1) y 3'UTR alelo 2 (3'A2), respectivamente; (B) Plásmidos conteniendo los UTRs y digeridos (+) o no (-) con las correspondientes enzimas de restricción (*SacI/BamHI* para los 5' UTRs o *HindIII/XhoI* para los 3' UTRs). MPM: marcador de tamaño molecular.

Esto podría deberse a la generación de rearrreglos entre secuencias del vector e inserto, incluyendo la formación de estructuras secundarias entre inserto y plásmido que impedirían el correcto alineamiento de las secuencias para facilitar la ligación de sus extremos 5' y 3'.

Si bien este era un objetivo crítico para poder demostrar por herramientas de genética reversa que el gen de la TryS es esencial para *T. cruzi*, las evidencias surgidas de este trabajo, respaldadas además por datos de análisis proteómico y transcriptómico de los distintos estadios de *T. cruzi* (TriTrypsDB - www.tritryps.org; (Minning, 2009) que muestran que la TcGspS no se estaría expresando, refuerzan la hipótesis que la TcTryS seguramente sea indispensable para el parásito.

En un futuro, sería interesante probar técnicas de biología molecular novedosas, de menor complejidad y costo, y de mayor eficiencia para la inserción de secuencias en vectores, como lo son la tecnología de recombinación homóloga (Multisite Gateway, (Xu, 2009)) y el clonado libre de enzimas de restricción (van den Ent, 2006)).

4.6.2. Generación de la construcción pTcINDEX-TbTryS

En paralelo a la construcción de los vectores para el reemplazo alélico, tal como fue explicado anteriormente, se trabajó en la construcción de un vector para la sobreexpresión de una copia ectópica del gen de la TryS de *T. brucei*.

La secuencia codificante para TbTryS (AAO00721.1,(Comini, 2003) se amplificó con oligonucleótidos específicos que incorporan sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Eco*RV, tal como se detalla en la sección 3.2.3. (Fig 43A). La identidad de la secuencia clonada, su correcta inserción y ausencia de mutaciones fue confirmada mediante secuenciación.

Como ya fue mencionado anteriormente en la sección 4.2.2, es importante remarcar que se trabajó con una TbTryS con algunas mutaciones respecto a la forma salvaje. Estas mutaciones afectan de tal manera la afinidad de la enzima por sustratos (GSH, Sp y ATP) y producto (ADP; Fiestas Tesina de Grado; Benítez, Fiestas y col, en preparación) que esta última exhibe un comportamiento cinético más próximo al de la proteína homóloga de *T. cruzi* (Oza, Tetaud, et al. 2002b) y marcadamente diferente de su versión salvaje (Ariyanayagam, 2005). Una diferencia destacada entre la TbTryS salvaje y la TbTryS mutada es la marcada sensibilidad de la primera a ser inhibida por GSH (K_i^{GSH} 37-55 uM vs. K_i^{GSH} 245 uM, respectivamente, y K_i^{GSH} 1,6 mM para la enzima de *T. cruzi*).

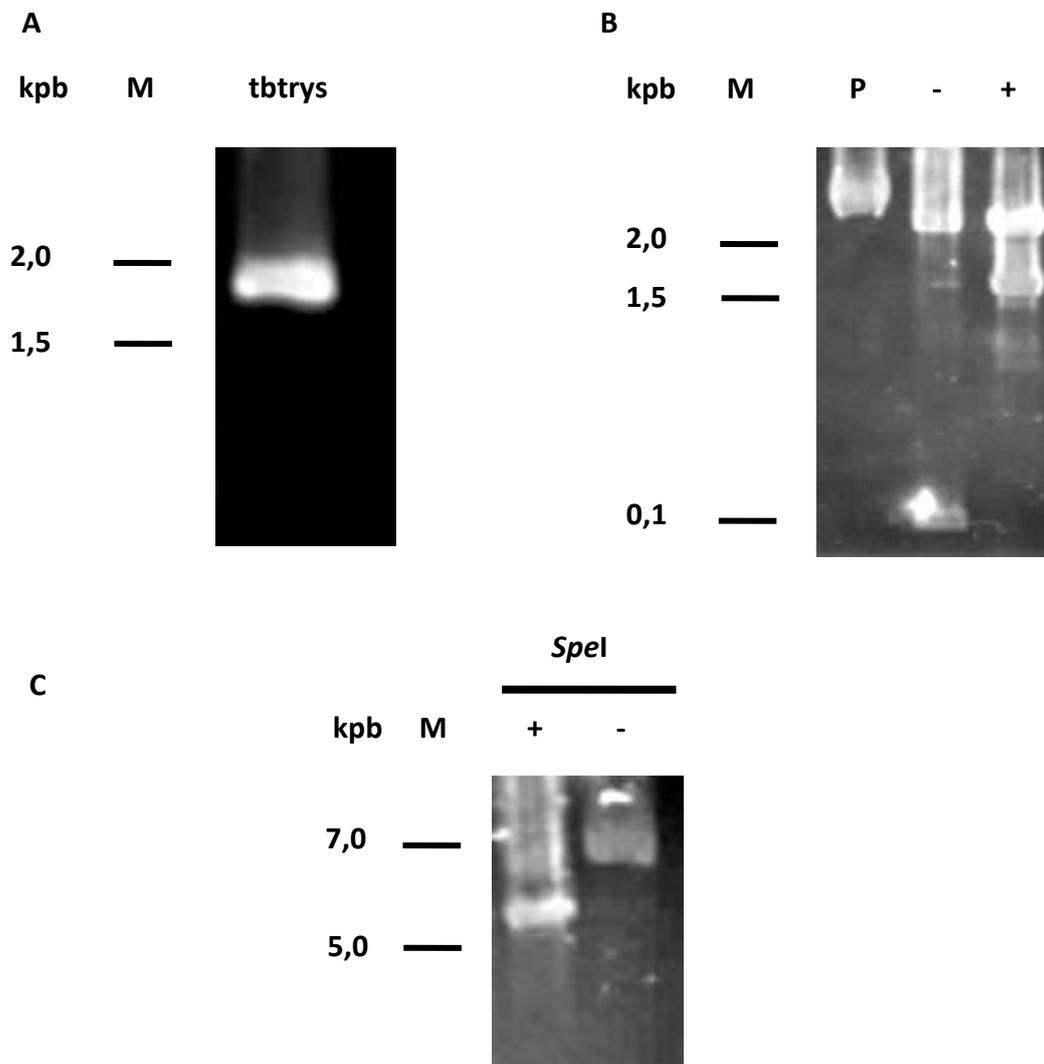


Figura 43. Generación del vector para la sobreexpresión de TbTryS en *T. cruzi*. Geles de agarosa 1% p/v teñidos con BrEt donde se visualiza: (A) 10 μ L de la amplificación por PCR de la secuencia del gen *tbtrys* (1,9 Kpb) a partir del vector pET19b-TbTryS, utilizando oligonucleótidos específicos que agregaron sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Eco*RV; (B) 500 ng del vector pTcINDEX sin digerir (P), digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RV (-*tbtrys*) donde se debe observar liberación del *stuffer* de aproximadamente 100 pb y digestión del vector pTcINDEX-TbTryS (+*tbtrys*); (C) Incubación de 200 ng del vector pTcIndex-TbTryS en ausencia (-) o presencia (+) de la enzima de restricción *SpeI*. M: marcador de tamaño molecular.

Estas características de la TbTryS mutante otorgan una ventaja fisiológica que permite augurar una adecuada complementación de la actividad de la TryS endógena de *T. cruzi*. Como ejemplo, si se hubiera usado la versión salvaje de la TryS de *T. brucei*, la alta inhibición que ésta presenta por GSH con respecto a la proteína homóloga de *T. cruzi* podría comprometer alcanzar niveles intracelulares de T(SH)₂ compatibles con las necesidades de este último organismo, que en promedio (para distintas cepas,

estadios y fases del crecimiento) presenta un contenido del ditiol 4 veces más altos que el detectado en tripanosomas africanos (Krauth-Siegel, 2008).

Para la sobreexpresión de la TbTryS mutada se seleccionó el vector pTcINDEX que se integra de manera estable en un locus transcripcionalmente quiescente (*non transcribed ribosomal RNA spacer*) del genoma y permite la inducción por tetraciclina de la expresión de proteínas (Taylor, 2006). En este vector la expresión de la secuencia blanco es controlada por un promotor T7 regulado por un operón de tetraciclina que en ausencia de tetraciclina se encuentra bloqueado por la proteína represora de tetraciclina bacteriana (TetR). Por tanto, para que este sistema funcione, se utilizó una línea celular de *T. cruzi* que posee integrada en su genoma (locus de β -tubulina) una copia del vector pLew13 que codifica para la expresión de los genes de la T7 ARN polimerasa y la TetR bajo el control del promotor fuerte del ARNr. Asimismo, la integración de la secuencia blanco sin codón de terminación al vector pTcINDEX permite generar una proteína con un epítipo c-myc (péptido EQKLISEEDL) en su C-terminal, el cual resulta útil para diferenciar la proteína endógena de la ectópica.

Luego de amplificado, el gen fue insertado en el vector pTcINDEX (Fig. 43B). Previo a su transfección, la construcción debió ser linealizada con la enzima de restricción *SpeI* (Fig. 43C). El pTcINDEX presenta un único sitio de corte para esta endonucleasa que se ubica en la región media de la secuencia ribosomal no traducida (R-NTS/P), secuencias que luego direccionarán su integración al genoma del parásito por recombinación homóloga. Esta construcción plasmídica linealizada fue luego transfectada en parásitos de la línea *T. cruzi* CL-Brener pLew13 y su integración fue seleccionada por resistencia a higromicina, tal como se detalló en la sección 3.6.1.2

Durante el proceso de selección, se pudo observar como a partir del noveno día luego de agregado del antibiótico de selección los parásitos del control negativo mostraron una tasa de duplicación al menos dos órdenes de magnitud inferior a la de las células transfectadas con el plásmido pTcINDEX-TbTryS. Ya en el día 15, se observa una detención en el crecimiento celular del cultivo control y a la tercera semana dejan de detectarse parásitos viables. En cambio los parásitos tranfectados con el plásmido pTcINDEX-TbTryS presentaron resistencia a higromicina y lograron proliferar.

Finalizado este lapso de tiempo, fue posible obtener una población celular que incorporó a su genoma el plásmido pTcINDEX-TbTryS.

4.6.3. Caracterización de la línea de *T. cruzi* pTcINDEX-TbTryS

El primer ensayo realizado con la línea de *T. cruzi* pTcINDEX-TbTryS fue tendiente a confirmar si ésta expresa la copia ectópica de la TbTrys de manera inducible. Para ello, parásitos de la forma epimastigota fueron cultivados en la ausencia (control) o presencia de 5 o 10 µg/mL oxitetraciclina durante 24 y 48 horas. A estos tiempos se tomaron muestras de los tres cultivos y la expresión de TbTryS fue detectada por técnica de *Western blot* con el anticuerpo anti-TbTryS, incluyéndose como control adicional la línea pLew13 no tranfectada con pTcINDEX-TbTryS (Fig. 44). El contenido de TryS en esta línea fue similar al de la cepa salvaje CL-Brener (datos no mostrados)

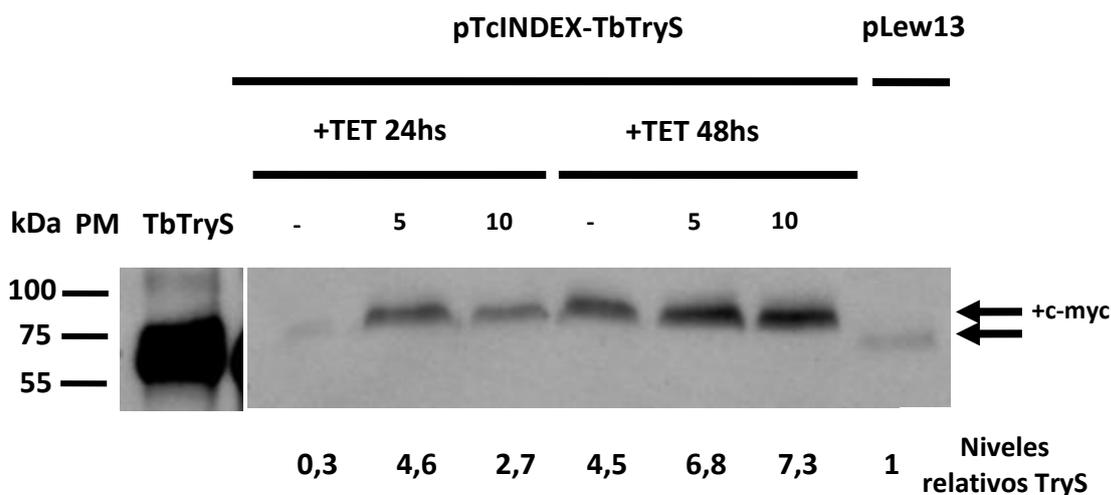


Figura 44. Caracterización de la línea celular de *T. cruzi* sobreexpresante de una copia ectópica de TbTryS. *Western-blot* a partir de extractos de 2×10^7 parásitos/carril utilizando el anticuerpo policlonal de conejo anti-TbTryS a una dilución 1/500 para cuantificar los niveles de TryS en línea celular *T. cruzi* CL-Brener pLew13 transfectada con el vector pTcINDEX-TbTryS (pTcINDEX-TbTryS). Los cultivos fueron incubados sin (-) o con 5 y 10 µg/mL de oxitetraciclina (5, 10) durante 24 y 48 horas. Extractos celulares de la línea pLew13 (pLew13) se incluyeron como control. TbTryS: 500 ng de proteína recombinante TbTryS. En la parte inferior se indican los niveles relativos de TryS cuantificados por densitometría con el programa ImageJ. La membrana teñida con Ponceau-S sirvió como control de carga, asignándole un valor arbitrario de 1 a la señal obtenida para el control pLew13. Se trabajó con un tiempo de exposición y revelado de 20 minutos y 30 segundos, respectivamente. PM: marcador de peso molecular.

En todas las muestras analizadas (0, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxytetraciclina tanto a las 24 como 48hs) el anticuerpo detectó de manera específica una banda de peso molecular compatible con el esperado para secuencias de TryS (~75 kDa; ver control en carril TbTryS, Fig. 44). En el caso de las muestras provenientes de la línea *T. cruzi* pTcINDEX-TbTryS las bandas presentaban un ligero retardo en su migración respecto de la proteína endógena (TcTryS) en un gel de SDS-PAGE corrido en condiciones reductoras. Esta diferencia es esperable ya que la TbTryS expresada a partir del vector pTcINDEX contiene un péptido de c-myc en su C-terminal que incrementaría en al menos 1,2 kDa el peso molecular de esta proteína. Es interesante notar que no se observa presencia de banda que corresponda con la TcTryS endógena en la línea transfectada con pTcINDEX-TbTryS para cualquiera de las condiciones ensayadas. Este fenómeno podría deberse a que los niveles de expresión alcanzados por la TbTryS serían suficientes para complementar la actividad de la proteína endógena por lo que la expresión de esta última sería silenciada por el parásito. Este mismo fenómeno ha sido reportado por otros autores (Shi, 2006; Manta, no publicado). En ese sentido, esto indicaría una redundancia funcional entre ambas proteínas tal como habíamos previsto a partir de la comparación de sus parámetros cinéticos.

La cuantificación relativa de la señal de las bandas obtenidas se realizó utilizando el programa ImageJ, asignando un valor de 1 a la densidad (área por intensidad) de la banda obtenida para la línea celular control (pLew13). Tal como se muestra en la figura 44, en diferentes condiciones de inducción se obtienen niveles de TbTryS 3 a 7 veces superiores a los de TcTryS, siendo aún mayor el contenido de la copia ectópica a las 48hs post-inducción.

Por otro lado, es importante notar la marcada expresión de TbTryS en ausencia de inductor principalmente a las 48 hs, lo que estaría indicando que la expresión de la copia ectópica no está siendo eficientemente regulada (expresión *leaky*). Esperando que una menor expresión de T7 ARN polimerasa reduciría este fenómeno de expresión basal no inducida, se disminuyó de 500 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la concentración de geneticina que es el antibiótico de selección para pLew13, el cual codifica para la T7 ARN polimerasa y también para la TetR. Esta estrategia no resultó exitosa, obteniéndose resultados incluso más desfavorables (datos no mostrados), lo cual sugiere que el

principal limitante en este sistema para lograr una correcta represión del promotor de T7 es alcanzar niveles saturantes de TetR. En base a estos resultados se decidió seguir trabajando con la concentración inicial de geneticina.

Para completar la caracterización de esta línea transgénica y confirmar que la TbTryS expresada por *T. cruzi* fuera funcionalmente activa se intentó determinar el contenido de tioles de bajo peso molecular en extractos de parásitos de la línea no inducida e inducida y de la línea control pLew13. Para identificar y cuantificar los distintos tioles de bajo peso molecular, estos fueron derivatizados con monobromobimano y analizados por HPLC con detector de fluorescencia. En las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio no fue posible reproducir la técnica de determinación de tioles por HPLC descrita en Shahi y col. (Shahi, 2002) o Comini y col. (Comini, 2007), por lo que fue necesario trabajar en la puesta a punto de una nueva técnica (procedimiento no mostrado).

Si bien las muestras provenientes de parásitos presentaron cromatogramas con perfiles diferentes, lo cual podría estar dando un indicio de diferencias en los niveles de tioles, ninguno de los picos obtenidos se correspondió con los tiempos de retención obtenidos para los estándares de GSH y T(SH)₂ (datos no mostrados). Esto dificultó la interpretación de los resultados y la asignación no ambigua de los picos, siendo imposible arribar a una conclusión respecto al contenido de tioles a nivel intracelular mediante esta técnica. A futuro se plantea la optimización del protocolo de marcado de los tioles de bajo peso molecular y de la técnica de separación y detección por HPLC. Por otro lado, también nos planteamos realizar mediciones de la actividad TryS en extractos de las diferentes muestras de estas líneas celulares.

A pesar que mediante esta técnica no logramos corroborar la funcionalidad de la TbTryS expresada por *T. cruzi*, es de esperar que esta enzima sea activa en los parásitos transfectantes, principalmente porque, como se mostró más arriba, la expresión de la copia ectópica se acompañó de una regulación hacia abajo en la expresión de la proteína endógena.

4.7. Capacidad infectiva de una línea celular de *T. cruzi* que sobreexpresa TbTryS

Los resultados obtenidos en las infecciones de células Vero con *T. cruzi* CL-Brener y Dm28c mostraron diferencias en cuanto a la capacidad invasiva de ambas cepas, siendo la última de ellas superior a la primera (sección 4.5). Por otro lado, detectamos que en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* la cepa Dm28c presenta niveles más elevados de TryS que CL-Brener (sección 4.3.2). Debido a que ambas cepas difieren en la expresión de diferentes proteínas (Galdino, 2014), las cuales probablemente están involucradas en los procesos de reconocimiento e invasión de la célula hospedera, y que las células Vero no ofrecen mayor resistencia a la invasión, nos propusimos investigar si la sobreexpresión de TryS (en este caso la enzima de *T. brucei*), podría contribuir a una mayor infectividad del patógeno en células especializadas del sistema inmune del hospedero y otra no relacionada (Vero), empleando líneas celulares de CL-Brener con idéntico *background* proteómico.

Las infecciones de macrófagos J774 en reposo (o no activados) o activados y de células Vero (datos no mostrados) se llevaron a cabo tal como se describió en la sección 3.6.1.1. Estos ensayos se realizaron por duplicado sobre células cultivadas en láminas de vidrio incluídas en placas de cultivo y con parásitos *T. cruzi* CL-Brener capaces de expresar la TbTryS (pLew13+pTcINDEX-TbTryS) en estado no inducido (abreviado a partir de ahora como pTcINDEX-TbTryS) e inducido con oxitetraciclina (pLew13+pTcINDEX-TbTryS + TET, abreviado a partir de ahora como pTcINDEX-TbTryS + TET). Como control se utilizó la línea celular parental (pLew13) sobre la cual se generó la línea transgénica sobreexpresante.

La activación clásica de macrófagos es la más conocida y mejor caracterizada (Mosser 2003; Zhang 2010). Esta ocurre por la combinación de dos señales. La primera se conoce como sensibilización o *priming*, con interferón-gamma (IFN- γ) como principal estímulo de activación. El IFN- γ puede ser producido *in vivo* por las células de la inmunidad innata como son las células *natural killer* (NK). El segundo estímulo es típicamente un ligando para alguno de los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*). Estos ligandos se expresan en organismos microbianos y se los conoce como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen associated molecular patterns*). La activación de los TLRs induce la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) y esta citoquina actúa de manera autócrina para estimular los macrófagos. Para la activación *in vitro*, se debe realizar una sensibilización inicial con IFN- γ y luego el segundo estímulo se produce por la fagocitosis de los parásitos que contienen los ligandos de los TLRs. Esta activación de los macrófagos resulta en la alteración de la producción de citoquinas, aumento en la secreción de intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno, aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de mediadores inflamatorios. De esta forma los macrófagos muestran citotoxicidad frente a tumores y habilidad para matar microorganismos intracelulares (Mosser 2003; Zhang 2010).

4.7.1. Cuantificación de las infecciones

La metaciclologénesis de los parásitos se indujo *in vitro* por estrés nutricional al dejar crecer los parásitos epimastigotas por aproximadamente 2 semanas sin renovación del medio de cultivo (Soares, 2000). Previa a las infecciones se cuantificaron los niveles de metaciclologénesis en las tres líneas utilizadas: pLew13, pTcINDEX-TbTryS y pTcINDEX-TbTryS + TET. Para ello se tomaron alícuotas de los cultivos, se fijaron y embebieron en un medio de montaje con DAPI (para tinción de ADN) y los preparados se observaron en el microscopio de epifluorescencia. Se adquirieron imágenes de contraste de fase y señal de DAPI para lograr identificar los distintos estadios del parásito por morfología general y posicionamiento del núcleo y kinetoplasto. En los tripomastigotas, el kinetoplasto se ubica posnuclear, en la región posterior de la célula. El flagelo emerge desde el bolsillo flagelar y se elonga a lo largo de todo el cuerpo del parásito adherido

a la superficie del mismo generando una ondulación de la membrana celular contigua. En epimastigotas, el fagelo protruye de la célula en posición anterior al núcleo, y el kinetoplasto se ubica entre el núcleo y el extremo anterior (Souza, 2009) (Fig. 45A). Se analizaron de 4 a 6 regiones de interés para lograr tener un valor representativo del número y estadio de los parásitos en las muestras analizadas (Fig. 45B).

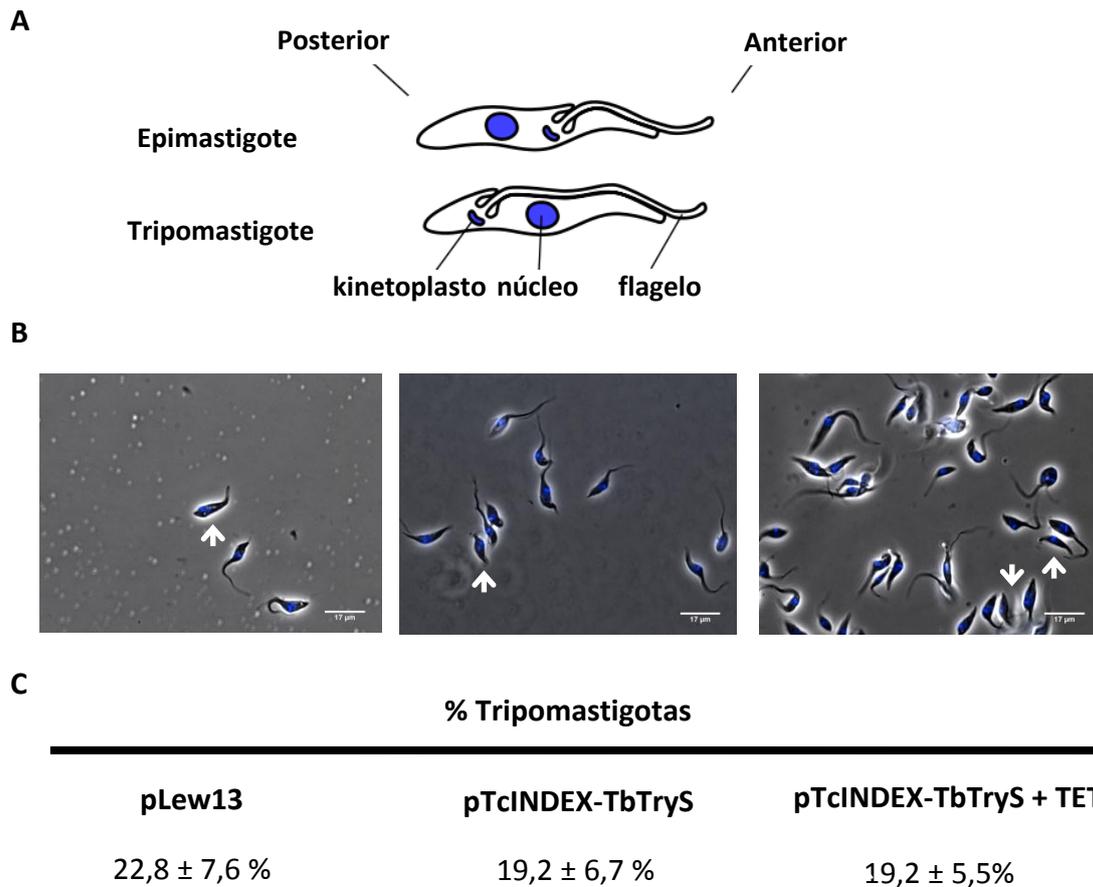


Figura 45. Cuantificación de metaciclogénesis en *T. cruzi* CL-Brener con expresión de TbTryS. (A) Esquema de la morfología, posicionamiento del núcleo y kinetoplasto en los estadios epimastigota y tripomastigota. (B) Imágenes de contraste de fase y epifluorescencia de parásitos *T. cruzi* CL-Brener pLew13 o pTcINDEX-TbTryS no inducidos o inducidos (+TET) teñidos con DAPI para marcación de ADN. Las flechas blancas muestran la presencia de tripomastigotas. (C) Cuantificación de la metaciclogénesis (porcentaje), definida como el número de tripomastigotas*100/número de parásitos totales. Los tripomastigotas fueron identificados por criterio morfológico y el posicionamiento relativo del núcleo respecto al kinetoplasto.

Siguiendo estos criterios, en la Fig. 45C se muestran los porcentajes de tripomastigotas con los que se infectaron macrófagos J774, siendo similar en todos los casos (~ 20% de tripomastigotas). Esto vuelve a confirmar que la expresión de la TbTryS no altera el proceso de metaciclologénesis en *T. cruzi*.

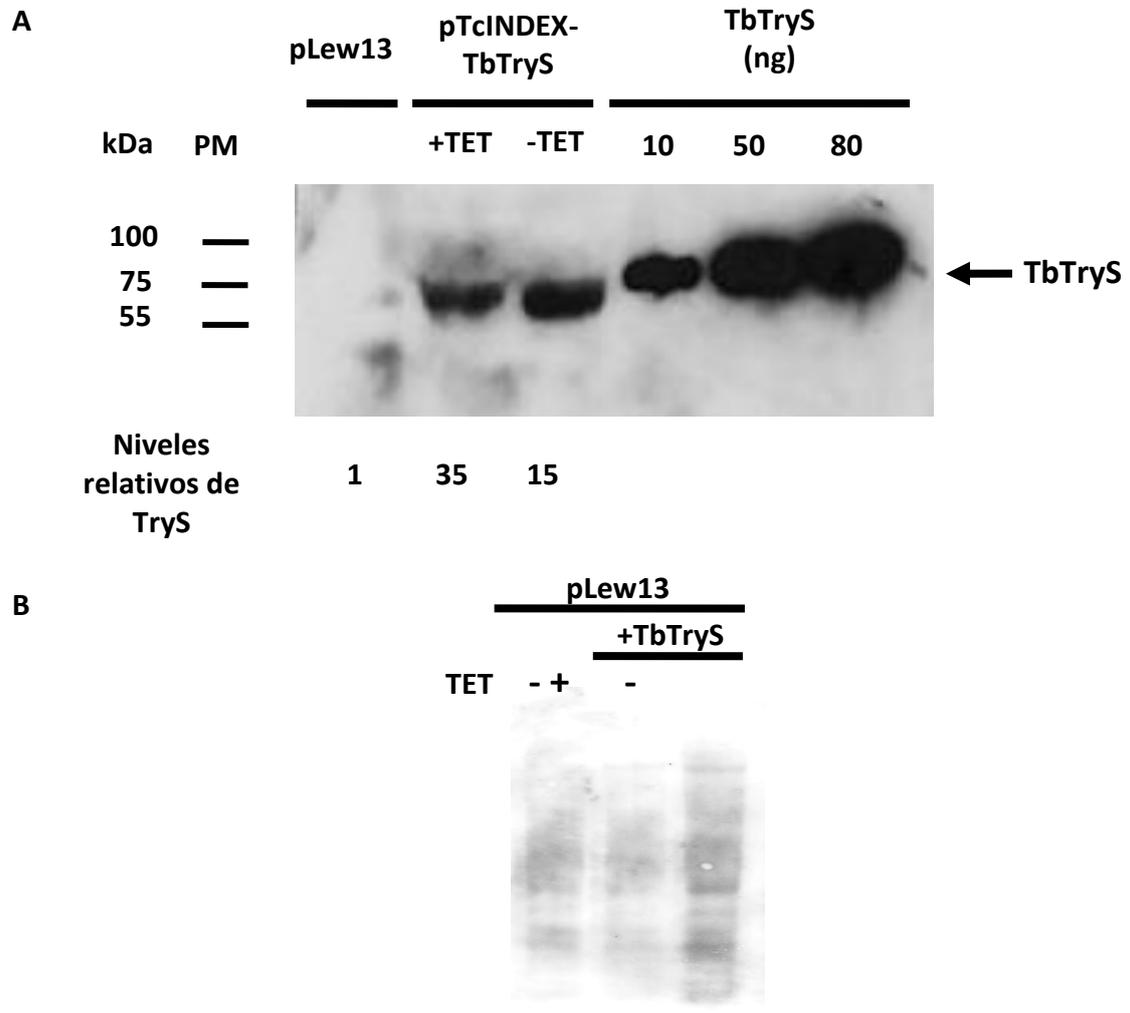


Figura 46. Nivel de TryS en las líneas celulares de *T. cruzi* utilizadas para infecciones de macrófagos J774. (A) *Western-blot* a partir de extractos solubles de 2×10^7 células/carril de las mismas muestras que se utilizaron para las infecciones con las líneas celulares pLew13, pTcINDEX-TbTryS no inducida (- TET) e inducida (+ TET) con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oxitetraciclina por 48 hs. A la derecha, se incluyó la proteína recombinante TbTryS a diferentes concentraciones. Se utilizó el anticuerpo policlonal de ratón anti-TbTryS a una dilución de 1/1000. Abajo, cuantificación densitométrica comparativa de los niveles de TryS (niveles relativos de TryS) mediante el programa ImageJ, asignando un valor arbitrario de 1 a la condición control pLew13. PM: marcador de peso molecular. (B) Tinción por Ponceau-S de las proteínas presentes en los extractos de parásitos, como referencia de carga. Para el *Western blot* se empleó un tiempo de exposición y revelado de 20 minutos y 30 segundos, respectivamente.

Por otro lado, se cuantificaron los niveles relativos de TryS en las líneas pTcINDEX-TbTryS inducida o no inducida respecto a la línea control pLew13 (Fig. 46). A las 48 hs de inducción con oxitetraciclina, se obtuvo un nivel de TbTryS 37 veces superior respecto al contenido de TcTryS en la línea control. Para la condición sin inducir nuevamente se volvió a observar una falla en la represión de la transcripción a partir del vector pTcINDEX en ausencia de tetraciclina ya que el nivel de TbTryS fue 16 veces mayor al de TcTryS en los parásitos de la línea celular control. Los valores de expresión de TbTryS en condiciones de inducción fueron mayores a los obtenidos en experimentos anteriores (sección 4.6.2), posiblemente porque se trabajó con diferentes preparaciones de oxitetraciclina, lo cual ya se ha observado produce variaciones en los niveles de inducción. Sin embargo, la proporción (aproximadamente del doble) de TbTryS para la línea celular inducida y no inducida se mantuvo constante en ambos ensayos. La cuantificación de los niveles relativos de TryS se hizo a partir de los mismos parásitos con los que se realizó la infección (con un contenido aproximado de 20% tripomastigotas). Próximamente se tratará de confirmar que la inducción de la expresión de la copia ectópica de TryS también se mantiene en los estadios infectivos, tripomastigotas y amastigotas.

4.7.2. Imágenes de epifluorescencia de infecciones de macrófagos J774

El progreso de la infección de macrófagos J774 por las diferentes líneas de *T. cruzi* CL-Brener fue analizado a las 72, 96 y 168 hs post-infección mediante microscopía de epifluorescencia y de manera similar a lo descrito para los experimentos con células Vero (sección 4.5). Se tomaron imágenes correspondiente a un campo por preparado (3 imágenes totales) (Fig. 47) a partir de las cuales se cuantificó el promedio de células infectadas en cada condición, calculado como número células infectadas/número células totales; y en paralelo se estimó el promedio de amastigotas por célula infectada, calculado como el número de amastigotas totales/número células infectadas. Los análisis de imágenes fueron realizados con el programa ImageJ.

Respecto a los resultados en infecciones de macrófagos no activados (Fig. 48A), para ninguna de las tres líneas celulares de *T. cruzi* estudiadas se observaron diferencias significativas en ambos parámetros (células infectadas y número de amastigotas), salvo a las 96 hs donde se observa que la línea pLew13 logró infectar aproximadamente tres veces más de células que la línea celular pTcINDEX-TbTryS inducida o no y a su vez la línea inducida logró infectar el doble de células respecto a la no inducida ($p < 0,05$). En cuanto al número de amastigotas en células infectadas (Fig. 49A), a las 72 hs y para todas las condiciones se observó aproximadamente un parásito por macrófago. Sin embargo a las 96 y 168 hs, el promedio de amastigotas para la línea celular pLew13 aumentó hasta 1,6, mientras que en los ensayos con parásitos pTcINDEX-TbTryS con o sin oxitetraciclina se mantuvo el valor de un amastigota por macrófago.

En las infecciones de macrófagos activados, a las 72 hs el número de células infectadas es 4 a 8 veces inferior respecto a lo observado en el mismo tiempo para macrófagos no activados (Fig. 48B). Esto se debe al efecto citotóxico que ejercen los macrófagos activados contra los parásitos (Alvarez, 2011). Este fenómeno se revierte a las 96 y 168 hs, ya que la activación de los macrófagos normalmente no perdura en el tiempo al no mantenerse el estímulo (Held, 1999).

Para la línea celular pTcINDEX-TbTryS inducida o no inducida, a las 96 hs se detecta un número similar de células infectadas al obtenido en ensayos con macrófagos no activados. Esto estaría indicando que la expresión de TbTryS en niveles dos veces superiores no estaría confiriendo prácticamente ninguna ventaja adicional a la infectividad de la cepa CL-Brener. Este resultado contrasta con el obtenido para la línea celular pLew13 que a este mismo tiempo produjo un nivel de infección 7 veces mayor. También el número de macrófagos activados e infectados por ésta línea celular control fue 4 veces superior al determinado en macrófagos no activados (Fig. 49B). Estas diferencias de infectividad observadas para la línea pLew13 en macrófagos activados y no activados no era esperable, y plantea una interrogante de si en este caso puntual no hubo algún tipo de sesgo en la captura de imágenes que hiciera que se sobreestimen los niveles de infección. Sería bueno repetir la captura de imágenes de este preparado para confirmar este resultado.

Estas diferencias en la infectividad de la línea transgénica (pTcINDEX-TbTryS) y la parental (pLew13) quedó también manifiesta al analizar el número de amastigotas intracelulares, el cual arrojó un promedio de 1, similar al ya obtenido, y de 2,5 amastigotas/macrófago, respectivamente.

Vale la pena destacar que estos mismos resultados (disminución del número de células infectadas y amastigotas intracelulares por la línea sobreexpresante de TbTryS), fueron observados sistemáticamente en los ensayos de infección realizados con las células Vero (datos no mostrados).

En el campo de las especulaciones, una posible explicación para este resultado es que la producción excesiva de este ditiol podría depletar los niveles de espermidina, un componente del tripanotión. Las poliaminas están implicadas en múltiples funciones relacionadas a la biosíntesis de macromoléculas (ADN, ARN o proteínas por ejemplo) por lo tanto sus niveles intracelulares están altamente regulados por diferentes mecanismos (Bacchi, 1989; Bacchi, 1993; Li, 1992). A diferencia de *T. brucei* y en menor medida *Leishmania* spp., *T. cruzi* es un organismo auxótrofo para poliaminas y por lo tanto está obligado a incorporar las mismas (espermidina o sus precursores como cadaverina o putrescina) del medio extracelular mediante transportadores específicos (Colotti, 2011, Balaña, 2012; Willert, 2012). Estudios realizados con *T. cruzi* mostraron que espermidina es la poliamina esencial para la proliferación normal de este organismo (González et al. 2001). Por lo tanto, una baja disponibilidad de espermidina libre, como sucedería si gran parte de esta es convertida a tripanotión, podría comprometer otras funciones de este metabolito asociadas al crecimiento y la proliferación celular (Nishimura, 2001; Nishimura, 2006; Reguera, 2005). Otra posibilidad, aunque menos probable, es que los altos niveles de TbTryS no se correspondan con altos niveles de tripanotión ya que la actividad de la enzima de *T. brucei* en el interior de *T. cruzi* podría ser inferior a la de la enzima endógena. Esto podría originarse producto de la inhibición por GSH ya que, como se comentó anteriormente, la TbTryS mutada aquí empleada, si bien presenta parámetros cinéticos más próximos a los de la enzima de *T. cruzi*, aún posee una K_i para este sustrato que es 5 veces inferior (Benítez, Fiestas y col. en preparación) a las reportadas para TryS de

distintas cepas de *T. cruzi* (Olin-Sandoval, 2012; Oza, 2002). De hecho, modelos *in silico* del flujo de esta vía metabólica—desarrollados en base a datos bioquímicos y biológicos obtenidos de *T. cruzi* y sus enzimas—destacan a la γ -glutamilcisteinil sintetasa y a la TryS como los principales nodos regulatorios del sistema del tripanotión (Olin-Sandoval, 2012). Debido a que la expresión de la TcTryS se haya reprimida en la cepa transgénica de *T. cruzi* que expresa la TbTryS (Fig. 44) creemos que es poco probable que esta situación esté ocurriendo ya que este fenómeno es compatible con una correcta complementación de funciones.

Si bien estos resultados podrían inducir a pensar que concentraciones elevadas de TbTryS, respecto a las presentes en los diferentes estadios de *T. cruzi*, podrían resultar contraproducentes para el parásito, es importante hacer notar que la forma epimastigota transfectada con la copia ectópica de la TbTryS se duplica más lentamente que el control sin transfectar (la tasa de duplicación aumenta entre 10-15 hs, datos no mostrados). También observamos un enlentecimiento en el crecimiento de la línea celular pLew13 respecto de la línea celular parental no transfectadas con pLew13. Dado que las líneas celulares pLew13 y pTcINDEX-TbTryS fueron generadas sobre la misma cepa, CL-Brener, estas diferencias en el patrón de crecimiento son claramente atribuibles a la presencia de altas concentraciones de antibióticos¹ en el medio de cultivo, las cuales son necesarias para mantener el sistema de expresión funcional.

Esto por lo tanto nos inhibe a realizar interpretaciones sobre el rol de (Tb)TryS en la infectividad del parásito a partir de comparaciones entre líneas celulares sometidas a distintas presiones de selección (por ej. pLew13 y pTcINDEX-TbTryS), pero nos habilita a sacar conclusiones a partir de los resultados obtenidos para la línea celular sobreexpresante de TbTryS en estado inducido y no inducido, la cual además exhibió una tasa de duplicación similar en ambas condiciones.

¹ G418 y/o higromicina, antibióticos que inhiben distintas etapas de la traducción de proteínas: la elongación y la translocación del ribosoma del ARNt, respectivamente.

Tripanotión está involucrado en la defensa antioxidante del parásito al abastecer con potencial reductor a varias enzimas que brindan protección contra oxidantes, por lo que es lógico pensar que a mayores concentraciones de tripanotión la célula ofrecería mayor resistencia a este tipo de moléculas, a las cuales se expone durante la invasión de macrófagos activados. Siguiendo esta lógica, se espera que el número de células infectadas y de amastigotas intracelulares fuera mayor en macrófagos activados infectados con la línea celular pTcINDEX-TbTryS inducida respecto de la no inducida (nota: se recuerda que la expresión de la TbTryS fue 2 veces superior a la detectada en condiciones de no inducción).

Esto nos lleva a concluir de manera preliminar, ya que aún nos resta confirmar esto mediante la determinación del contenido de tioles de bajo peso molecular, que en las condiciones aquí ensayadas una sobreexpresión de 2 veces en la TbTryS no aumenta de manera significativa la capacidad proliferativa e infectiva de la cepa CL-Brener de *T. cruzi* (ya que únicamente se vieron diferencias significativas a las 96 hs en los experimentos con macrófagos no activados).

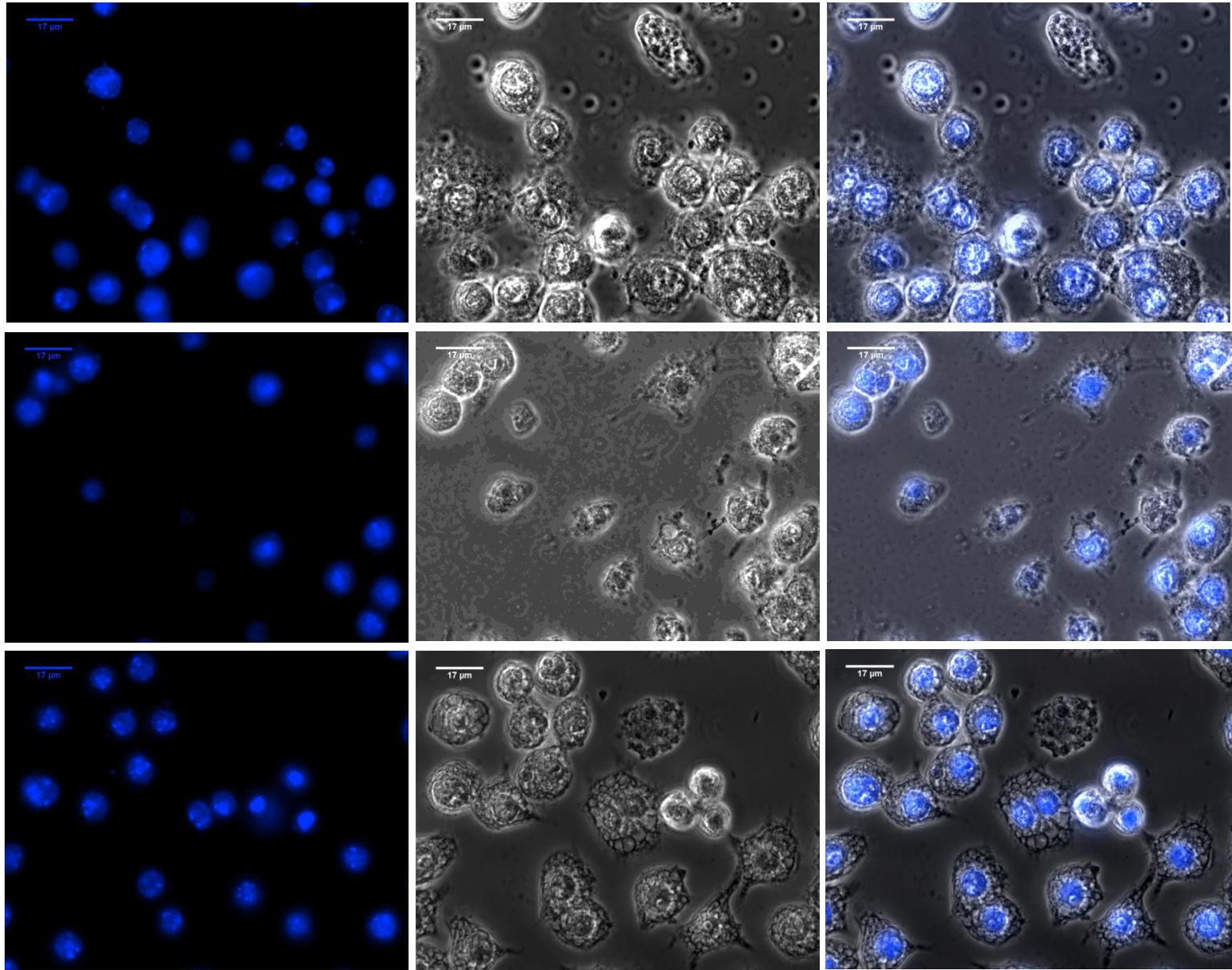
A futuro se plantea trabajar en: i) la puesta a punto de la técnica de HPLC para la cuantificación de tioles de bajo peso molecular, de manera de poder profundizar y responder los interrogantes planteados aquí, ii) experimentos *in vitro* de respuesta a estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno, peroxinitrito) de la línea celular transgénica.

A

DAPI

CF

Merge



B

DAPI

CF

Merge

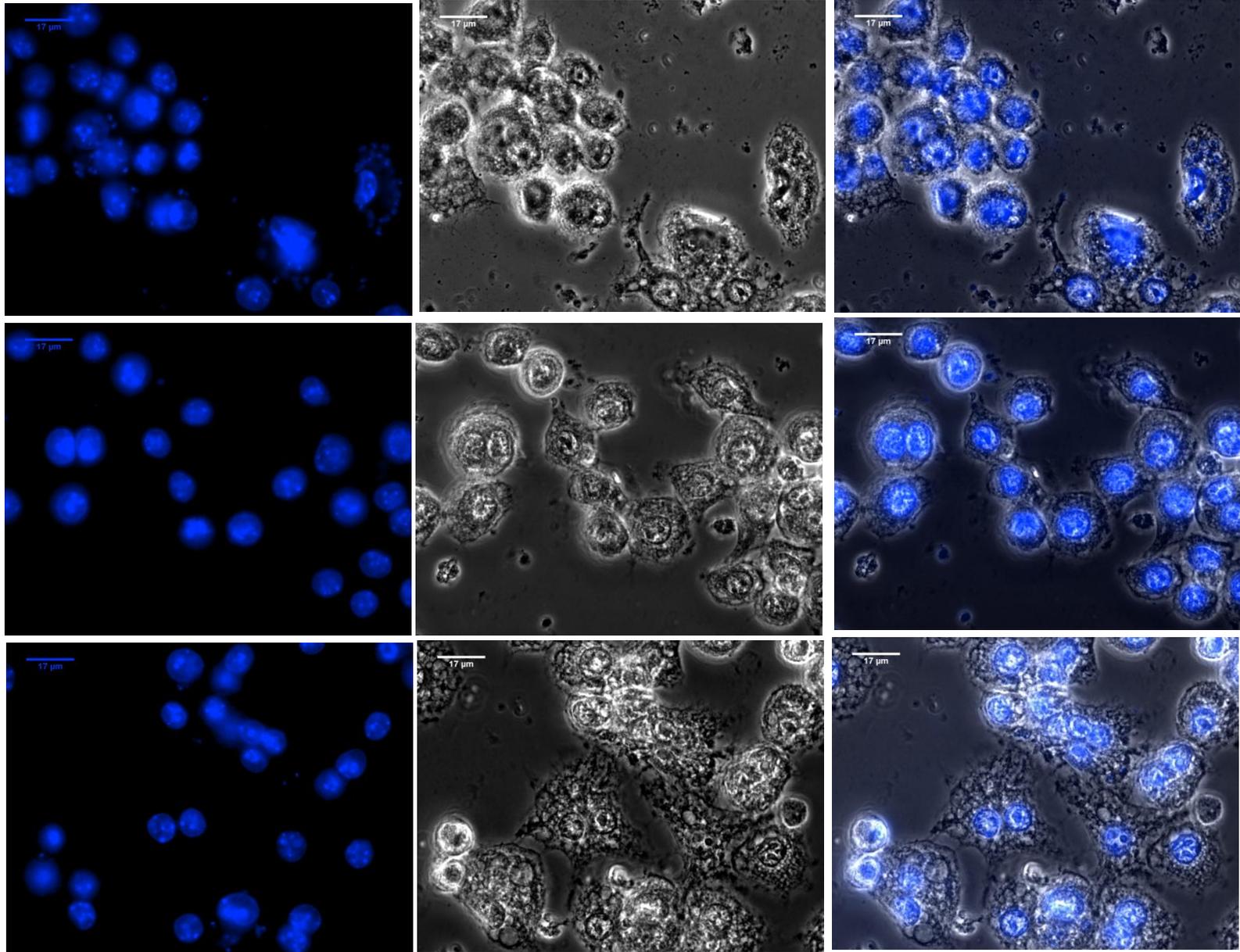


Figura 47. Infecciones de macrófagos J774 por líneas celulares de *T. cruzi* CL-Brener. Imágenes de epifluorescencia de macrófagos J774 no activados (A) o activados (B) 168 hs post-infección. Las infecciones se llevaron a cabo con las líneas celulares de *T. cruzi* CL-Brener pLew13 (panel superior), pTcINDEX TbTryS no inducida (panel central) o pTcINDEX-TbTryS inducida con 10 µg/mL oxitetraciclina (panel inferior). DAPI: tinción de ADN, CF: contraste de fase y Merge: superposición de las imágenes de DAPI y CF.

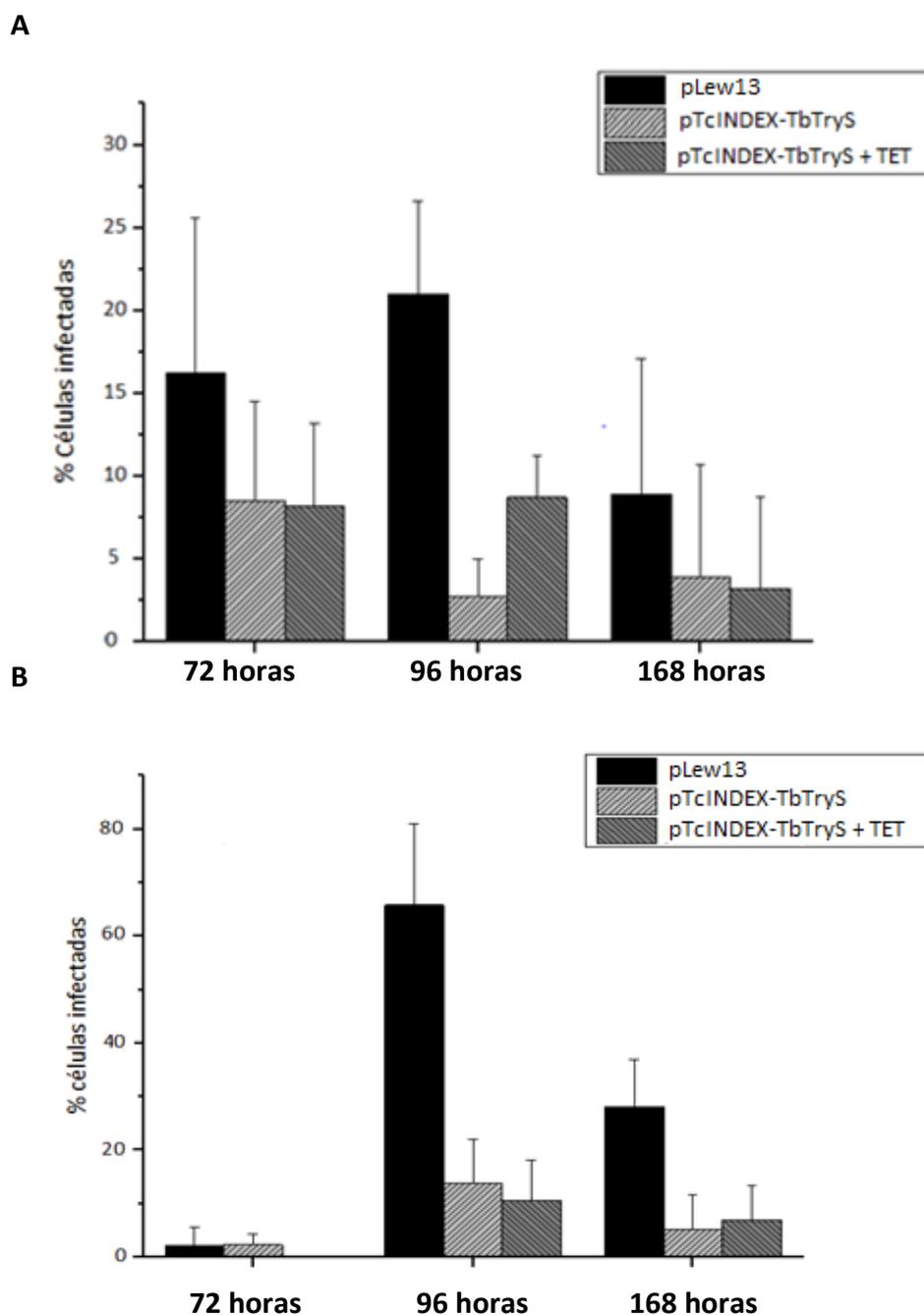


Figura 48. Cuantificación de las infecciones en macrófagos J774 infectados por distintas líneas celulares de *T. cruzi* CL-Brener. Porcentaje de macrófagos J774 no activados (A) o activados (B) infectados con *T. cruzi* pLew13, pTcINDEX-TbTryS (no inducido) o pTcINDEX-TbTryS+ TET (inducido) a las 72, 96 y 168 hs post-infección. La inducción de la sobreexpresión de TbTryS fue por 48 hs con 10 µg/mL de oxitetraciclina pre-infección. El porcentaje de células infectadas fue calculado como el cociente entre el número de células infectadas y células totales multiplicado por 100 (n=3 ± desviación estándar).

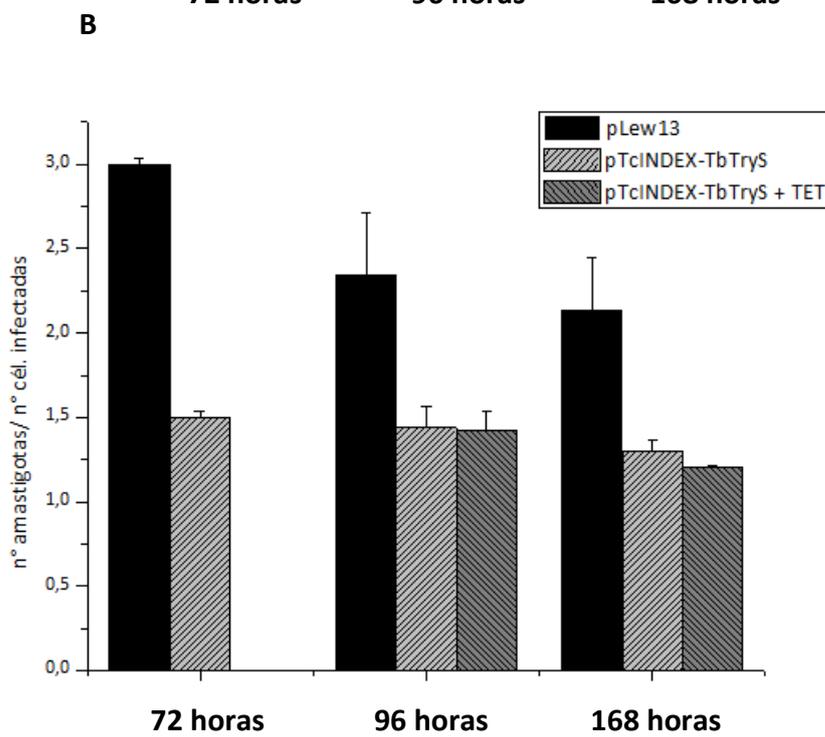
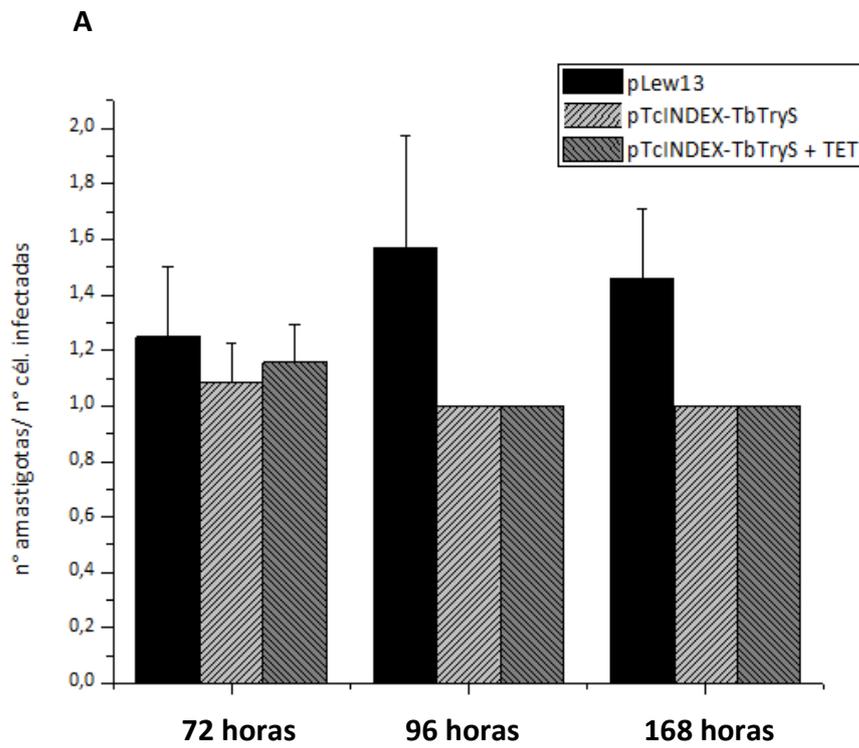


Figura 49. Cuantificación de amastigotas intracelulares en macrófagos J774 infectados con líneas celulares de *T. cruzi* CL-Brener. Cantidad relativa de amastigotas por célula de macrófago J774 no activada (A) o activada (B) e infectadas con *T. cruzi* pLew13, pTcINDEX-TbTryS no inducido e inducido (+ TET) a las 72, 96 y 168 hs post-infección (n=3 ± desviación estándar)

4.8. Monoglutationilespermidina no es capaz de sustituir *in vivo* las funciones de tripanotión

Uno de los principales objetivos de esta tesis fue demostrar si Gsp es capaz de sustituir las funciones de tripanotión *in vivo*. Desde hace años existen evidencias precisas sobre la capacidad de este monotiol para reemplazar con gran eficiencia a tripanotión en la cascada enzimática de descomposición de peróxido de hidrógeno (Fig. 7) (Tetaud 1998), de síntesis de desoxiribonucleótidos (Dormeyer, 2001) y, más recientemente, de su capacidad para reaccionar de manera específica con tioles de ciertas proteínas del parásito (Melchers, 2007). Más allá de la relevancia que presenta el abordaje de esta pregunta desde el punto de vista de la bioquímica del parásito, este interrogante reviste gran importancia dado que existe un marcado interés por el diseño de fármacos que puedan interferir con la síntesis de tripanotión (Torrie , 2009; Jaeger, 2006) y porque se han observado diferencias especie-específicas en cuanto a la acción de compuestos con potencial inhibidor sobre esta clase de sintetetas tanto *in vitro* como *in vivo* (Oza, 2008); Benítez, Fiestas y col. en preparación; Flohé, Comini y col, no publicado).

Un escenario posible es que Gsp sea capaz de reemplazar a T(SH)₂, lo cual convertiría a esta enzima en un blanco adicional y obligaría a considerar el desarrollo de inhibidores capaces de interferir con GspS de manera exclusiva o adicional a la TryS. Más allá que los resultados presentados anteriormente muestran que no existe una expresión activa de esta proteína en *T. cruzi* (esta tesis, sección 3.4.3) y *L. infantum* (Sousa, 2014) , aún existen especies de *Leishmania* que contienen el gen de la GspS (*L. mexicana* y *L. donovani*) y cuya expresión no ha sido caracterizada a la fecha.

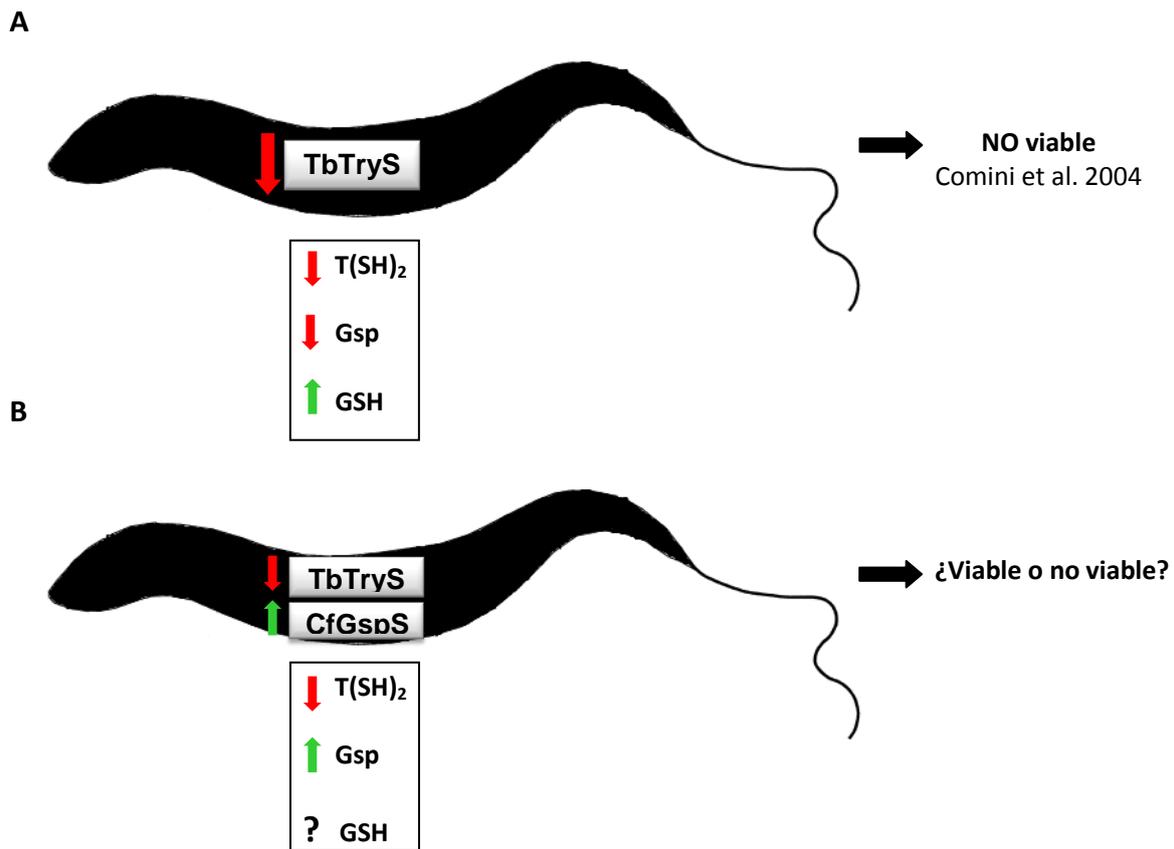


Figura 50. Esquema de la complementación metabólica por Gsp en la línea ARNi-TryS de *T. brucei*. (A) Fenotipo que produce el silenciamiento de la TryS por técnica de ARNi en *T. brucei*: disminución del nivel de T(SH)₂ y Gsp, con acumulación de GSH, y progresiva pérdida de la viabilidad celular (Comini, 2004). (B) Estrategia planteada para demostrar si Gsp es capaz de sustituir las funciones de T(SH)₂ *in vivo* en *T. brucei*. Dado que este parásito carece de una secuencia completa de gsp, se incorpora a su genoma una copia ectópica del gen de la GspS de *C. fasciculata* cuya expresión será constitutiva. En esta línea celular, la inducción del ARNi de la TbTryS disminuiría el contenido de T(SH)₂ pero no de Gsp cuya síntesis dependería ahora de la GspS. En principio se espera que los niveles de GSH se mantengan estables producto de su utilización para formar Gsp. Dependiendo si Gsp es o no capaz de sustituir a T(SH)₂, debería observarse una reversión o mantención, respectivamente, del fenotipo de muerte ocasionado por silenciamiento de la TbTryS.

Por otro lado, podría ocurrir que la presión de selección de inhibidores de la TryS indujera la de-represión de la expresión de la GspS en *T. cruzi* con la consecuente eventual compensación metabólica que posibilitaría la viabilidad del patógeno y la falla de la quimioterapia.

Dado que no fue posible generar el *knock-out* para la TcTryS, donde en principio se quería evaluar si Gsp puede compensar la ausencia de T(SH)₂, pero por otro lado

tampoco se pudo detectar expresión de TcGspS (ni determinar si la misma presenta actividad de síntesis de Gsp), se planteó una aproximación diferente utilizando como modelo a *T. brucei*. Se generó un sistema celular transgénico de *T. brucei brucei* que permite generar condiciones metabólicas de depleción de tripanotión y expresión constitutiva de Gsp. La estrategia experimental ha sido elaborada sobre la base que en este parásito la síntesis de Gsp y T(SH)₂ dependen de una única enzima, la TbTryS, y que para el mismo existen herramientas genéticas sencillas y confiables para promover o silenciar la expresión de genes ectópicos o endógenos (Fig. 50) (Ariyanayagam, 2005; Comini, 2004).

Se trabajó sobre una línea celular de la forma sanguínea de *T. brucei brucei* cepa 427 que permite inducir el silenciamiento de la TryS (ARNi-TryS), y por ende un descenso significativo en los niveles de tripanotión y Gsp (Comini, 2004). Esta línea contiene integrado en su genoma secuencias codificantes para la T7-ARN polimerasa (plásmido 514), la proteína represora de tetraciclina (plásmido 1313) y el casete de ARN de interferencia para la proteína TryS de *T. brucei* (vector p2T7TA-177-28, J.E. Donelson, Universidad de Iowa, Estados Unidos). La misma debió ser transfectada con una copia ectópica del gen que codifica para la GspS de *C. fasciculata*. La nueva línea celular fue denominada ARNi-TryS + CfGspS.

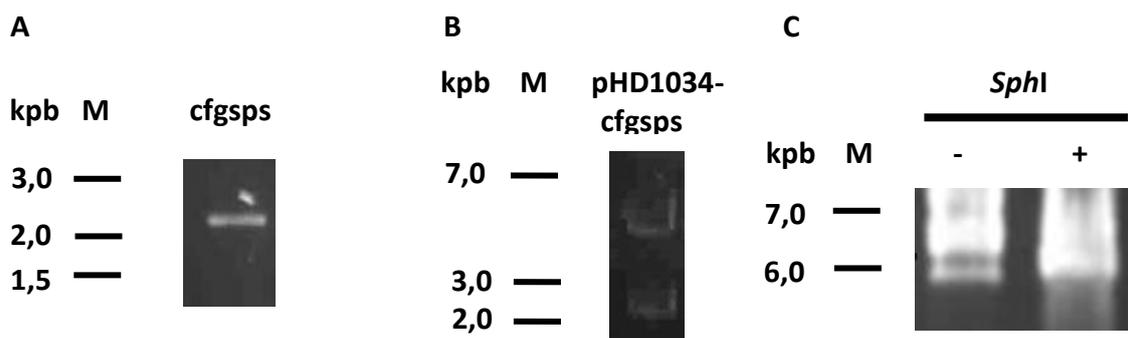


Figura 51. Construcción del vector pHD1034-CfGspS para complementación metabólica en *T. brucei*. Geles de agarosa 1% p/v teñidos con BrEt donde se visualiza: (A) 10 µL de la reacción de PCR para amplificar el gen de la CfGspS (2,1 Kpb) a partir de ADN genómico de *C. fasciculata* con oligonucleótidos específicos que agregan en sus extremos sitios de restricción para las enzimas *HindIII* y *BamHI*; (B) 100 ng del vector pHD1034-CfGspS digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*; y (C) Digestión de 200 ng del vector pHD1034-CfGspS con la enzima de restricción *SphI* (+). Se incluye un control sin digerir (-). M: marcador de tamaño molecular.

Se amplificó el gen de la enzima CfGspS a partir de ADN genómico de *C. fasciculata* con oligonucleótidos específicos que incorporan sitios de restricción para las enzimas *HindIII* y *BamHI*, tal como se detalla en la sección 3.2.2. (Fig. 51A). La identidad de la secuencia clonada, su correcta inserción y ausencia de mutaciones fue confirmada mediante secuenciación parcial de los extremos 5' y 3'. La cepa de *C. fasciculata* aquí empleada difiere de aquella a partir de la cual se aisló la secuencia de CfGspS depositada en la base de datos (AAC48361.2). El alineamiento de ambas secuencias (60% cobertura) reveló la existencia de cierta microheterogeneidad en ellas, aunque conservan un 99% de identidad de secuencia aminoacídica. De las 6 mutaciones identificadas, 5 se encuentran dentro del dominio amidasa y una en el dominio sintetasa. Ninguna de las mutaciones involucra residuos reportados como esenciales para la actividad de la enzima. Es importante remarcar que, esta CfGspS ya fue caracterizada (Comini, 2005), y se pudo determinar que la misma presenta actividad biosintética de Gsp en ensayos *in vitro* (Fig 52).

Para expresar la CfGspS en *T. brucei*, se seleccionó el vector pHD1034 que permite expresar proteínas de manera constitutiva incorporándoles un *tag* de una hemaglutinina de influenza humana (HA) en el extremo N-terminal. Este es un sistema basado en la integración del vector en el locus transcripcionalmente quiescente del espaciador del ARN ribosomal (*non transcribed ribosomal RNA spacer*) y donde la expresión de la secuencia en estudio blanco es controlada por el promotor constitutivo PARP de *T. brucei*. La integración del vector se selecciona por resistencia al antibiótico puromicina.

Luego de amplificado, el gen fue ligado al vector pHD1034 y la construcción linealizada con la enzima *SphI* (Fig. 51B y C, respectivamente). Esta construcción presenta un único sitio de corte para esta endonucleasa que se ubica en la región ribosomal no traducida (R-NTS/P), lo cual facilita su linealización y posterior integración al genoma por recombinación homóloga.

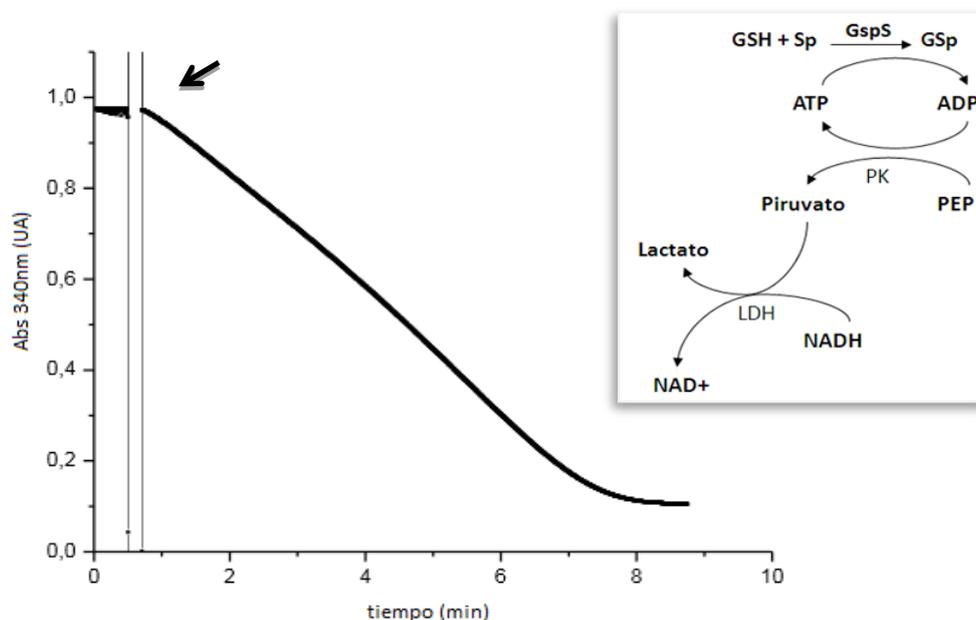


Figura 52. Determinación de la actividad sintetasa de la CfGspS recombinante. En el recuadro superior se indica la reacción enzimática acoplada utilizada para medir la actividad de 12,6 μg de CfGspS recombinante. La reacción enzimática conecta de manera estequiométrica el consumo de ATP (o producción de ADP) por la GspS a la oxidación de NADH por la lactato deshidrogenasa (LDH). En este ensayo, la piruvato quinasa (PK) enlaza ambas reacciones al regenerar ATP a partir de ADP y fosfoenol piruvato (PEP), y producir piruvato, que es convertido (reducido) en lactato por la LDH a expensas de NADH. La oxidación de NADH se monitoreó midiendo la absorbancia a 340 nm en función del tiempo. La flecha negra indica el agregado de espermidina para dar inicio a la reacción.

4.8.1. Caracterización de la línea ARNi-TbTryS + CfGspS

La construcción plasmídica linealizada fue transfectada en parásitos de la línea *T. brucei* ARNi-TryS, y su integración fue seleccionada por resistencia a puromicina, tal como se detalló en la sección 3.6.1.2. Al cabo de una semana de cultivo, se recuperaron 36 clones que integraron el plásmido. Se clasificaron en dos grupos de 12 los 24 clones obtenidos en la placa de cultivo correspondiente a la primera dilución (1:1), mientras que los restantes 12, provenientes de la dilución 1/10, fueron tratados como clones individuales. No se recuperaron parásitos viables en la placa de cultivo de la transfección diluída 1/100.

La caracterización de la línea se realizó por ensayos de RT-PCR y *Western blot*. De los 12 clones obtenidos, se seleccionaron cinco (A2, A4, B4, D3 y D4) a partir de los cuales se extrajo el ARN total (Fig. 53A) y se realizó una RT-PCR con un oligonucleótido sentido específico contra la CfGspS combinado con el oligonucleótido antisentido poliT. Como control negativo se incluyó la línea celular ARNi-TryS (-). Asimismo, como control de la calidad de la extracción de ARN se incluyó un control positivo que consistió en la amplificación del gen de la Tb-1-C-Grx3 con un oligonucleótido sentido específico y un antisentido poliT. En todos los casos, menos el control negativo (sin ADNc), se observó amplificación de un fragmento específico del tamaño esperado (Fig. 53B). El fragmento correspondiente al ARNm de la GspS del clon D4 se secuenció parcialmente, confirmándose su identidad y la ausencia de mutaciones.

A continuación, se tomaron muestras de cultivo de los clones A2, B4, D4, A4 y D3, así como de los dos grupos de 12 clones diferentes (P1 y P2 – dato no mostrado), las cuales se sometieron a análisis de *Western blot* con un anticuerpo anti-CfGspS. Estos ensayos incluyeron extractos de células de la línea ARNi-TryS como control.

Para el caso de los grupos P1 y P2 no se observó expresión alguna de la CfGspS (datos no mostrados). Esto puede deberse a que estas muestras están constituidas por una población heterogénea de líneas celulares (12 cada una) donde pueden co-existir clones productores y no productores de CfGspS, lo cual, dependiendo de la proporción de cada uno de ellos, podría provocar un efecto de dilución que impediría la detección de la proteína blanco.

En los extractos de los 5 clones individuales se detectó la presencia de una banda específica cercana a los 85 kDa (el peso molecular teórico de la CfGspS es de 81 kDa), que estaba ausente en el control negativo (Fig. 53C; los resultados para los clones A4 y D3 no se muestran). Sin embargo, llama la atención el bajo nivel de expresión de esta proteína si se la compara con otros trabajos que han empleado este sistema de expresión en la forma infectiva de *T. brucei* (Quijada, 2002; Ali, 2013). Más aún si se compara con los niveles de expresión de la GspS en *C. fasciculata*, obteniéndose valores de expresión unas 30 veces menores. Esto puede deberse a que el parásito esté reprimiendo la expresión de la copia ectópica del gen de la CfGspS, fenómeno que puede tener lugar a nivel post-transcripcional o traduccional. Si bien no se realizaron

PCR cuantitativas a partir de ADNc, dado que las condiciones de reacción fueron similares (concentración de ARN total, oligonucleótidos, programa, etc), podríamos especular que la menor señal obtenida para el amplicon de *gspS* en las líneas celulares A4, B4 y D3 es indicativo de una menor tasa de transcripción o vida media de este transcripto en estos clones, no así para las líneas celulares A2 y D4 que mostraron una señal del doble respecto a los otros clones (calculadas como señal de amplificación de *gspS*/1-c-grx3) y comparable con la obtenida para el gen control (1-c-grx3). En particular el clon D4 mostró el mayor nivel de expresión de CfGspS al normalizar contra el contenido de TR, una proteína con comportamiento *house-keeping* en *T. brucei* (Comini, 2007). De todas formas, los niveles de CfGspS son bastante bajos (en cualquiera de los clones analizados (Fig. 53C), lo cual, al menos en parte, difiere con los contenidos relativos de ARNm estimados para este gen en estos clones (Fig. 53B). Esto sugiere que la baja expresión de la proteína podría ser consecuencia de un fenómeno de regulación post-transcripcional, como es común en estos organismos (Clayton, 2007; Clayton 2013; Lustig, 2007) y/o de una baja vida media de la proteína, lo cual determina su inestabilidad y rápida degradación. Tampoco podemos descartar que la forma infectiva de *T. brucei* silencie de manera selectiva la expresión de este gen por considerarlo una molécula exógena y/o niveles altos de esta proteína terminen resultando nocivos para el parásito (por ej. porque Gsp no es capaz de sustituir a TSH₂, y/o porque altos niveles de GspS comprometen la homeostasis de poliaminas en este estadio del patógeno).

Para completar la caracterización de las líneas celulares transgénicas de *T. brucei* que expresan la CfGspS, se intentó determinar el contenido de tioles de bajo peso molecular en los clones A2 y D4 no inducidos e inducidos mediante la técnica de derivatización con monobromobimano y análisis cuantitativo por HPLC (sección 4.7). Si bien se detectaron picos diferenciales entre las muestras provenientes de los clones y la línea celular parental (ARNi-TryS), los mismos presentaban tiempos de retención que no se correspondían con los observados para los estándares. Esta situación, similar a la reportada aquí para muestras extraídas de *T. cruzi* (sección 4.7), nos impidió confirmar *in vivo* la integridad funcional de la CfGspS expresada en *T. brucei*.

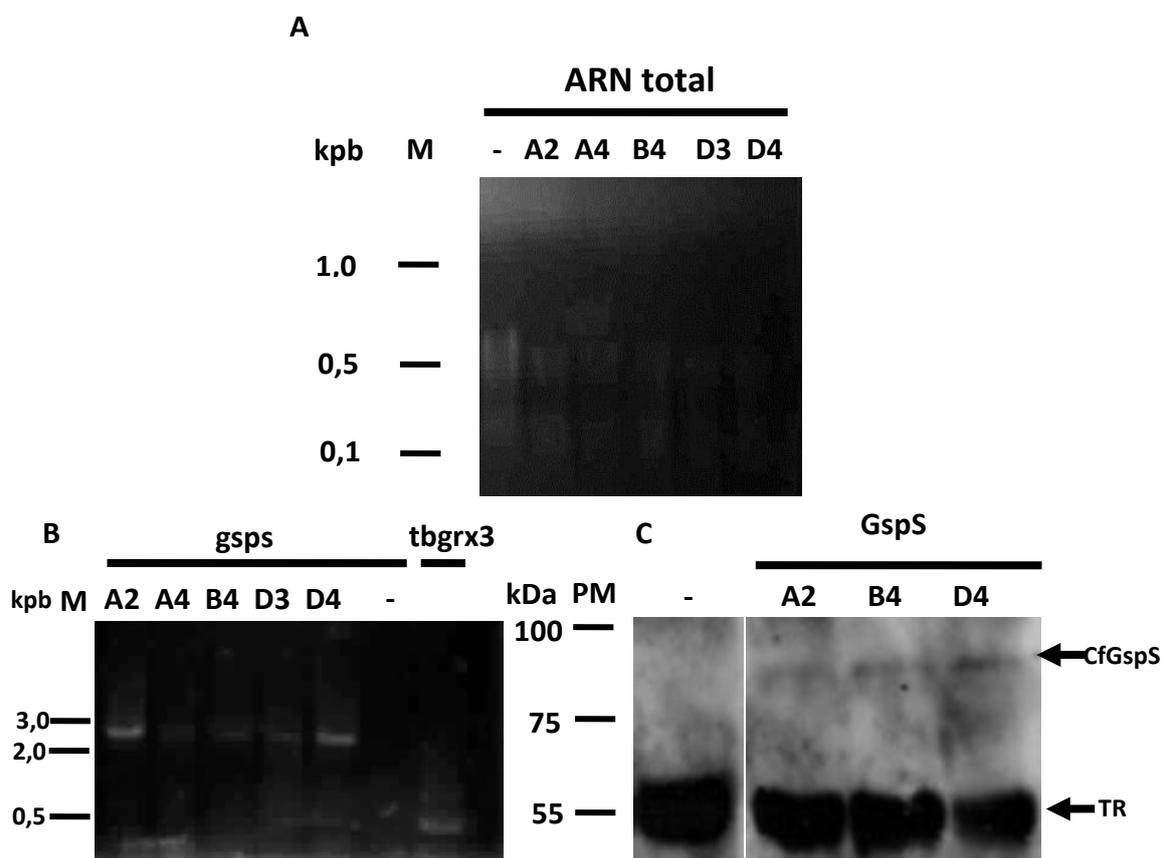


Figura 53. Caracterización de la línea celular ARNi-TryS de *T. brucei* sobreexpresante de una copia ectópica de CfGspS. (A) ARN total purificado de parásitos de las líneas ARNi-TryS (-) y ARNi-TryS + CfGspS (clones A2, A4, B4, D3 y D4), separado en un gel de agarosa al 1,2% p/v teñido con BrEt. En el gel se cargó un volumen de muestra equivalente al 20%. (B) Muestras de reacciones de PCR (10 μ L) correspondientes a: *cfgsps* (2,1 kpb, *gspS*), *tbgrx3* como control positivo (0,4 kpb, *tbgrx3*) y control negativo sin agregado de ADN (-), visualizadas en un gel de agarosa al 1% p/v teñido con BrEt. (C) *Western-blot* de extractos de 5×10^7 parásitos/carril correspondientes a los clones A2, B4 y D4 de la línea celular *T. brucei* ARNi-TryS transfectada con el vector pHD1034-CfGspS y a la línea ARNi-TryS sin transfectar (-). Se empleó suero de ratón anti-CfGspS (dilución 1/500) y de conejo anti-TR (dilución 1/1000). El tiempo de exposición y revelado fue de 20 minutos y 30 segundos, respectivamente. M: marcador de tamaño molecular y PM: marcador de peso molecular.

Si bien existen reportes de la funcionalidad de esta enzima tanto *in vitro* como *in vivo* en *C. fasciculata* (M. Comini, 2005; Koenig 1997; Smith, 1992), como una medida de control alternativa, se procedió a determinar la actividad de la misma enzima pero producida por *E. coli*. La Fig. 52 muestra un curso temporal para un ensayo acoplado de oxidación de NADH por consumo de ATP catalizado por la CfGspS en presencia de GSH y Sp. Allí se aprecia que *in vitro* la enzima presenta la actividad esperada.

De todas formas, y para completar la caracterización de la línea, se tiene como plan a corto plazo confirmar la actividad de la enzima en condiciones *in vivo* mediante la medición de tioles intracelulares de bajo peso molecular o la determinación de actividad GspS en extractos de la línea ARNi-TryS inducida, de manera de reducir la contribución de la TryS endógena a la actividad catalítica (se recuerda que la Trys es capaz de catalizar la conjugación de GSH a SP).

4.8.2. Estudio de complementación funcional por parte de la CfGspS en una línea celular de la forma infectiva de *T. brucei* depletada en TryS

Para demostrar si Gsp es capaz de sustituir las funciones de tripanotión en la forma sanguínea de *T. brucei*, se realizaron curvas de crecimiento continuo y de repique cada 24 hs (sección 3.6.2.1.) para los clones A2, B4 y D4 de la línea celular ARNi-TbTryS+CfGspS y, como control, para la línea celular parental ARNi-TbTryS.

El ensayo de crecimiento en modo continuo se inició con un inóculo de 1×10^4 parásitos/mL incluyéndose cultivos no inducidos e inducidos con 10 $\mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina (+TET) y efectuando recuentos cada 24 hs. El análisis de la curva de crecimiento para la condición de no inducción muestra un patrón de crecimiento típico (Fig 54A, símbolos negros): i) crecimiento exponencial durante los primeros tres días con un tiempo de duplicación estimado en 6 horas; ii) ingreso a la fase estacionaria entre los días 3 y 4, caracterizada por un enlentecimiento en el crecimiento celular y/o un coeficiente de crecimiento neto cercano a cero debido a que la tasa de proliferación iguala a la de muerte de los parásitos.; iii) fase de muerte celular, que se inicia en el día 4 y culmina en el 5, y se destaca por el descenso abrupto de al menos 3 órdenes de magnitud en la densidad celular. Al no detectarse diferencias significativas en el patrón de crecimiento entre los clones y la línea parental, podemos concluir que la expresión constitutiva de CfGspS no confiere ninguna ventaja metabólica a la forma infectiva del tripanosoma africano cultivada en condiciones de crecimiento óptimo.

Las líneas celulares inducidas, todas sin distinción (Fig 54A, símbolos blancos), mostraron una marcada incapacidad para proliferar, que se comienza a notar a partir del segundo día de cultivo y perdura hasta el final del mismo. Al tercer día, el crecimiento se detiene y da comienzo a una etapa de marcada muerte celular. Si bien

este patrón fenotípico es esperable para la línea parental ARNi-TryS (Comini, 2004; Torrie, 2009b), el hecho de observarlo también en la línea celular complementada con la CfGspS sugiere que bajo estas condiciones de expresión y crecimiento esta última enzima es incapaz de surrogar la función de la TryS.

El fenotipo de crecimiento de todas estas líneas celulares inducidas y no inducidas fue también evaluado bajo condiciones de cultivo en modo discontinuo partiendo de un inóculo inicial de 1×10^5 parásitos/mL y realizando diluciones en medio fresco hasta llegar a la densidad celular del inóculo si luego de recuentos diarios se determinaba que esta la superaba. La figura 54B muestra la densidad celular inicial y la alcanzada en cada ciclo de 24 hs. Se observa como las líneas ARNi-TbTryS y ARNi-TryS+CfGspS A2, B4 y D4 sin oxitetraciclina mantuvieron una velocidad de duplicación casi constante (6,5 hs) durante los días en que se desarrolló el experimento (Fig. 54B, símbolos negros). Sin embargo, para todas las líneas celulares inducidas, se observa una disminución en la tasa de proliferación a partir del día 2 respecto a los controles (Fig. 54B, símbolos blancos).

En este formato de cultivo, al tercer día el crecimiento de las líneas celulares inducidas se detiene y da comienzo a una etapa de marcada muerte celular que se extiende hasta el día 6-7, lo cual ya se ha sido visto corresponde con una disminución de los niveles de TbTryS hasta valores de 5% de los iniciales (Fiestas, Tesina de Grado). Esto mismo se corresponde con lo observado en las curvas de crecimiento continuo. A partir del día 7 se observa una recuperación del cultivo retornando la densidad celular a valores normales, lo cual está asociado al escape de la inducción del silenciamiento de la TbTryS (ver sección 4.10). El silenciamiento y la recuperación (reversión de fenotipo, datos no mostrados – ver sección 4.10) de la expresión de TryS tanto para la línea ARNi como para los clones expresantes de la CfGspS, fue confirmada por ensayos de *Western blot* (Fig. 55).

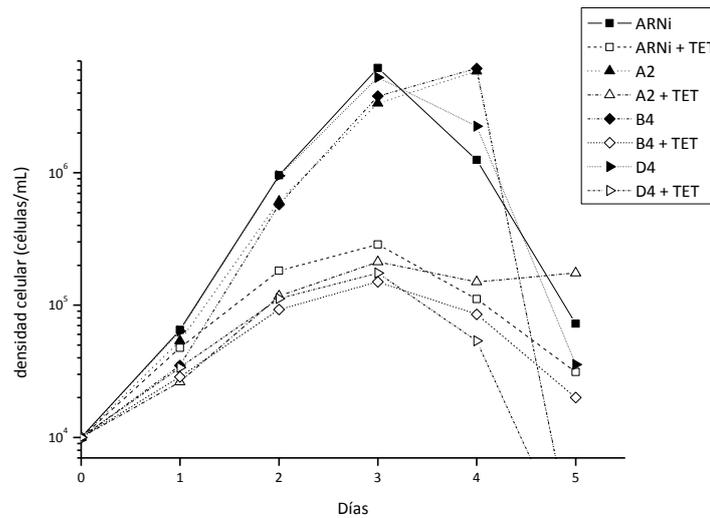
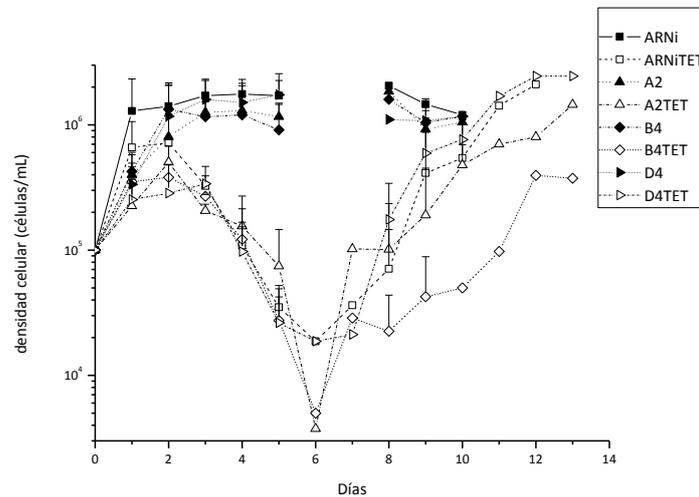
A**B**

Figura 54. Complementación metabólica por CfGspS en la forma infectiva de *T. brucei* depletada de TryS. (A) Curvas de crecimiento continuo, donde se grafica la densidad celular (parásitos/mL) en función de los días. Las líneas ARNi-TbTryS y ARNi-TbTryS + CfGspS (\pm TET) fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 parásitos/mL y cultivadas durante un total de 5 días en ausencia (símbolos negros) o presencia (+TET, símbolos blancos) de $10 \mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina. Cada 24 horas se realizó el recuento celular y el agregado de oxitetraciclina en los cultivos correspondientes. (B) Curvas con resembrado cada 24 horas, donde se grafica la densidad celular en función de los días. Las líneas celulares fueron sembradas a una densidad de 1×10^5 parásitos/mL y cultivadas durante un total de 13 días en ausencia (símbolos negro) o presencia (+TET, símbolos blancos) de $10 \mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina. Cada 24 horas, se determinó la densidad celular de los cultivos y en caso de crecimiento estos fueron iniciados nuevamente a una densidad de 1×10^5 parásitos/mL y renovando el medio con $10 \mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina fresca ($n=3$ + desviación estándar).

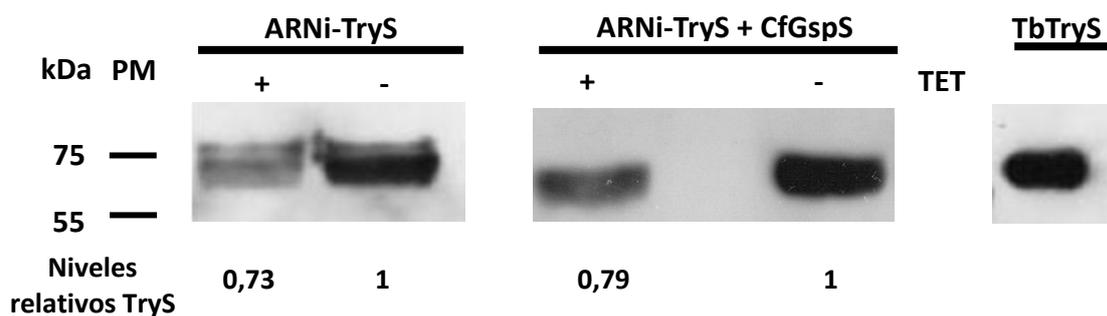


Figura 55. Determinación de los niveles de TbTryS en líneas celulares de *T. brucei*. *Western-blot* a partir de extractos solubles de $2,5 \times 10^7$ parásitos/carril con un anticuerpo policlonal de ratón anti-TbTryS a una dilución 1/500 para cuantificar los niveles de TryS en el clon D4 de la línea celular *T. brucei* ARNi-TbTryS transfectada con el vector pHD1034-CfGspS (ARNi-TbTryS+CfGspS). Los cultivos fueron incubados sin (-) o con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oxitetraciclina durante 48 hs. Extractos de 2×10^7 parásitos/carril de la línea ARNi-TbTryS se incluyeron como control. TbTryS: 300 ng de proteína recombinante TbTryS. En la parte inferior se indican los niveles relativos de TryS cuantificados por densitometría con el programa ImageJ. La membrana teñida con Ponceau-S sirvió como control de carga, asignándole un valor arbitrario de 1 a la señal obtenida para cada control de ARNi-TbTryS. Se trabajó con un tiempo de exposición y revelado de 20 minutos y 30 segundos, respectivamente. PM: marcador de peso molecular.

De los resultados de ambos experimentos, se puede concluir que no existen diferencias significativas entre el fenotipo de la línea control ARNi-TryS y las líneas expresantes de CfGspS cuando en ambas se fuerza el silenciamiento de la expresión de la TryS. Las posibles explicaciones para este comportamiento (es decir la incapacidad de la línea celular con expresión constitutiva de CfGspS de revertir o al menos mitigar el fenotipo del ARNi de la TryS) pueden radicar en que: i) el nivel de expresión alcanzado para CfGspS es insuficiente para generar una cantidad de Gsp que permita complementar funcionalmente a $\text{T}(\text{SH})_2$ cuando el contenido de este último desciende, o ii) el monotiol Gsp no es capaz de sustituir en un contexto fisiológico las funciones del ditioil $\text{T}(\text{SH})_2$, asumiendo que aún un nivel de expresión bajo de la CfGspS puede redundar en niveles medios o altos de Gsp.

Para responder esos interrogantes, es imprescindible culminar la puesta a punto de la cuantificación de tioles por HPLC comenzada en el laboratorio, de manera tal que nos

permita identificar y determinar la cantidad de Gsp producida por las líneas celulares expresantes de CfGspS.

Aquí es oportuno comentar que una aproximación similar a este interrogante (validación biológica de GspS y TryS), pero con *L. infantum* como modelo, fue abordada por el laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad de Porto (Dra. Helena Castro, Portugal) con colaboración de nuestro grupo. En ese trabajo se sobreexpresó la LiGspS en una línea celular de *L. infantum* simple KO para LiTryS (gen esencial), es decir que retiene uno de los dos alelos codificantes para esta proteína. Bajo estas condiciones no se observó un fenómeno de rescate del fenotipo del parásito ni tampoco se pudo obtener un doble KO para TryS, por lo que los autores concluyeron que Gsp no es capaz de reemplazar las funciones de T(SH)₂ (Sousa, 2014). El gran problema con esta aproximación es que se utilizó una GspS no caracterizada bioquímicamente (nota: no se pudo expresar en *E. coli* la forma soluble de LiGspS) ni tampoco se determinó *in vivo* la actividad biosintética de GspS mediante análisis de tioles de bajo peso molecular o mediciones de actividad enzimática. Por esta razón nuestra aproximación, que utiliza una enzima completamente caracterizada, representaría un mejor modelo para interrogar esta incógnita que aún debe ser complementada con el análisis de tioles.

De confirmarse la falta de complementación entre GspS y TryS, este escenario resultaría sumamente positivo en el marco del desarrollo de fármacos que actúen inhibiendo la actividad de la enzima TryS (actualmente uno de los blancos farmacológicos más destacados del metabolismo redox de estos patógenos, (Flohé 2012)), ya que no sería necesario considerar a la enzima GspS - en las especies que la expresen - como diana adicional y, por otro lado, se reducirían las chances de generación de resistencia por falta de redundancia funcional entre ambas enzimas. En la situación opuesta, esto obligaría a diseñar compuestos con actividad inhibitoria (en una misma molécula o en compuestos individuales) contra ambas enzimas.

4.9 Aproximación al modo de acción de ciertos compuestos sobre la forma infectiva de *T. brucei*

Muchas de las enzimas pertenecientes al metabolismo redox dependiente de tripanotión han sido validadas como blancos terapéuticos, lo cual ha promovido la búsqueda e identificación de compuestos con potencial para interferir con sus funciones (revisado recientemente por Comini y Flohe 2013, en *Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery*).

En ese sentido, en el marco de una campaña de *screening* de compuestos con actividad inhibitoria de TryS o anti-proliferativa de tripanosomátidos que se viene desarrollando en nuestro laboratorio, y en colaboración con químicos locales y del exterior, hemos logrado identificar varios *hits* dirigidos contra la TryS o bien con citotoxicidad selectiva contra la forma infectiva de *T. brucei* (Demoro et al. 2012; Peña, 2014; Fernández, 2013; Maiwald, 2014; Benítez, Fiestas y col. en preparación). Con la finalidad de indagar sobre el mecanismo de acción de algunos compuestos destacados que surgieron de estos trabajos, seleccionamos tres derivados de diaminas N,N'-bis(bencil)-sustituidas (DAB; Caminos, 2012) y tres derivados de una lactona de sesquiterpeno (STL; Schmidt, 2009)(Tabla 3). La primera serie de compuestos fue originalmente reportada como potentes inhibidores de la proliferación de distintas especies de tripanosomátidos (CE₅₀ submicromolar; Caminos, 2012) y presentan un núcleo estructural (cadena alifática con grupos aminos terminales sustituidos) que los convierte en candidatos a interferir con la función de proteínas que sinteticen o dependan del uso de poliaminas. Nuestros ensayos mostraron que estos compuestos, EAP 1-47, EAP 1-63 y APC 1-99, fueron de los pocos en exhibir actividad inhibitoria contra TryS multiespecies (ej. *L. infantum*, *T. cruzi* y *T. brucei*) con valores de CI₅₀ 30 μM aproximadamente (Benítez, Fiestas y col. en preparación). En el caso de los derivados de STL, denominados como TS1, TS2 y TS3, estos son de origen natural y fueron previamente reportados como altamente activos (CE₅₀ <1 μM) contra diferentes hemo parásitos (*T. brucei rodhesiense*, *L. donovani*, *L. major*, *T. cruzi* y *Plasmodium falciparum*; Oketch-Rabah, 1998; Schmidt, 2002; Nour, 2009; Schmidt, 2009). Gran parte de la actividad de las STL reside en la presencia de un elemento estructural (carbonilo) α,β-no saturado que lo convierte en un grupo aceptor de

Michaels (Schmidt, 2009), altamente reactivo contra moléculas nucleofílicas como suelen ser los tioles redox activos de proteínas o moléculas de bajo peso molecular (ej. GSH, T(SH)₂). Si bien estos compuestos no inhibieron de manera significativa a las distintas TryS evaluadas (Benítez, Fiestas y col. en preparación), fueron incluidos en los estudios de este trabajo por las propiedades descritas anteriormente y su potencial modo de acción que involucre la depleción de tioles (Tabla 3).

La aproximación empleada para determinar si el mecanismo de acción de estos compuestos podía implicar una interferencia con el metabolismo del tripanotión consistió en evaluar su citotoxicidad contra la línea celular de *T. brucei* ARNi-TryS en condiciones de depleción o basales de TryS. Si TryS y/o alguna proteína dependiente de tripanotión fuera el blanco molecular de estos compuestos, al disminuir la concentración de TryS por inducción de su silenciamiento, se espera que esto resulte en un incremento de la potencia de dicho compuesto o, en otras palabras, un aumento en la sensibilidad del parásito contra los mismos.

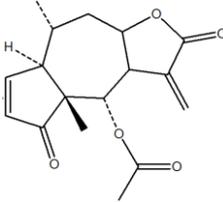
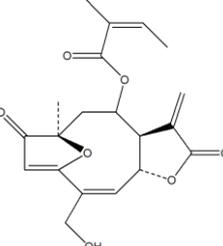
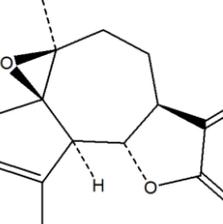
La actividad biológica de los derivados de DAB y STL fue evaluada utilizando un método puesto a punto en nuestro laboratorio que incluye lecturas de viabilidad celular por técnica de citometría de flujo (Lic. Diego Charquero, Tesina de Grado) o recuento en cámara de Neubauer (ambos descritos en la sección 3.10.1; Fig. 56).

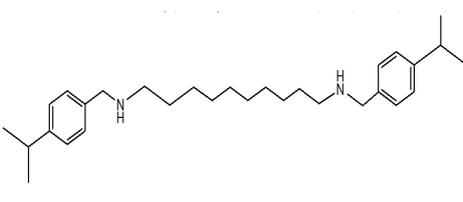
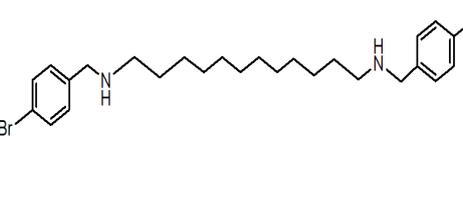
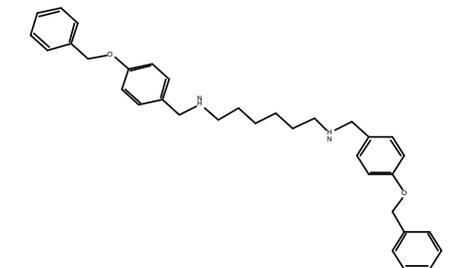
Tabla 3. Lista de compuestos evaluados por ensayo semi-automatizado contra la forma infectiva de *T. brucei*. En la siguiente tabla se presentan los siete compuestos evaluados y al nifurtimox (NFX) que fue utilizado como compuesto control a su CE_{50} .

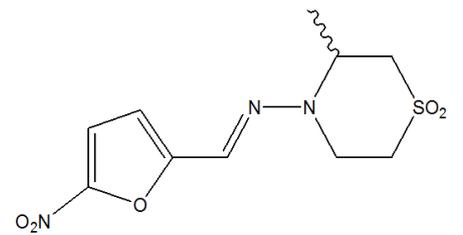
Los compuestos en estudio fueron sintetizados en los laboratorios del Dr. Thomas Schmidt (IPBP, Muenster University, Alemania; TS1, TS2 y TS3) y del Dr. Guillermo Labadie (IQUIR, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina; EAP 1-47, EAP 1-63 y APC 1-99).

La nomenclatura abreviada para los núcleos estructurales es la siguiente: **STL**, derivado de una lactona de sesquiterpeno; **DAB**, derivado de una diamina N,N'-bis(bencil)-sustituida y el control **NFX**, derivado de 2-nitrofurano.

Los porcentajes de inhibición fueron determinadas por ensayos *in vitro* contra la proteína recombinante de TbTryS (Benitez, Fiestas y col, no publicado) utilizando una concentración fija de compuesto de 30 μ M. * para NFX se reporta el valor de CE_{50} en *T. brucei*.

Nombre	Núcleo estructural	Estructura	Masa Molecular	% actividad Try a 30 μ M compuesto
TS 1	STL		304,338	103,6 \pm 5,2
TS 2	STL		374,384	101,2 \pm 5,9
TS 3	STL		246,301	103,4 \pm 7,3

Nombre	Núcleo estructural	Estructura	Masa Molecular	% actividad TryS a 30 μ M compuesto
EAP 1-47	DAB		436,716	48,9 \pm 4,2
EAP 1-63	DAB		538,401	52,5 \pm 2,8
APC 1-99	DAB		508,694	51,1 \pm 1,7

NFX	NF		287,292	32,2 \pm 5,2*
-----	----	--	---------	-----------------

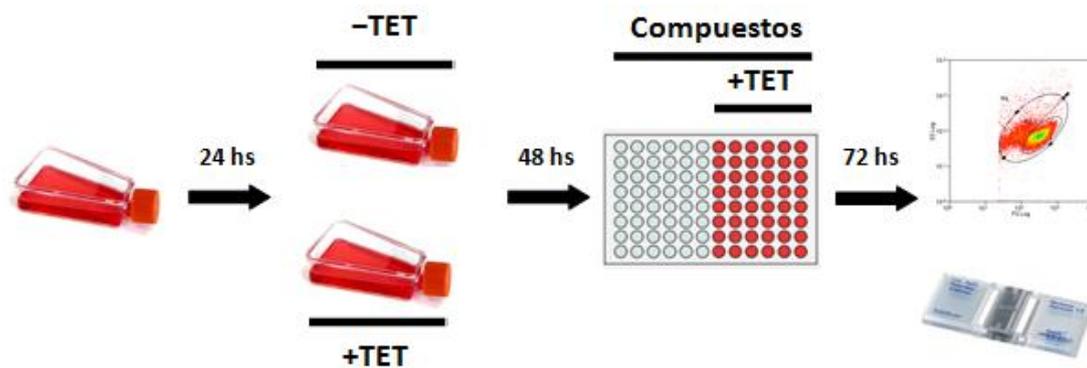


Figura 56. Esquema del ensayo semi-automatizado para evaluación de actividad biológica de compuestos contra *T. brucei*. El ensayo se realiza en placa de cultivo de 96 o 24 pocillos sobre la línea celular 514-1313 (línea parental) y ARNi-TbTryS de la forma infectiva de *T. brucei*. A las 48 hs antes del inicio del ensayo y cada 24 hs se realizan pasajes sucesivos de los parásitos mediante siembra a una densidad de $0,5 \times 10^6$ parásitos/mL en medio de cultivo fresco. En el segundo de estos pasajes, uno de estos cultivos recibe $10 \mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina para inducir el ARNi. Al cabo de 24 hs de inducción, en cada uno de los pocillos se colocan los compuestos disueltos en DMSO o el propio disolvente (control) y luego 0,2 mL (placa de 96 pocillos) o 1 mL (placa de 24 pocillos) del cultivo de parásitos resuspendido en medio fresco (con o sin oxitetraciclina, según corresponda) a una densidad de $0,5 \times 10^6$ parásitos/mL. Luego las placas se incuban por 24 hs. De esta forma se logra una inducción del ARNi de la TbTryS por 48 hs totales. El recuento celular se realizó por citometría de flujo y/o en cámara de Neubauer. Si el mecanismo de acción de estos compuestos tuviera a la TryS o a alguna función dependiente del T(SH)_2 como blanco, niveles bajos de esta enzima (ARNi de TbTryS inducido) deberían aumentar la sensibilidad del parásito por los mismos (CE_{50} ARNi-TbTryS inducido $<$ CE_{50} ARNi-TbTryS no inducido $<$ CE_{50} cepa parental).

En paralelo al análisis de los compuestos, se determinó el contenido de TryS en cada una de las líneas empleadas y no tratadas con compuestos. Esto es sumamente importante para poder asociar cambios en la citotoxicidad de los compuestos con variaciones en los niveles de TryS. Se determinó que en la línea ARNi-TryS sin inducir, la TryS se expresa en promedio un 30% menos que en la línea parental (514-1313). Esta disminución en los niveles de TryS en ausencia de inductor ya fue observada (Medeiros, Fiestas y col, sin publicar), y se debe a que existe cierta ineficiencia en el bloqueo de la transcripción por el represor TetR, cuyo efecto, no obstante, no llega a producir un fenotipo letal, ya que aún retiene al menos un 70% de actividad TryS. Por otro lado, la inducción con oxitetraciclina durante 48 hs produjo una caída del 50% en el contenido de TryS (Fig. 57).

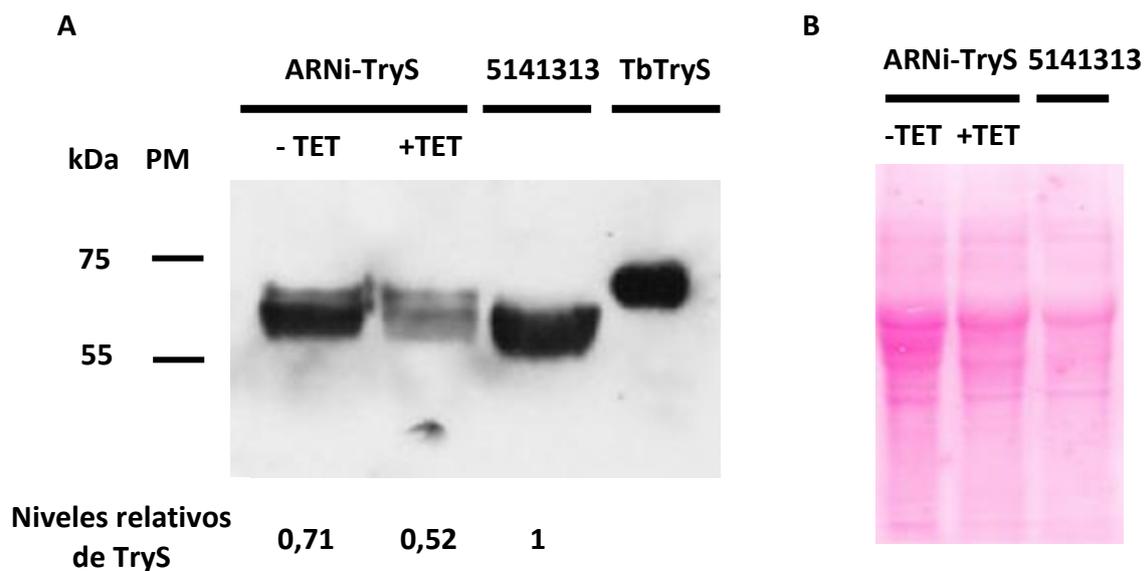


Figura 57. Cuantificación de los niveles de TryS en las líneas celulares de *T. brucei* utilizadas para la evaluación de los compuestos. (A) Ensayo de *Western blot* para 200 ng de TbTryS recombinante (TbTryS) y extractos de 2×10^7 parásitos/carril de las líneas celulares *T. brucei* 514-1313 y ARNi-TryS \pm TET. El ARNi se indujo por 48 hs con 10 μ g/mL de oxitetraciclina (+TET) y el anticuerpo policlonal de ratón anti-TbTryS se usó a una dilución 1/1000. En la parte inferior se muestran niveles relativos de TryS estimados por densitometría y comparados contra el contenido de esta proteína en la línea celular control (514-1313) al cual se le asignó un valor arbitrario de 1. (B) Tinción por Ponceau-S de las proteínas de extractos de parásitos que sirvió como control de carga. El tiempo de exposición y revelado del ensayo de *Western blot* fue de 20 minutos y 30 segundos, respectivamente. PM: marcador de peso molecular.

Si bien se podría haber trabajado con tiempos de inducción mayores para lograr reducir aún más la concentración intracelular de TryS (por ej., a las 72 hs los niveles de TryS caen un 95%; Fig. 59C), en esas condiciones la viabilidad de los parásitos se ve muy comprometida lo cual por un lado indica un marcado deterioro en varias funciones celulares que podría complicar la interpretación de los resultados y, por otro lado, nos exigiría trabajar con mayores volúmenes de medio de cultivo para alcanzar una cantidad suficiente de células para el ensayo. Por estas razones se optó por ensayos que incluyeran la inducción del ARNi por 48 hs, de las cuales en las últimas 24 hs se expondrían los parásitos a los compuestos.

En primera instancia se trabajó con la línea *T. brucei* 514-1313. Los compuestos se probaron a diferentes concentraciones, ajustadas de acuerdo a la actividad y

Tabla 4. Actividad biológica de compuestos contra la forma infectiva de *T. b. brucei*

	CE₅₀ referencia	CE₅₀	CE₅₀ J774	IS
	(nM)*	(nM)**	(μM)	
APC 1-99	140	14 ± 1	1-11	>71
EAP 1-47	200	195 ± 15	7,5-10	>38
EAP 1-63	80	86 ± 12	10-15	>116

* CE₅₀ reportados en la literatura, determinados sobre *T. brucei* línea 427 (Caminos et al. 2012)

** CE₅₀ determinados en esta tesis sobre *T. brucei* línea 514-1313.

El índice de selectividad (IS) fue calculado como dosis tóxica (CE₅₀ J774)/ dosis efectiva (CE₅₀*T.brucei*)

solubilidad en DMSO de cada uno de ellos. Se incluyó un control positivo de viabilidad: DMSO al 1% y controles de 50% de viabilidad: Nifurtimox 5 y 15 μM.

Posteriormente se trabajó con la línea *T. brucei* ARNi-TryS no inducida e inducida por 48 hs, utilizando inicialmente las mismas concentraciones de compuesto que sobre la línea 514-1313 y luego realizando los ajustes necesarios para la determinación de la CE₅₀. Para el caso de los resultados en la línea *T. brucei* 514-1313, las curvas dosis respuesta se construyeron graficando % citotoxicidad vs. Log [Conc.] y ajustando a una función sigmoide de Boltzmann. A partir de los datos del ajuste, se calculó la CE₅₀ utilizando un método de derivadas. Todos los resultados de los compuestos evaluados se presentan en la Tabla 4 y 5.

Los compuestos APC 1-99, EAP 1-47 y EAP 1-63 evaluados en la línea 514-1313 presentaron CE₅₀ del orden de nM siendo los valores de las mismas 14, 195 y 85 nM, respectivamente (Tabla 4). Estos resultados concuerdan con lo obtenido por otros autores que emplearon una línea celular diferente de *T. brucei* (Caminos, 2012), salvo por APC 1-99 que en nuestros ensayos presentó una potencia un orden de magnitud superior. Paso seguido se determinó el rango de citotoxicidad de estos compuestos contra macrófagos J774 (Tabla 4), estableciéndose que todos ellos presentan un buen índice de selectividad, con valores aproximados mayores a 71, 38 y 116 para APC 1-99, EAP 1-47 y EAP 1-63, respectivamente.

Utilizando nifurtimox (NFX) como compuesto modelo cuyo modo de acción en tripanosoma involucra la depleción de tioles de bajo peso molecular (Boiani, 2010),

observamos una marcada sensibilidad de la línea celular ARNi-TryS inducida (90% de muerte) respecto de la no inducida (50% de muerte) al tratamiento con 5 μ M de este derivado de nitrofurano.

En la evaluación de la sensibilidad de la línea ARNi-TryS no inducida e inducida y tratada con distintas DAB surge que APC 1-99 (1,5 nM) y EAP 1-63 (200 nM) presentan el mismo grado de citotoxicidad sobre parásitos con niveles normo- y sub-normo de TryS. Únicamente EAP 1-47 (100 nM) incrementó cerca de un 25% su citotoxicidad sobre la línea celular con un contenido reducido en TryS (50%; Tabla 5). Por lo tanto para esta serie de compuestos podemos concluir que su principal modo de acción no involucra a componentes del sistema redox dependiente de tioles. Esto no solo se appoya en la disparidad observada entre actividad inhibitoria de TryS (\sim 30 μ M) y citotóxica contra la forma infectiva del parásito (<0,25 μ M) sino también en el nulo o marginal incremento de su actividad biológica sobre una línea celular depletada en TryS.

Aplicando un procedimiento idéntico al descrito más arriba, excepto que se excluyó la determinación de citotoxicidad contra líneas celulares de mamíferos, la evaluación de la actividad biológica de los derivados de STL sobre líneas ARNi-TryS inducidas y no inducidas mostró que todos ellos exhibieron, si bien en distinto grado (1,7 a 3,6 veces), mayor toxicidad contra parásitos depletados en TryS (Tabla 5). De ellos el compuesto más destacado fue el TS2 para el cual se obtuvo una diferencia de sensibilidad entre la línea celular inducida y no inducida de 3,6 veces cuando este se ensayó a una concentración de 1 μ M. En contraposición a los análogos de DAB, para las STL podemos concluir que estos compuestos a pesar de no tener como blanco *in vitro* a la TryS (0 % inhibición de TryS testeados a una concentración de 30 μ M) los mismos están interfiriendo a nivel intracelular con funciones dependientes de T(SH)₂. Estos compuestos podrían estar formando aductos con GSH y T(SH)₂, conduciendo a su rápida depleción a nivel intracelular, como se describió recientemente para la cinaropicrina (Zimmerman, 2013), una lactona sesquiterpénica con un grupo metileno α,β insaturado. Algunos de estos aductos, por ej. los formados con T(SH)₂, lograron inhibir a la TR (Zimmerman, 2013), mientras que los monoadductos con GSH podrían interferir con la reacción de síntesis de la TryS. Tampoco podemos descartar que estos

Tabla 5. Actividad biológica diferencial de compuestos contra la forma infectiva de *T. b. brucei* línea ARNi-TryS. Evaluación del porcentaje de citotoxicidad (por detalles ver sección 3.10) de derivados de DAB y STL. Se detallan los resultados obtenidos para la línea ARNi-TryS no inducida (ARNi) o inducida por 48 hs (ARNi-TryS+TET).

	Concentración	% Citotoxicidad	
	compuesto (μM)	ARNi	ARNi+TET
APC 1-99			
	0,0015	1,4 \pm 2,0	3,5 \pm 8,0
EAP 1-47	0,1	76 \pm 4	98 \pm 1
EAP 1-63	0,2	77 \pm 4	77 \pm 4
TS1	1	93 \pm 7	90 \pm 2
	0,07	15 \pm 5	28 \pm 10
TS2	1	15 \pm 4	54 \pm 10
	0,07	0	2,5 \pm 11
TS3	10	90 \pm 4	89 \pm 1
	2,5	18 \pm 2	31 \pm 8

compuestos estén actuando sobre blancos adicionales, como otras proteínas (enzimas) que utilicen tripanotión y/o presenten tioles críticos para su función. Nuestros trabajos futuros se enfocarán en explorar esas posibilidades así como determinar en mayor detalle el modo de acción de estos compuestos y sus nuevos derivados.

4.10. Mecanismos epigenéticos de escape al silenciamiento post-transcripcional por ARN doble cadena *in vitro* e *in vivo*

Nos ha llamado la atención la reversión del silenciamiento de TbTryS por ARNi en parásitos *T. brucei* tanto *in vitro* como *in vivo* (Comini, 2004), Fiestas, Tesina de Grado y sección 4.8.2). Este fenómeno parece ser común a otras proteínas esenciales para el parásito cuya expresión es regulada a la baja por ARNi (algunos ejemplos en (Ammerman, 2013; Hashimi, 2009; Fisk, 2008; Motyka, 2004; Chen, 2003).

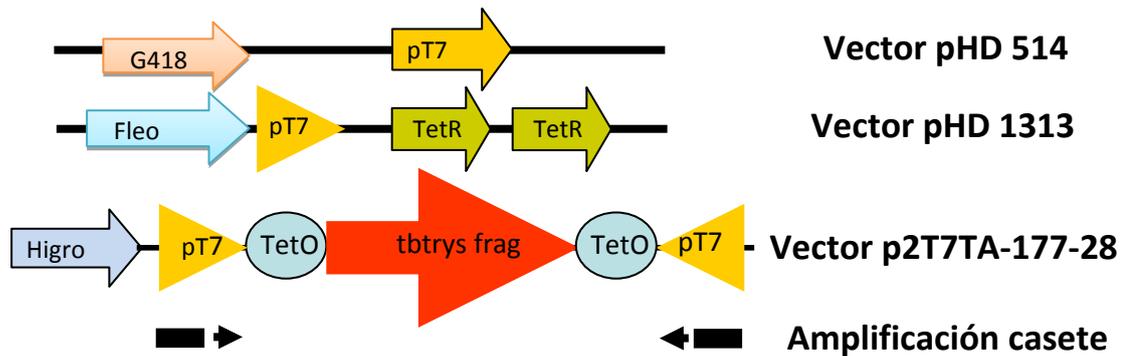


Figura 58. Sistema de silenciamiento post-transcripcional por ARNi de la TbTryS. Las construcciones de ADN necesarias para silenciar genes por ARNi en *T. brucei* se componen de: (i) el plásmido pHD514 que codifica para la T7-ARN polimerasa y confiere resistencia a geneticina (G418), (ii) el plásmido pHD1313 que contiene dos copias del gen de la proteína represora de tetraciclina (TetR) bajo la regulación de un promotor de T7-ARN polimerasa y confiere resistencia a fleomicina (Fleo) y (iii) el vector que contiene el casete con un fragmento de la secuencia del gen que se desea silenciar, en el caso de la TbTryS este es el plásmido p2T7TA-177-28a que presenta resistencia a higromicina (Higo) y dos promotores de T7 ubicados en sentido opuesto uno del otro y flanqueando la región de 1239-1884 pb de la secuencia de tbtrys; estos promotores se hallan bajo el control de operadores de tetraciclina (TetO). El gen de la T7-ARN polimerasa se expresa de manera constitutiva, y a su vez esta polimerasa transcribe la secuencia del gen de la TetR. En ausencia de tetraciclina, la proteína TetR se encuentra unida a las secuencias TetO, bloqueando la transcripción a partir de los promotores T7 e impidiendo así la formación del ARN doble cadena. La tetraciclina se une a la proteína TetR haciéndole perder afinidad a esta última por el TetO, lo cual permite que la T7-ARN polimerasa transcriba la secuencia de ADN y se generen hebras de ARN complementarias a partir del fragmento molde de tbtrys. Una vez formado el ARN doble cadena, la maquinaria del sistema de interferencia de ARN (ARNi) se encargará, a través de las proteínas DICER y RISC (Ullu, 2002), de degradar el ARNm de la TbTryS. Esto llevará a una disminución en los niveles proteicos de TbTryS, y por lo tanto también de Gsp y T(SH)₂. Las secuencias insertas en el casete de ARNi se pueden amplificar y secuenciar usando dos oligonucleótidos específicos (p2T7 y p2T7 term) que hibridizan en cada uno de los promotores T7, tal como se detalla el esquema.

Sin embargo muchos autores se reservan la publicación de figuras que muestren este fenómeno, ya que generalmente se presentan curvas de crecimiento acumulado o bien datos correspondientes a curvas de crecimiento durante tiempos cortos, donde aún no se produjo la reversión.

La primera explicación lógica que surge es que el parásito busca una manera de revertir una situación (metabólica, estructural) desfavorable para el mismo, que de otra forma lo llevará a su muerte. Teniendo en cuenta la gran plasticidad genética que

tienen estos parásitos (Myler 1993; Van der Ploeg, 1984), resulta sumamente interesante indagar sobre los mecanismos epigenéticos que podrían estar contribuyendo a este fenómeno de evasión al silenciamiento post-transcripcional.

Como ya fue explicado brevemente en la sección 4.8 el sistema para el silenciamiento post-transcripcional depende de la integración y estabilidad de tres plásmidos diferentes, el que codifica para: i) la T7-ARN polimerasa (plásmido pHD514, seleccionado por resistencia a geneticina – G418), ii) la proteína represora de tetraciclina (plásmido pHD1313, seleccionado por resistencia a fleomicina, y cuya expresión depende de la T7-ARN polimerasa) y iii) el casete de ARN de interferencia para la TryS de *T. brucei* (vector p2T7TA-177-28, seleccionado por resistencia a higromicina) que se encuentra inserto entre dos promotores T7 (Fig 58).

En teoría, alteraciones (mutaciones, inserciones, deleciones) en la secuencia de la T7-ARN polimerasa, en alguno de los promotores T7, en el operón de tetraciclina, la TetR o en el casete mismo de ARNi, podrían interferir/bloquear la transcripción de la secuencia de ADN del casete del ARNi o afectar la secuencia del ARN doble cadena generado de manera tal que esta no coincida con la secuencia de su blanco específico. Con respecto a esta última posibilidad, para que un ARNi sea funcional se requiere que la secuencia de ARNi presente al menos un 80% de identidad de nucleótidos con respecto a la secuencia de ARNm a ser silenciada (Alibu, 2005; Shi, 2000). Las mutaciones específicas a nivel de la secuencia del operón de tet (TetO) y la TetR podrían conducir a un incremento en la afinidad mutua receptor/ligando o bien a una pérdida marcada en la afinidad de la TetR por la tetraciclina, siendo el efecto en ambos casos un bloqueo de la transcripción por la T7-ARN polimerasa. Sin embargo, creemos poco probable que se esté dando este mecanismo ya que el mismo requeriría que ocurran varios ciclos de mutagénesis hasta que ocurran aquellas que modifican la selectividad ligando/receptor, fenómeno que difícilmente tenga lugar en los períodos de tiempo analizados. Otra posibilidad es que el parásito expulse de su genoma la región codificante para la T7-ARN polimerasa o el casete de ARNi, reteniendo los genes que le confieren resistencia a los antibióticos de selección, para el caso que el organismo esté siendo crecido en un medio que los contenga, como sería la situación

en condiciones de cultivo *in vitro*. Si no existiera presión de selección por estos antibióticos, como sucede en condiciones de infección *in vivo* (ver más adelante), entonces podría ocurrir que el parásito elimine de su genoma las secuencias completas (es decir incluyendo el gen de resistencia al antibiótico) de estos vectores.

Aquí nos planteamos tener una primera aproximación al mecanismo de escape al ARNi de la TryS que estaría operando en la forma infectiva de *T. brucei* crecida *in vitro* e *in vivo*. Para ello, la estrategia de estudio aplicada consistió en el análisis de la secuencia de ADN inserta en el casete del ARNi de la TbTryS obtenido a partir del ADN genómico de parásitos que revertieron el fenotipo en condiciones de crecimiento *in vitro* e *in vivo* (animales infectados).

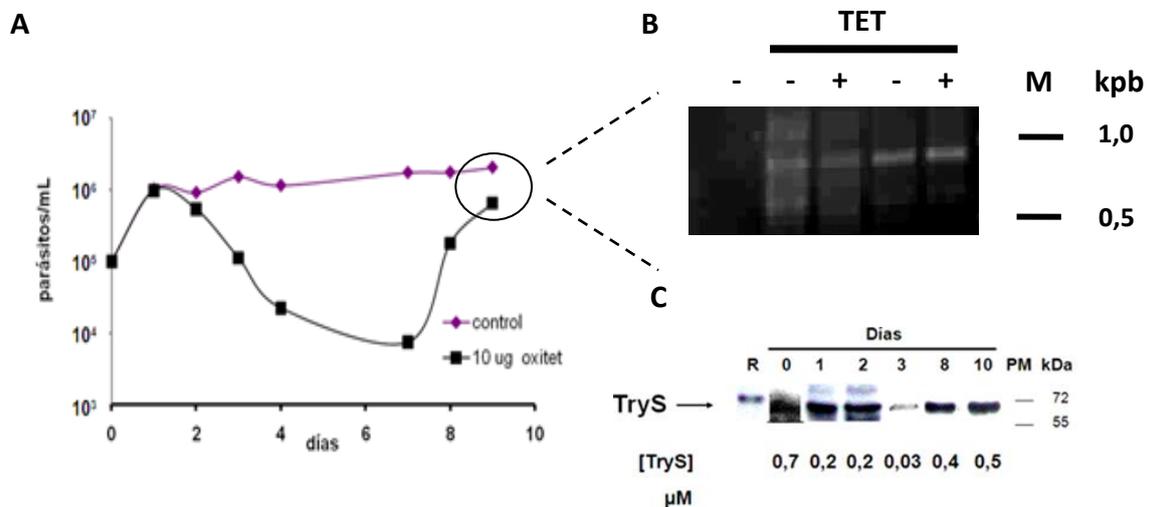


Figura 59. Mecanismos epigenéticos de escape al silenciamiento post-transcripcional por ARN doble cadena *in vitro*. (A) Fenotipo de crecimiento de la cepa interferente (densidad celular inicial de 1×10^5 parásitos/mL) inducida con $10 \mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina (negro) y sin inducir (control- violeta). Cada 24 horas, se realizó recuento celular y los cultivos con densidad mayor a 1×10^5 parásitos/mL fueron sembrados nuevamente a 1×10^5 parásitos/mL en medio fresco con y sin oxitet. (B) Gel de agarosa al 1% p/v teñido con BrEt y conteniendo muestras ($10 \mu\text{L}$) de las PCR para amplificar el casete de ARNi con los oligonucleótidos específicos p2T7 y p2T7 term. Las PCR se realizaron sobre ADN genómico de parásitos cultivados durante 10 días en ausencia (-TET) o presencia (+TET) de oxitretraciclina. Se incluyó un control negativo sin ADN (-). (C) *Western blot* de extractos de 6×10^6 parásitos/carril, a partir de cultivos de *T. brucei* ARNi-TryS en presencia de $10 \mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina. R, control con 5 ng de TbTryS recombinante. Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-TbTryS a una dilución de 1/500. Abajo, se muestra la concentración intracelular de TryS determinada de acuerdo a como se describe en la sección 8.4.6.

4.10.1. Infecciones de animales con *T. brucei* ARNi-TryS: curvas de parasitemia y sobrevida.

Hembras BALB/cJ de 6-8 semanas fueron inoculadas por vía intraperitoneal con 10^4 parásitos de la línea celular *T. brucei* ARNi-TryS sin inducir y pre-inducidos con oxitetraciclina 48 hs previas a su inoculación en el animal. Como control se utilizaron las líneas celulares 427 (WT) y 514-1313 transflectada con el vector de ARNi vacío (p2T7-177). Para las infecciones con cada una de estas líneas celulares se incluyó un grupo de animales que fue alimentado durante todo el experimento con agua conteniendo 1 mg/mL de oxitetraciclina, la cual se renovaba cada 48 hs, de manera tal de lograr inducir el ARNi de la TbTryS *in vivo*.

Cada 72-96 hs se extrajo una pequeña muestra de sangre para controlar la parasitemia y recuperar parásitos para su crecimiento en medio de cultivo agregado o no de distintas combinaciones de los antibióticos necesarios para mantener el sistema de silenciamiento de la expresión de la TbTryS por ARNi.

A partir de las curvas de parasitemia, se observó que todos los ratones de los grupos control (animales infectados con *T. brucei* 514-1313, 427, y ARNi-TbTryS que no recibieron oxitetraciclina) mostraron un aumento sostenido de la parasitemia a partir del cuarto día post-infección en adelante, el cual por sus altos niveles produjo el deceso de los animales infectados o bien nos obligó a proceder con su eutanasia por cuestiones de ética (por ej. cuando el estado general de salud del animal decayera notoriamente o cuando la parasitemia fuera $\geq 10^8$ parásitos/mL de sangre). Al cabo del día 12 post-infección no quedaron animales vivos en estos grupos (Fig. 60A).

Por el contrario, el grupo de ratones alimentados con oxitetraciclina e infectado con los parásitos ARNi-TryS inducidos mostró un desarrollo marcadamente lento de la parasitemia. Por ejemplo, al día 5 post-infección no se detectan parásitos en la sangre de estos animales mediante técnica de recuento en cámara de Neubauer (el límite de detección de este método para este tipo de muestra es de $2,5 \times 10^4$ parásitos/mL sangre), mientras que en los ratones de los grupos control la parasitemia alcanzaba o superaba el millón.

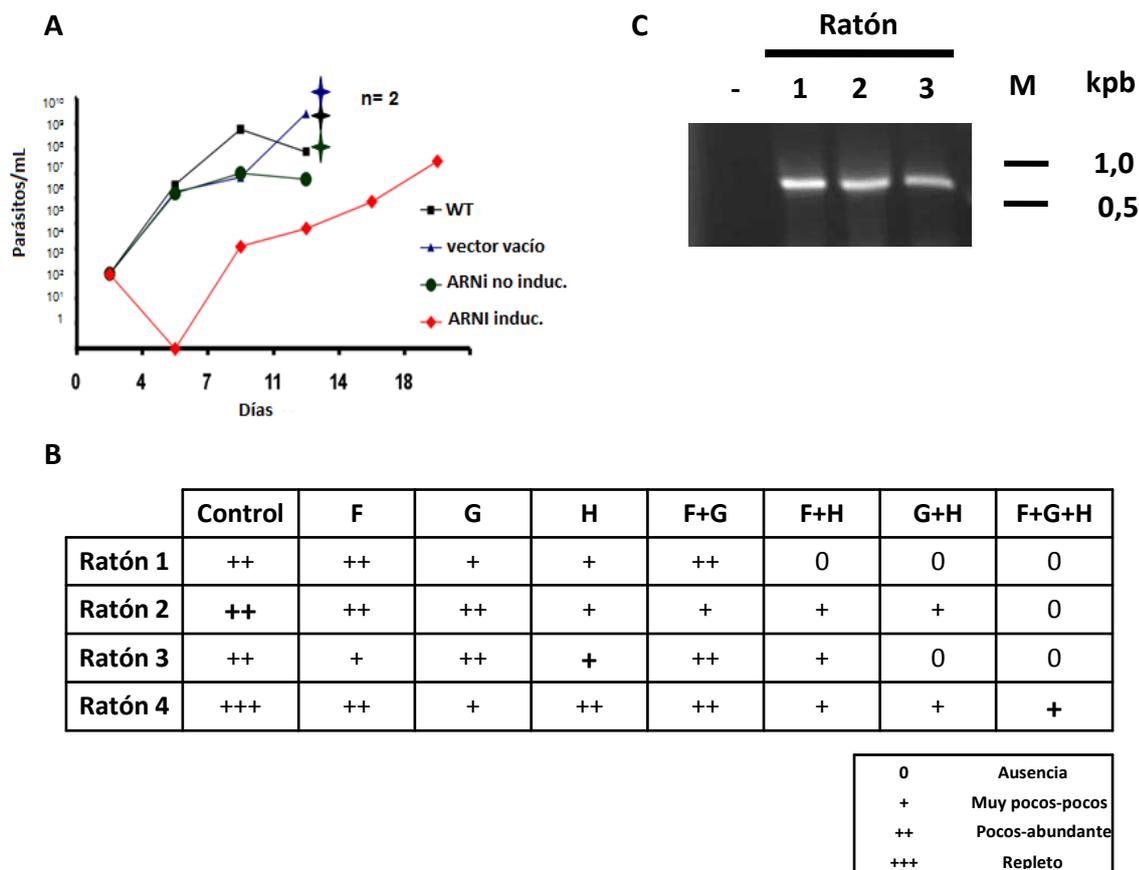


Figura 60. Mecanismos epigenéticos de escape al silenciamiento post-transcripcional por ARN doble cadena *in vivo*. (A) Curvas de parasitemia y sobrevida para ratones BALB/cJ infectados con líneas celulares monomórficas de *T. brucei*. Las infecciones se realizaron por vía intraperitoneal inyectando 300 μ L de amortiguador PBS con 1% glucosa v/v conteniendo 1×10^4 parásitos. El silenciamiento de TryS en la línea celular ARNi-TryS fue inducido *in vitro* 48 hs previo a la infección con 10 μ g/mL de oxitetraciclina (ARNi induc.). Los grupos control fueron infectados con parásitos ARNi-TryS sin inducir (ARNi sin induc.), cepa *wild type* 449 (WT) y parásitos transfectados con el vector de ARNi vacío. El grupo de animales ARNi induc. fue alimentado 72 hs previo a la infección, y durante el experimento, con agua con oxitetraciclina a una concentración final de 1 mg/mL. Las cruces indican la muerte de los animales causadas por la infección parasitaria. (B) Esquema con resultados semi-cuantitativos del crecimiento en medio de cultivo con diferentes combinaciones de antibióticos (los necesarios para mantener el sistema de ARNi funcional) de parásitos aislados de sangre de animales del grupo ARNi induc. F, fleomicina; G: geneticina; H: higromicina. Control: medio de cultivo sin antibióticos. Los parásitos recuperados de la sangre fueron cuantificados, y se inoculó la misma cantidad en todos los pocillos. Al cabo de 5 días, se procedió a inspeccionar al microscopio cada pocillo de la placa, aplicando el siguiente código de cuantificación: 0, ninguno; +, pocos; ++, abundantes; +++, repleto. En negrita se indican cuales parásitos fueron seleccionados para posteriores estudios genéticos (ver siguiente ítem). (C) Gel de agarosa al 1% p/v teñido con BrEt de muestras de la reacción de PCR (10 μ L) para amplificar el casete de ARNi-TbTryS a partir de ADN genómico de los parásitos indicados anteriormente y usando los oligonucleótidos específicos p2T7 y p2T7 term. Se incluyó un control negativo sin ADN (-).

Del día 9 post-infección en adelante se hace patente la infección sanguínea en los animales del grupo ARNi induc., observándose un incremento progresivo de la parasitemia, aunque con una tasa inferior a la determinada en los grupos control. Resulta interesante destacar que la aparición de parásitos en la sangre en estos animales (día 9 post-infección o 11 post-inducción del ARNi) presenta cierta coincidencia temporal con el fenómeno de reversión del fenotipo del ARNi-TryS observado *in vitro* (ver inicio de reversión del fenotipo al día 8 en Fig. 59A). Esta disminución en la tasa de proliferación y/o supervivencia de la línea celular ARNi-TryS induc. en condiciones *in vivo* conlleva a una extensión de 8 días en la supervivencia de los animales infectados respecto de las distintas cohortes control. Este experimento confirma nuevamente que TbTryS es una enzima esencial para el establecimiento y persistencia de la infección *in vivo*, tal como fue demostrado por el grupo del Dr. Fairlamb empleando una línea celular de *T. brucei* KO condicional para TryS (Wyllie, 2009).

4.10.2. Caracterización fenotípica y molecular de los parásitos ARNi-TryS recuperados de animales infectados.

Parásitos *T. brucei* de la línea celular ARNi-TryS fueron aislados al séptimo día post-infección a partir de la sangre de ratones alimentados con oxitetraciclina, e inoculados en medio de cultivo con las distintas combinaciones posibles de los tres antibióticos necesarios para mantener los componentes del sistema de silenciamiento por ARNi de la TbTryS. Como control se incluyó una condición de crecimiento sin ningún antibiótico. Los parásitos recuperados de la sangre fueron cuantificados, y se inoculó la misma cantidad en todos los pocillos. Al cabo de 5 días, los cultivos fueron inspeccionados en un microscopio invertido para estimar de manera cualitativa la densidad de células (Fig. 60B).

En todos los medios conteniendo un único o ningún antibiótico así como la combinación fleomicina/geneticina (las resistencias asociadas a TetR y T7 ARN polimerasa, respectivamente) fue posible observar el crecimiento de parásitos aislados de los cuatro ratones en estudio. El hecho de recuperar parásitos con doble resistencia a Fleo y G418 indica que estos componentes del sistema ARNi están establemente

integrados al genoma del parásito. Esta misma conclusión puede extenderse para el vector conteniendo el casete de ARNi (Hig), aunque en términos generales el crecimiento de estos parásitos fue inferior al detectado para la doble combinación Fleo/G418, lo cual sugiere que la expresión del gen de resistencia a higromicina puede ser insuficiente. Las causas que originan este fenómeno pueden ser de origen epigenético: disminución del número de copias del vector p2T7-177.28a que se han insertado en el locus repetido de 177 pb de ARNr, silenciamiento por cambios en la estructura de la cromatina u otros elementos trans.

En las condiciones donde se testearon combinaciones de bi-antibiótico con higromicina (Fleo/Hig y G418/Hig), la tasa de crecimiento o viabilidad de los parásitos fue inferior (5 de 8) a la obtenida para la combinación Fleo/G418 (4 de 4). Esto indica un efecto citotóxico sinérgico de los antibióticos, siendo seguramente limitante la cantidad de higromicina fosfotransferasa por las evidencias experimentales comentadas más arriba. También resulta interesante destacar que fue posible recuperar parásitos con triple resistencia únicamente de un ratón (número 4) (Fig 60B).

Con estos resultados, podemos concluir que a pesar que durante el transcurso de las infecciones *in vivo* los parásitos no estuvieron sometidos a presión de selección de los antibióticos, estos no llegaron a eliminar ninguno de los plásmidos del sistema de ARNi pero si tendieron a silenciar al vector del casete del ARNi.

Estos resultados no son casuales y tienen su lógica. Dado que la expresión de la TetR (asociada a resistencia a Fleo), la proteína que reprime la transcripción del casete de ARNi, depende de la T7-ARN polimerasa (asociada a resistencia a G418), la propia letalidad de la inducción del ARNi de la TbTryS constituye una importante presión de selección para el parásito, que en condiciones de inducción del ARNi se verá obligado a retener los plásmidos para T7-ARN polimerasa y TetR (tal cual se observa con la recuperación de parásitos con doble resistencia a G418 y Fleo) y, simultáneamente, a “apagar” el casete de ARNi (asociado a resistencia a Higromicina), como lo revela la dificultad de crecer parásitos en presencia de higromicina sola o combinada con los demás antibióticos (Fig. 61).

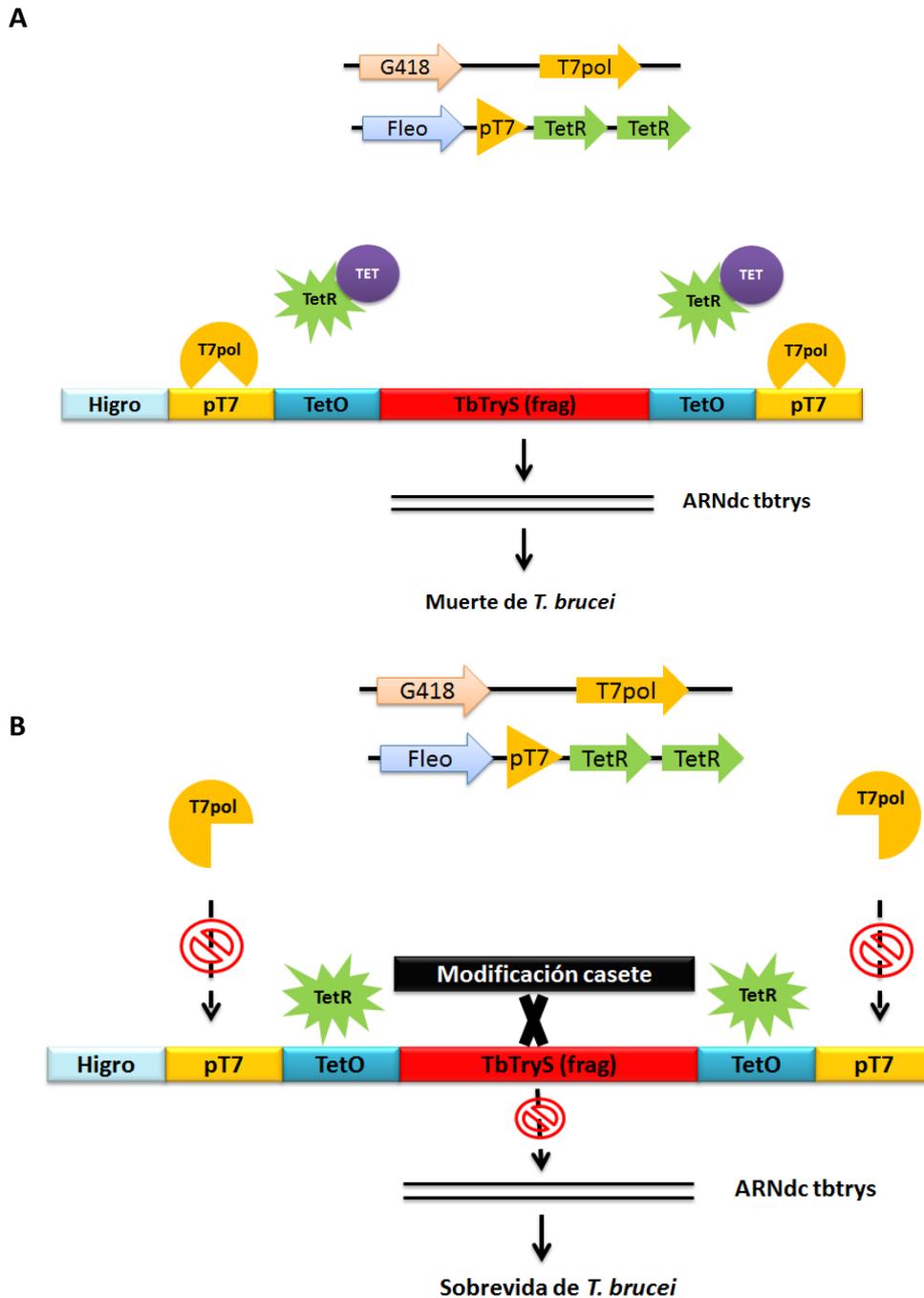


Figura 61. Mecanismos moleculares para el silenciamiento de la TryS en una línea celular de *T. brucei*. Esquemáticamente se describen los escenarios moleculares que pueden ocurrir para la línea celular de *T. brucei* ARNi-TryS en presencia (A) o ausencia (B) del inductor (tetraciclina, TET). En ausencia de TET, la proteína TetR se encuentra unida al TetO, bloqueando la transcripción a partir de los promotores T7 e impidiendo así la formación del ARN doble cadena. En presencia de TET, ésta se une a la proteína TetR haciéndole perder afinidad a esta última por el TetO, lo cual permite que la T7 ARN polimerasa unida a los promotores T7 transcriba la secuencia de ADN y se generen hebras de ARN complementarias a partir del fragmento molde de tbtrys. La maquinaria de silenciamiento del parásito será la responsable de la disminución en los niveles de TbTryS, lo que llevará a la muerte del parásito. Por esta razón, bajo condiciones de inducción del ARNi, el parásito está presionado a retener los casetes para

TetR (y por lo tanto también para T7 ARN polimerasa, ya que la expresión del represor depende de la misma) para evitar la letalidad de la depleción de la TbTryS a la vez que buscará de eliminar o modificar el casete de ARNi.

Si bien esta reducción en los niveles de actividad del vector de ARNi-TbTryS, medida indirectamente por la menor tasa de crecimiento de parásitos en un medio con higromicina, podría explicar la reversión del fenotipo *in vivo*, decidimos profundizar en la caracterización molecular de la secuencia de este vector aislada de parásitos recuperados de animales infectados y crecidos en medio con diferentes combinaciones de antibióticos. Este estudio se extendió también a parásitos que revirtieron el fenotipo del ARNi de TbTryS en condiciones de cultivo *in vitro* (Fig. 59).

Para los parásitos obtenidos de ensayos de reversión de fenotipo *in vivo* se seleccionaron aquellos crecidos sin antibióticos (aislados del ratón 2), con higromicina (aislados del ratón 3) y triple resistentes (Fleo/G418/Hig; aislados del ratón 4). Los parásitos derivados de ensayos *in vitro* de reversión de fenotipo fueron obtenidos mediante cultivo continuo durante 10-14 días en presencia de oxitetraciclina y los tres antibióticos correspondientes (tal como fue descrito en la sección 4.8.2). Se confirmó que estos parásitos dejan de responder a la oxitetraciclina y, por ensayo de *Western blot*, que recuperaron los niveles de TbTryS iniciales (Fig 59C).

Utilizando el ADN genómico de cada uno de estos clones como molde en combinación con oligonucleótidos específicos para los promotores T7 (p2T7 y p2T7term) fue posible amplificar la secuencia presente dentro del casete de silenciamiento (Fig. 59 y 60B). Dichas secuencias fueron clonadas en un vector T comercial (pCR2.1), y secuenciadas para confirmar su identidad. Con las secuencias obtenidas se realizó un blastn (NCBI) y los resultados se presentan en la siguiente tabla (Tabla 6).

Para nuestra sorpresa, todas las secuencias recuperadas de este casete de ARNi, amplificadas de muestras de diferente procedencia pero que tenían en común ser refractarias a silenciar post-transcripcionalmente la expresión de TryS, habían reemplazado el fragmento original del gen de TryS (1239-1884 pb) por otras secuencias de ADN no relacionadas.

Tabla 6. Blastn de las secuencias amplificadas dentro del casete ARNi de parásitos que revirtieron el silenciamiento de TryS *in vitro* e *in vivo*.

Resultados del Blastn obtenidos a partir de los fragmentos de ADN amplificados por PCR y secuenciados, que se encontraban insertos en el casete de ARNi de parásitos *T. brucei* ARNi-TryS que evadieron al silenciamiento de este gen *in vitro* (cultivo) o *in vivo* (ratón). En la tabla se detalla el número de acceso y descripción de la secuencia así como el número de *contig* y el porcentaje de identidad encontrados.

	Número de acceso	Descripción	Contig	Identidad
Ratón 2 (s/ atb)	AJ277476	gen ARD1 (N-acetil transferasa) Cromosoma 11	508-1036	99%
Ratón 3 (Hig)	AC159702	Cromosoma 7	43778- 44228	99%
Ratón 4 (Fleo/G418/Hig)	KN554973	Cromosoma 10	1694445- 1695003	99%
Cultivo	AC159702	Cromosoma 7	2202097- 2202683	97%
Cultivo	AC092212.32	Cromosoma 8	27943- 28619	99%

La mayoría de las secuencias obtenidas no estaría codificando para ninguna proteína, sino simplemente corresponderían a regiones intergénicas de diversos locus genómicos. Este resultado está en concordancia con lo observado por Chen y col., donde observaron que en la mayoría de los parásitos refractarios ocurría un reemplazo de la secuencia dentro del casete de ARNi detectado mediante cambios en el tamaño de la banda esperada por *Southern blot* (Chen, 2003).

Otro detalle que llama la atención es que no se encontró ningún tipo de patrón o secuencias consenso en estos nuevos insertos, pero todos ellos presentaron un tamaño aproximado de entre 500-800 pb, tamaño similar al del fragmento de secuencia de *tbtryS* (650 pb) originalmente presente en el vector ARNi.

Si bien sería importante analizar un número mayor de muestras para tener un resultado incluso más representativo de la realidad, como observación preliminar se puede decir que *T. brucei* presenta algún tipo de mecanismo de eliminación y reemplazo de secuencias no deseadas (como sería en este caso, el casete para el silenciamiento de la TbTryS). Una hipótesis interesante podría ser que el tamaño de los fragmentos a insertarse esté ligado a la maquinaria que se encarga de dicha tarea (como por ejemplo durante el mecanismo de silenciamiento, la proteína Argonauta 1 reconoce únicamente fragmentos de 20-26 nucleótidos) (C. Tschudi, 2003). Estas secuencias bien podrían corresponder a alguno de los tantos elementos genéticos móviles presentes en el genoma de este organismo, sin embargo no hemos logrado detectar ninguna secuencia firma conocida dentro de las mismas (Bringaud, 2011; Bringaud 2004, 2007), por lo que también queda abierta la posibilidad que los mismos correspondan a una nueva clase elementos asociados a un mecanismo específico y selectivo de inserción génica.

Los resultados de estos experimentos determinan un punto de partida para profundizar en el estudio de la evasión de los parásitos al fenómeno de interferencia así como a otros más complejos de recombinación. La puesta a punto de los métodos para el estudio de las vías de escape y los resultados aquí presentados son y serán sumamente valiosos para interpretar adecuadamente los resultados de validación genética de dianas moleculares en modelos de infección animal, cuando las mismas se hagan por técnica de ARNi.

5. Conclusiones

Los tripanosomátidos poseen un metabolismo redox con características únicas ya que es controlado por un (di)tiol de bajo peso molecular ausente en mamíferos, el tripanotión. Un gran número de funciones celulares que en otros organismos requieren del aporte de poder reductor a partir de la transferencia de electrones por intercambio tiol/disulfuro por el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa y glutatión/glutatión reductasa, en estos protozoos dependen de tripanotión. La reacción de síntesis de T(SH)₂ puede ser catalizada por una única entidad enzimática, la tripanotión sintetasa, aunque ciertas especies de kinetoplástidos están equipados con una monoglutationilpermidin sintetasa que les permite producir de manera independiente al intermediario de la reacción del tripanotión. .

El alto grado de similitud entre las secuencias GspS de Kinetoplástidos y bacterias (Bringaud, 1998), sumado a la ausencia de este gen en prácticamente todo el resto de los organismos vivos, sugiere que este grupo de protozoos adquirió la habilidad de sintetizar Gsp de las bacterias. Este evento seguramente involucró la transferencia lateral del gen de *gspS* desde una γ -proteobacteria hacia un ancestro de los Kinetoplástidos, como pueden ser los euglénidos o alguna especie del clado no identificado relacionado a los Kinetoplástidos. Una posterior duplicación y sucesivas mutaciones en la secuencia de *gspS* fueron dando forma a la TryS para convertirla en una enzima capaz de aceptar a la monoglutationilpermidina como sustrato.

Se determinó que la TryS es una proteína relativamente abundante en *T. cruzi* que posee una localización predominantemente citosólica y una distribución granular en todos los estadios del mismo. La concentración intracelular de la proteína concuerda con la importancia de la enzima y su producto para la supervivencia del parásito. Los ensayos de inmunofluorescencia realizados sobre el estadio amastigota revelaron una señal intensa y definida cercana a lo que sería el bolsillo flagelar. Estudios preliminares de microscopía electrónica no descartaron dicha localización, la cual de confirmarse, representa un hallazgo novedoso que nos lleva a especular que la síntesis de tripanotión en este dominio celular podría ser necesaria para neutralizar o regular el estado redox de las (macro)moléculas que son incorporadas desde o secretadas hacia el hospedero por el patógeno. Esta región del parásito presenta una alta densidad de transportadores, y algunos de ellos, como los de poliaminas (molécula para la cual el

parásito es auxótrofo), presentan residuos de cisteínas con roles regulatorios. La diferenciación del parásito a los estadios infectivos de tripomastigota y amastigota se acompañó de un incremento significativo (≥ 2 veces) en los niveles de TryS. Asimismo en el estadio intracelular del patógeno es donde la diferencia en el nivel de TryS se hace marcada entre las dos cepas analizadas, llegando a ser casi el doble para la cepa DM28c respecto de la CL-Brener. Asimismo, mediante ensayos de infección en células fue posible comprobar que la cepa DM28c es más virulenta que la CL-Brener. Por este motivo, se planteó la hipótesis que la TryS podría estar operando como un factor de virulencia en *T. cruzi*. Esta hipótesis no pudo ser confirmada mediante la sobreexpresión de la TryS de *T. brucei* en la cepa CL-Brener, no obstante, la resolución final de este interrogante va a requerir la determinación del contenido de tioles de bajo peso molecular

Por otro lado, se pudo demostrar que el gen de la GspS no se estaría transcribiendo en la forma epimastigota, ni la proteína expresando en los estadios infectivos de *T. cruzi* CL-Brener y DM28c. Esto pondría a *T. cruzi* dentro de los Kinetoplastidos que, posiblemente por redundancia funcional con la TryS, han bloqueado la expresión del gen de GspS. Más aún, se encontró que el gen, que normalmente se encuentra en una región sinténica en otros tripanosomátidos, aquí se ubica en una región con varias proteínas pseudo-génicas. Este hallazgo sugiere que este patógeno cuenta con regiones genómicas “basurero” que presentan una nula o baja tasa de transcripción, y en las cuales el organismo dispondrá aquellas secuencias en vías de extinción.

A partir de los ensayos de complementación *in vitro* en *T. brucei*, se pudo concluir que no existen diferencias significativas entre el fenotipo de la línea control ARNi-TryS y las líneas que expresan la GspS de *C. fasciculata* cuando en ambas se induce el silenciamiento de la TryS. De confirmarse que la línea que expresa la CfGspS presenta niveles de Gsp comparables a los de T(SH)₂ en la línea celular parental o salvaje, se podría llegar a concluir que el monotiol Gsp no es capaz de sustituir en un contexto fisiológico las funciones del ditiol T(SH)₂, tal como se comprobó en estudios recientes realizados con *L. infantum*. Tal escenario resultaría sumamente favorable para el desarrollo de fármacos contra TryS, ya que permitiría excluir a la GspS como un blanco adicional a inhibir y, en aquellas especies que expresen la GspS, se reducirían las

chances de generación de resistencia por falta de redundancia funcional entre ambas enzimas.

Si bien no fue posible determinar por herramientas de genética reversa que el gen de la TryS es esencial para *T. cruzi*, las evidencias surgidas de este trabajo que muestran la no expresión de la GspS y que además Gsp no sería capaz de sustituir las funciones de TSH2 *in vivo*, de alguna forma validan de manera indirecta la hipótesis que la TryS es indispensable para este parásito.

En este trabajo se exploró el modo de acción de ciertos compuestos derivados de una lactona de sesquiterpeno (SLT), y diaminas N,N'-bis(bencil)-sustituidas (DAB) sobre la forma infectiva de *T. brucei* con niveles bajos de TryS. Si bien las SLT no inhibieron de manera destacada a la TbTryS recombinante, su actividad citotóxica se incrementó sobre parásitos depletados en TryS y tripanotión. Por lo tanto podemos concluir que el mecanismo de acción de las SLT involucra interferir con funciones dependientes de T(SH)₂ y/o sobre blancos adicionales, como otras proteínas (enzimas) que utilicen tripanotión y/o presenten tioles críticos para su función. En el caso de un par de DAB, la falta de correlación entre una potente actividad citotóxica, una moderada inhibición de la TbTryS *in vitro* y la ausencia de sensibilidad a las mismas por parte de la línea celular depletada en TryS, indica claramente que estos análogos tienen otro blanco celular no relacionado directamente al metabolismo del tripanotión. Por el contrario, para una de ellas (EAP 1-47) los resultados apuntan a que su mecanismo de acción podría involucrar al metabolismo de tripanotión (por ej. biosíntesis de poliaminas) y en menor medida a la TryS. Trabajos futuros serán dirigidos a profundizar en el mecanismo de acción de estos compuestos con el fin de optimizar sus propiedades biológicas como la selectividad (contra TryS) y potencia.

Fue posible tener una primera aproximación al mecanismo de escape al ARNi de la TryS que estaría operando en la forma infectiva de *T. brucei* crecida *in vitro* e *in vivo*. Con los resultados obtenidos se puede concluir que a pesar que durante el transcurso de las infecciones *in vivo* los parásitos no estuvieron sometidos a presión de selección de los antibióticos, estos no llegaron a eliminar ninguno de los plásmidos del sistema de ARNi pero sí a silenciar al vector del casete del ARNi. Por otra parte se observó que *T. brucei* presenta algún tipo de mecanismo de eliminación y reemplazo de secuencias no deseadas (como sería en este caso, el casete para el silenciamiento de la TbTryS).

Estas secuencias bien podrían corresponder a alguno de los tantos elementos genéticos móviles presentes en el genoma de este organismo, sin embargo no hemos logrado detectar ninguna secuencia firma conocida dentro de las mismas (Bringaud, 2011; Bringaud 2004, 2007), por lo que también queda abierta la posibilidad que los mismos correspondan a una nueva clase elementos asociados a un mecanismo específico y selectivo de inserción genética. Este estudio de las vías de escape del ARNi nos permitió establecer métodos de rutina para una interpretación adecuada de los resultados de validación genética de dianas moleculares en modelos de infección animal, cuando las mismas se hagan por técnica de ARNi.

6. Bibliografía

- Ali, M. & Field, M.C., 2013. Cell density-dependent ectopic expression in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Experimental parasitology*, 134(2), pp.249–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3659828&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed September 9, 2014].
- Alibu, V.P. et al., 2005. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 139(1), pp.75–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610821> [Accessed December 4, 2014].
- Alsford, S. et al., 2012. Europe PMC Funders Group High-throughput decoding of anti-trypanosomal drug efficacy and resistance. , 482(7384), pp.232–236.
- Altschul, S.F. et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), pp.3389–402. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146917&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Alvarez, M.N. et al., 2011. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *The Journal of biological chemistry*, 286(8), pp.6627–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3057850&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 2, 2014].
- Ammerman, M.L. et al., 2013. A core MRB1 complex component is indispensable for RNA editing in insect and human infective stages of *Trypanosoma brucei*. *PLoS one*, 8(10), p.e78015. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3820961&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].
- Andersson, B., 2011. The *Trypanosoma cruzi* genome; conserved core genes and extremely variable surface molecule families. *Research in microbiology*, 162(6), pp.619–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624458> [Accessed September 23, 2014].
- André F. Sousa, Ana G. Gomes-Alves, Diego Benítez, Marcelo A. Comini, Leopold Flohé, Timo Jaeger, Joana Passos, Friedrich Stuhlmann, Ana M. Tomás, H.A.C., 2014. “ Genetic and Chemical Analyses Reveal that Trypanothione Synthetase but Not Glutathionylspermidine Synthetase Is Essential for *Leishmania infantum* .” *Free Radical Biology and Medicine*, 73(August 2014), pp.229–238.
- Ariyanayagam, M.R. et al., 2003. Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry*, 278(30), pp.27612–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12750367> [Accessed September 9, 2014].

- Ariyanayagam, M.R. et al., 2005a. Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. *The Biochemical journal*, 391(Pt 2), pp.425–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1276942&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed June 9, 2014].
- Ariyanayagam, M.R. et al., 2005b. Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. *The Biochemical journal*, 391(Pt 2), pp.425–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1276942&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Ariyanayagam, M.R. & Fairlamb, a H., 2001. Ovothiols and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology*, 115(2), pp.189–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420105>.
- Auman, A.J. et al., 2006. Psychromonas ingrahamii sp. nov., a novel gas vacuolate, psychrophilic bacterium isolated from Arctic polar sea ice. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(Pt 5), pp.1001–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16627645> [Accessed September 9, 2014].
- Bacchi, C.J. et al., 1989. Trypanosoma brucei brucei : Regulation of Ornithine in Procyclic Forms and Trypomastigotes Decarboxylase The growth of bloodstream forms of Try- which catalyzes the formation of putrescine panosoma brucei brucei , the agent of sleep- and CO * from omithin. , 402, pp.392–402.
- Bai, X. et al., 2014. Marinomonas profundimaris sp. nov., isolated from deep-sea sediment sample of the Arctic Ocean. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(3), pp.449–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952743> [Accessed September 9, 2014].
- Balaña, R. et al., 2012. Molecular & Biochemical Parasitology Role of trypanosomatid ' s arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. , 181, pp.85–93.
- Barrett, B., LaCount, D.J. & Donelson, J.E., 2004. Trypanosoma brucei: a first-generation CRE-loxP site-specific recombination system. *Experimental parasitology*, 106(1-2), pp.37–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013787> [Accessed September 9, 2014].
- Barrias, E.S., de Carvalho, T.M.U. & De Souza, W., 2013. Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Frontiers in immunology*, 4(August), p.186. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3730053&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].
- Bateman A, R.N., 2003. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), pp.230–234. Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000403000628> [Accessed October 4, 2014].

- Bellofatto, V. & Palenchar, J.B., 2008. RNA interference as a genetic tool in trypanosomes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 442, pp.83–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369780>.
- Bian, F. et al., 2011. Complete genome sequence of seawater bacterium *Glaciecola nitratreducens* FR1064(T). *Journal of bacteriology*, 193(24), pp.7006–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3232840&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed September 9, 2014].
- Breitling, R., 2002. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *protein expression and purification*, pp.209–218. Available at: http://ac.els-cdn.com/S1046592802000013/1-s2.0-S1046592802000013-main.pdf?_tid=31251152-fd95-11e3-b9b8-00000aab0f27&acdnat=1403830476_38d28d8951141c7d924d6dec9dfe6eb0 [Accessed June 27, 2014].
- Bringaud, F. et al., 1998. Conserved organization of genes in trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology*, 94(2), pp.249–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9747975>.
- Bringaud, F. et al., 2007. Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*. *PLoS pathogens*, 3(9), pp.1291–307. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323293&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed August 23, 2014].
- Bringaud, F. et al., 2004. The ingi and RIME non-LTR retrotransposons are not randomly distributed in the genome of *Trypanosoma brucei*. *Molecular biology and evolution*, 21(3), pp.520–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14694076> [Accessed August 27, 2014].
- Bringaud, F., Berriman, M. & Hertz-Fowler, C., 2011. TSIDER1, a short and non-autonomous Salivarian trypanosome-specific retroposon related to the ingi6 subclade. *Molecular and biochemical parasitology*, 179(1), pp.30–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3820030&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed September 9, 2014].
- C.J. Bacchi, N.Y., 1993. Effects of antagonists of polyamine metabolism on African trypanosomes. , 54, pp.225–236.
- Camino, A.P. et al., 2012. Synthesis and antikinoplastid activity of a series of N,N'-substituted diamines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(4), pp.1712–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22248858> [Accessed August 25, 2014].

- Ceylan, S. et al., 2010. The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 285(45), pp.35224–37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2966136&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].
- Chen, S. et al., 1997. Design, synthesis, and biochemical evaluation of phosphonate and phosphoramidate analogs of glutathionylspermidine as inhibitors of glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Escherichia coli*. *Journal of medicinal chemistry*, 40(23), pp.3842–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371250>.
- Chen, Y. et al., 2003. Development of RNA interference revertants in *Trypanosoma brucei* cell lines generated with a double stranded RNA expression construct driven by two opposing promoters. , 126, pp.275–279.
- Chiang, B.-Y. et al., 2010. Protein S-thiolation by Glutathionylspermidine (Gsp): the role of *Escherichia coli* Gsp synthetase/amidase in redox regulation. *The Journal of biological chemistry*, 285(33), pp.25345–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2919097&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed September 9, 2014].
- Chung, S.H., Gillespie, R.D. & Swindle, J., 1994. Analyzing expression of the calmodulin and ubiquitin-fusion genes of *Trypanosoma cruzi* using simultaneous, independent dual gene replacements. *Molecular and biochemical parasitology*, 63(1), pp.95–107. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8183327>.
- Clark, D., Albrecht, M. & Ar, J., 1994. Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. , 1, pp.7–9.
- Clayton, C., 2013. The Regulation of Trypanosome Gene Expression by RNA-Binding Proteins. , 9(11), pp.9–12.
- Clayton, C. & Shapira, M., 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and biochemical parasitology*, 156(2), pp.93–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765983> [Accessed May 28, 2014].
- Clayton, C.E., 1999. Genetic Manipulation of Kinetoplastida. , 15(9).
- Comini, M., Menge, U., Wissing, J., Flohé, L., et al., 2005. Enzyme Catalysis and Regulation : Trypanothione Synthesis in *Crithidia* Revisited Trypanothione Synthesis in *Crithidia* Revisited *.
- Comini, M., Menge, U., Wissing, J. & Flohé, L., 2005a. Trypanothione synthesis in *crithidia* revisited. *The Journal of biological chemistry*, 280(8), pp.6850–60.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15537651> [Accessed June 9, 2014].

- Comini, M., Menge, U., Wissing, J. & Flohé, L., 2005b. Trypanothione synthesis in crithidia revisited. *The Journal of biological chemistry*, 280(8), pp.6850–6860.
- Comini, M., Menge, U., Wissing, J. & Flohé, L., 2005c. Trypanothione synthesis in crithidia revisited. *The Journal of biological chemistry*, 280(8), pp.6850–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15537651> [Accessed September 9, 2014].
- Comini, M. a et al., 2008. Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes. *The Journal of biological chemistry*, 283(41), pp.27785–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669638> [Accessed October 4, 2014].
- Comini, M. a et al., 2004. Validation of Trypanosoma brucei trypanothione synthetase as drug target. *Free radical biology & medicine*, 36(10), pp.1289–302. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15110394> [Accessed September 4, 2014].
- Comini, M. a, Krauth-Siegel, R.L. & Flohé, L., 2007. Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *The Biochemical journal*, 402(1), pp.43–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1783994&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed November 29, 2014].
- Comini, M., Menge, U. & Flohé, L., 2003. Biosynthesis of trypanothione in Trypanosoma brucei brucei. *Biological chemistry*, 384(4), pp.653–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12751794>.
- Cottontail, V.M. et al., 2014. High local diversity of Trypanosoma in a common bat species, and implications for the biogeography and taxonomy of the T. cruzi clade. *PloS one*, 9(9), p.e108603. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4182490&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed November 27, 2014].
- Coura, J.R. & Borges-pereira, J., 2012. Review Article / Artigo de Revisão Chagas disease . What is known and what should be improved : a systemic review Doença de Chagas . O que é conhecido e o que deve ser melhorado : uma visão sistêmica. , 45(3), pp.286–296.
- Cruz, M.C. et al., 2012. Trypanosoma cruzi: role of δ -amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation. *PloS one*, 7(12), p.e51804. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3525664&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].

- Deponte, M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), pp.3217–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23036594> [Accessed July 11, 2014].
- Dormeyer, M. et al., 2001. Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *The Journal of biological chemistry*, 276(14), pp.10602–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150302> [Accessed September 4, 2014].
- Du, Y., McLaughlin, G. & Chang, K.P., 1994. 16S ribosomal DNA sequence identities of beta-proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species. *Journal of bacteriology*, 176(10), pp.3081–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=205468&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/abstract>.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), pp.1792–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=390337&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/abstract> [Accessed July 11, 2014].
- Van den Ent, F. & Löwe, J., 2006. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 67(1), pp.67–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16480772> [Accessed July 28, 2014].
- Ericson, M. et al., 2014. On the extent and role of the small proteome in the parasitic eukaryote *Trypanosoma brucei*. *BMC biology*, 12(1), p.14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3942054&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/abstract> [Accessed December 8, 2014].
- Fisk, J.C. et al., 2008. TbRGG2, an essential RNA editing accessory factor in two *Trypanosoma brucei* life cycle stages. *The Journal of biological chemistry*, 283(34), pp.23016–25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2516992&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/abstract> [Accessed December 8, 2014].
- Flohé, L., 2012. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnology Advances*, 30(1), pp.294–301. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620942> [Accessed June 3, 2014].
- Fyfe, P.K. et al., 2008a. Leishmania trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *The Journal of biological chemistry*, 283(25), pp.17672–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2427367&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/abstract> [Accessed December 3, 2014].

- Fyfe, P.K. et al., 2008b. Leishmania trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *The Journal of biological chemistry*, 283(25), pp.17672–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2427367&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed June 9, 2014].
- Gao, G. et al., 1999. Novel Organization and Sequences of Five Genes Encoding All Six Enzymes for de novo Pyrimidine Biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*.
- Ghedini, E. et al., 2004. Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology*, 134(2), pp.183–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003838> [Accessed September 17, 2014].
- Gillespie, R.D., Ajioka, J. & Swindle, J., 1993. Using simultaneous, tandem gene replacements to study expression of the multicopy ubiquitin-fusion (FUS) gene family of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 60(2), pp.281–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8232419>.
- Gommel, D.U. et al., 1997. Catalytic characteristics of trypanedoxin. , 918, pp.913–918.
- González, N.S., Huber, a & Algranati, I.D., 2001. Spermidine is essential for normal proliferation of trypanosomatid protozoa. *FEBS letters*, 508(3), pp.323–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728444>.
- Grisard, E.C. et al., 2014. *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. , 2(1), pp.2–3.
- Günzl, A., 2010. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? *Eukaryotic cell*, 9(8), pp.1159–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2918933&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed September 2, 2014].
- Hall, B.G., 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular biology and evolution*, 30(5), pp.1229–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486614> [Accessed July 13, 2014].
- Hamilton, P.B., Teixeira, M.M.G. & Stevens, J.R., 2012. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the “bat seeding” hypothesis. *Trends in parasitology*, 28(4), pp.136–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365905> [Accessed July 18, 2014].
- Hashimi, H. et al., 2009. Kinetoplastid guide RNA biogenesis is dependent on subunits of the mitochondrial RNA binding complex 1 and mitochondrial RNA polymerase. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(4), pp.588–99. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2661843&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].

- Held, T.K. et al., 1999. Gamma Interferon Augments Macrophage Activation by Lipopolysaccharide by Two Distinct Mechanisms , at the Signal Transduction Level and via an Autocrine Mechanism Involving Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1. , 67(1), pp.206–212.
- Hillebrand, H., Schmidt, A. & Krauth-Siegel, R.L., 2003. A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 278(9), pp.6809–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466271> [Accessed December 8, 2014].
- Huynh, T.T. et al., 2003. Gene knockdown of gamma-glutamylcysteine synthetase by RNAi in the parasitic protozoa *Trypanosoma brucei* demonstrates that it is an essential enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 278(41), pp.39794–800. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888552> [Accessed December 8, 2014].
- Irigoín, F. et al., 2008. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free radical biology & medicine*, 45(6), pp.733–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588970> [Accessed November 27, 2014].
- Jackson, A.P., 2014. Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology*, pp.1–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25068268> [Accessed September 9, 2014].
- Jackson, A.P., Quail, M. a & Berriman, M., 2008. Insights into the genome sequence of a free-living Kinetoplastid: *Bodo saltans* (Kinetoplastida: Euglenozoa). *BMC genomics*, 9, p.594. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2621209&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract> [Accessed June 9, 2014].
- Jimenez, V., 2014. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Research in microbiology*, 165(3), pp.155–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508488> [Accessed December 8, 2014].
- Jr, Bollinger JM, Kwon DS, Huisman GW, Kolter R, W.C., 1995. Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. Purification, cloning, overproduction, and characterization of a bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase. , p.Vol. 270, No 23, pp. 14031–14041.
- Kessler, R.L. et al., 2013. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS one*, 8(1), p.e55497. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3561218&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].

- Koch, O., Cappel, D., Nocker, M., Jager, T., et al., 2013. Molecular Dynamics Reveal Binding Mode of Glutathionylspermidine by Trypanothione Synthetase. *PLoS ONE*, 8.
- Koch, O., Cappel, D., Nocker, M., Jäger, T., et al., 2013. Molecular dynamics reveal binding mode of glutathionylspermidine by trypanothione synthetase. *PloS one*, 8(2), p.e56788. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3581523&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed May 29, 2014].
- Koenig, K., 1997. Convenient Isolation and Kinetic Mechanism of Glutathionylspermidine Synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), pp.11908–11915. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.18.11908> [Accessed September 9, 2014].
- Krauth-siegel, R.L. et al., 1987. Trypanothione reductase from. , 128, pp.123–128.
- Krauth-Siegel, R.L. & Comini, M. a., 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(11), pp.1236–1248. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416508000627> [Accessed November 19, 2014].
- Krauth-Siegel, R.L. & Lüdemann, H., 1996. Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Molecular and biochemical parasitology*, 80(2), pp.203–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892297>.
- L. Piacenza, M.P. Zago, G. Peluffo, M.N. Alvarez, M.A. Basombrio, and R.R., 2009. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. , 39(13), pp.1455–1464.
- Landfear, S.M. & Ignatushchenko, M., 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology*, 115(1), pp.1–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11377735>.
- Li, X. & Coffino, P., 1992. Regulated Degradation of Ornithine Decarboxylase Requires Interaction with the Polyamine-Inducible Protein Antizyme. , 12(8), pp.3556–3562.
- Lueder, D. V. & Phillips, M. a., 1996. Characterization of *Trypanosoma brucei* - Glutamylcysteine Synthetase, an Essential Enzyme in the Biosynthesis of Trypanothione (Diglutathionylspermidine). *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), pp.17485–17490. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.271.29.17485> [Accessed December 8, 2014].

- Lustig, Y. et al., 2007. Spliced-leader RNA silencing: a novel stress-induced mechanism in *Trypanosoma brucei*. *EMBO reports*, 8(4), pp.408–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1852752&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 3, 2014].
- M. K. Chattopadhyay, W. Chen, and H. & Tabor, 2013. Escherichia coli glutathionylspermidine synthetase/amidase: Phylogeny and effect on regulation of gene expression. , 338(2), pp.1–17.
- Manta, B. et al., 2013. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), pp.3199–216. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396001> [Accessed September 9, 2014].
- Maslov, D. a, Podlipaev, S. a & Lukes, J., 2001. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(3), pp.397–402. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313652>.
- Maya, J.D. et al., 1997. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 86(1), pp.101–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9178272>.
- Melchers, J. et al., 2007. Glutathionylation of trypanosomal thiol redox proteins. *The Journal of biological chemistry*, 282(12), pp.8678–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17242409> [Accessed September 9, 2014].
- Minning, T. a et al., 2009. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC genomics*, 10, p.370. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2907688&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].
- Montemartini, M., 1998. Sequence Analysis of the Tryparedoxin Peroxidase Gene from *Crithidia fasciculata* and Its Functional Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(9), pp.4864–4871. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.9.4864> [Accessed December 8, 2014].
- Montrichard, Y. et al., 1999. Evidence for the co-existence of glutathione reductase and trypanothione reductase in the non-trypanosomatid Euglenozoa : *Euglena gracilis* Z . *Franc.* , 442.
- Morris, S.M., 2009. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British journal of pharmacology*, 157(6), pp.922–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2737650&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 3, 2014].

- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), pp.209–212. Available at: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0602325> [Accessed July 24, 2014].
- Motta, M.C.M. et al., 2013. Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family. *PLoS one*, 8(4), p.e60209. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3616161&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed September 9, 2014].
- Motyka, S. a et al., 2006. Overexpression of a cytochrome b5 reductase-like protein causes kinetoplast DNA loss in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry*, 281(27), pp.18499–506. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690608> [Accessed December 8, 2014].
- Motyka, S. a & Englund, P.T., 2004. RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Current opinion in microbiology*, 7(4), pp.362–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288622> [Accessed June 9, 2014].
- Muhicht, M.L. & Boothroyd, J.C., 1988. Polycistronic Transcripts in Trypanosomes and Their Accumulation during Heat Shock : Evidence for a Precursor Role in mRNA Synthesis. , 8(9), pp.3837–3846.
- Myler, P.J., 1993. Molecular variation in trypanosomes. *Acta tropica*, 53(3-4), pp.205–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8100671>.
- Nishimura, K. et al., 2001. Effects of dietary polyamine deficiency on *Trypanosoma gambiense* infection in rats. *Experimental parasitology*, 97(2), pp.95–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11281706> [Accessed December 2, 2014].
- Noireau, F., Diosque, P. & Jansen, A.M., 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary research*, 40(2), p.26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2695024&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].
- Olin-Sandoval, V. et al., 2012. Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *The FEBS journal*, 279(10), pp.1811–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394478> [Accessed December 2, 2014].
- Opperdoes, F.R. & Michels, P. a M., 2007. Horizontal gene transfer in trypanosomatids. *Trends in parasitology*, 23(10), pp.470–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826337> [Accessed September 9, 2014].
- Oza, S., 2003. Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 131(1), pp.25–33. Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685103001762> [Accessed June 9, 2014].

- Oza, S.L., Tetaud, E., et al., 2002a. A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry*, 277(39), pp.35853–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121990> [Accessed June 9, 2014].
- Oza, S.L., Tetaud, E., et al., 2002b. A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry*, 277(39), pp.35853–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121990> [Accessed September 9, 2014].
- Oza, S.L., Tetaud, E., et al., 2002c. A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry*, 277(39), pp.35853–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121990> [Accessed June 9, 2014].
- Oza, S.L. et al., 2008. ATP-dependent ligases in trypanothione biosynthesis--kinetics of catalysis and inhibition by phosphinic acid pseudopeptides. *The FEBS journal*, 275(21), pp.5408–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2702004&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed June 9, 2014].
- Oza, S.L. et al., 2005a. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Molecular and biochemical parasitology*, 139(1), pp.107–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610825> [Accessed June 9, 2014].
- Oza, S.L. et al., 2005b. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Molecular and biochemical parasitology*, 139(1), pp.107–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610825> [Accessed June 9, 2014].
- Oza, S.L., Ariyanayagam, M.R. & Fairlamb, A.H., 2002. from *Crithidia fasciculata*. , 686, pp.679–686.
- Pai, C.-H. et al., 2006a. Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase. *The EMBO journal*, 25(24), pp.5970–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1698887&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed September 9, 2014].
- Pai, C.-H. et al., 2006b. Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase. *The EMBO journal*, 25(24), pp.5970–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1698887&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed June 9, 2014].

- Pai, C.-H. et al., 2011. Structure and mechanism of Escherichia coli glutathionylspermidine amidase belonging to the family of cysteine; histidine-dependent amidohydrolases/peptidases. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 20(3), pp.557–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3064834&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed September 9, 2014].
- Paz, I., 2000. Redalyc.Reseña de “Phytomonas: protozoos flagelados de plantas.” , 4, pp.107–113.
- Peluffo, G. et al., 2004. L-arginine metabolism during interaction of Trypanosoma cruzi with host cells. *Trends in parasitology*, 20(8), pp.363–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246319> [Accessed December 8, 2014].
- Perez-Mazliah, D.E. et al., 2013. Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of Trypanosoma cruzi infection: a pilot study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(2), pp.424–37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3543119&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].
- Pettitt, J. et al., 2014. Operons Are a Conserved Feature of Nematode Genomes. *Genetics*, 197(4), pp.1201–1211. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4125394&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed November 5, 2014].
- Piacenza, L. et al., 2009. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of Trypanosoma cruzi virulence. *International Journal for Parasitology*, 39(13), pp.1455–1464. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.010>.
- Piacenza, L. et al., 2009. Fighting the oxidative assault: the Trypanosoma cruzi journey to infection. *Current opinion in microbiology*, 12(4), pp.415–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616990> [Accessed September 9, 2014].
- Piacenza, L. et al., 2008. Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *The Biochemical journal*, 410(2), pp.359–68. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2441817&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed November 16, 2014].
- Piñeyro, M.D. et al., 2011. Molecular characterization and interactome analysis of Trypanosoma cruzi tryparedoxin 1. *Journal of proteomics*, 74(9), pp.1683–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539948> [Accessed December 2, 2014].
- Van der Ploeg, L.H. et al., 1984. Chromosomes of kinetoplastida. *The EMBO journal*, 3(13), pp.3109–15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=557825&tool=pmc&rendertype=abstract>.

- Protein, A. & Doi, S., 2011. Structure and mechanism of Escherichia coli glutathionylspermidine amidase belonging to the family of cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases Chien-Hua Pai. , pp.2–32.
- Quesne, S.A.L.E. & Fairlamb, A.H., 1996. epimastigotes. , 486, pp.481–486.
- Quijada, L. et al., 2002. Expression of the human RNA-binding protein HuR in Trypanosoma brucei increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. *Nucleic acids research*, 30(20), pp.4414–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=137141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rahlfs, S., Fischer, M. & Becker, K., 2001. Plasmodium falciparum possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain. *The Journal of biological chemistry*, 276(40), pp.37133–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479312> [Accessed December 8, 2014].
- Rangel-aldao, R. et al., 1987. Possible role of cAMP in the differentiation of Trypanosoma cruzi. , 22, pp.39–43.
- Reguera, R.M., Tekwani, B.L. & Balaña-Fouce, R., 2005. Polyamine transport in parasites: a potential target for new antiparasitic drug development. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 140(2), pp.151–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15907761> [Accessed November 30, 2014].
- Rigden, D.J., Jedrzejewski, M.J. & Galperin, M.Y., 2003. Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of gamma-D,L-glutamate-specific amidohydrolases. *Trends in biochemical sciences*, 28(5), pp.230–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765833>.
- Saitou, N. & Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), pp.406–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18343690>.
- Schäffer, a a et al., 2001. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic acids research*, 29(14), pp.2994–3005. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55814&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schlecker, T. et al., 2005. Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidases in Trypanosoma brucei. *The Journal of biological chemistry*, 280(15), pp.14385–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664987> [Accessed December 8, 2014].

- Schuppe-Koistinen, I., 1994. Studies-on-the-reversibility-of-protein-S-thiolation-in-human-endothelial-cells_1994_Archives-of-Biochemistry-and-Biophysics.pdf. , pp.226–234.
- Shahi, S.K., Krauth-siegel, R.L. & Clayton, C.E., 2002. Overexpression of the putative thiol conjugate transporter Tb MRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. , 43, pp.1129–1138.
- Shi, H. et al., 2000. Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. , pp.1069–1076.
- Shi, H., Tschudi, C. & Ullu, E., 2006. An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. , pp.2063–2072.
- Shim, B. & Fairlamb, A.H., 1988. Levels of Polyamines , Glutathione and Glutathione-Spermidine Conjugates during Growth of the Insect Trypanosomatid *Crithidia fasciculata*.
- Sievers, F. et al., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(539), p.539. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3261699&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed July 9, 2014].
- Silva Galdino, T. et al., 2014. Cell disruption using a different methodology for proteomics analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Analytical biochemistry*, 448, pp.1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291641> [Accessed December 2, 2014].
- Simpson, A.G.B. et al., 2004. Early Evolution within Kinetoplastids (Euglenozoa), and the Late Emergence of Trypanosomatids. , 155(December), pp.407–422.
- Simpson, A.G.B., Stevens, J.R. & Lukes, J., 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in parasitology*, 22(4), pp.168–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504583> [Accessed May 29, 2014].
- Smith, K. et al., 1995a. Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal*, 312 (Pt 2, pp.465–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1136285&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Smith, K. et al., 1995b. Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal*, 312 (Pt 2, pp.465–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1136285&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Smith, K. et al., 1992. Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. , pp.874–883.

- Snoke, J.E., 1955. ARTICLE : ISOLATION AND PROPERTIES OF YEAST GLUTATHIONE SYNTHETASE. , pp.813–824.
- Souza, W. De et al., 2010. Review on Trypanosoma cruzi : Host Cell Interaction. , 2010.
- Souza, W. De, 2009. Structural organization of Trypanosoma cruzi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl (May), pp.89–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753463>.
- Takahashi, K. & Nei, M., 2000. Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Molecular biology and evolution*, 17(8), pp.1251–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10908645>.
- Tamarit, J. et al., 2003. Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *The Journal of biological chemistry*, 278(28), pp.25745–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730244> [Accessed December 8, 2014].
- Taylor, M.C. et al., 2008. Europe PMC Funders Group Validation of spermidine synthase as a drug target in African trypanosomes. , 409(2), pp.563–569.
- Taylor, M.C. & Kelly, J.M., 2006. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for Trypanosoma cruzi. *BMC biotechnology*, 6, p.32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1544328&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed June 9, 2014].
- Tegel, H. et al., 2010. Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta(DE3). *Protein expression and purification*, 69(2), pp.159–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733669> [Accessed November 24, 2014].
- Tetaud, E. & Fairlamb, a H., 1998. Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione-dependent peroxidase system of Crithidia fasciculata. *Molecular and biochemical parasitology*, 96(1-2), pp.111–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851611>.
- Thomson, L., Denicola, A. & Radi, R., 2003. The trypanothione–thiol system in Trypanosoma cruzi as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412(1), pp.55–64. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986102007452> [Accessed June 9, 2014].
- Torri, A.L.F. & Hajduk, S.L., 1988. Posttranscriptional Regulation of Cytochrome c Expression during the Developmental Cycle of Trypanosoma brucei. , 8(11), pp.4625–4633.

- Torrie, L.S. et al., 2009a. Chemical validation of trypanothione synthetase: a potential drug target for human trypanosomiasis. *The Journal of biological chemistry*, 284(52), pp.36137–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2794729&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed August 27, 2014].
- Torrie, L.S. et al., 2009b. Chemical validation of trypanothione synthetase: a potential drug target for human trypanosomiasis. *The Journal of biological chemistry*, 284(52), pp.36137–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2794729&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed June 9, 2014].
- Tovar, J. & Fairlamb, a H., 1996. Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic acids research*, 24(15), pp.2942–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146039&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Tschudi, C. et al., 1985. Calmodulin genes in trypanosomes are tandemly repeated and produce multiple mRNAs with a common 5' leader sequence. , 82(June), pp.3998–4002.
- Tschudi, C, Djikeng A, Shi H, U.E., 2003. In vivo analysis of the RNA interference mechanism in *Trypanosoma brucei*. *Methods*, 30(4), pp.304–312. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202303000471> [Accessed September 28, 2014].
- Tyler, K.M., Olson, C.L. & Engman, D.M., THE LIFE CYCLE OF TRYPANOSOMA CRUZI.
- Veloso, V.M. et al., 2001. Variation in Susceptibility to Benznidazole in Isolates Derived from *Trypanosoma cruzi* Parental Strains. , 96(October), pp.1005–1011.
- Vergara, I.A. & Chen, N., 2010. Large synteny blocks revealed between *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae* genomes using OrthoCluster.
- Vodnala, S.K. et al., 2009. Preclinical assessment of the treatment of second-stage African trypanosomiasis with cordycepin and deoxycoformycin. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(8), p.e495. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2713411&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed October 4, 2014].
- Wiggers, H.J. et al., 2013. Non-peptidic cruzain inhibitors with trypanocidal activity discovered by virtual screening and in vitro assay. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(8), p.e2370. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3750009&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].

- Wilkinson, S.R. et al., 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), pp.5022–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2278226&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Wilkinson, S.R., 2000. Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), pp.8220–8225. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.11.8220> [Accessed December 8, 2014].
- Wilkinson, S.R. et al., 2002. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *The Journal of biological chemistry*, 277(19), pp.17062–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11842085> [Accessed December 8, 2014].
- Willert, E. & Phillips, M. a, 2012. Regulation and function of polyamines in African trypanosomes. *Trends in parasitology*, 28(2), pp.66–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22192816> [Accessed December 2, 2014].
- Wirtz, E. et al., 1999. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 99(1), pp.89–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215027>.
- Wyllie, S. et al., 2009. Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. *Molecular microbiology*, 74(3), pp.529–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2784880&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed June 9, 2014].
- Xiong, Y. et al., 2011. S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxidants & redox signaling*, 15(1), pp.233–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3110090&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2014].
- Xu, D. et al., 2009. Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. *BMC microbiology*, 9, p.90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2688506&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed June 4, 2014].
- Zhang, D.M.M. and X., 2010. Activation of Murine Macrophages.
- Zingales, B. et al., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), pp.1051–1054.

Zingales, B. et al., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), pp.240–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226704> [Accessed October 31, 2014].

7. Anexo

TcGspS 1 --MENTDKQRGVHASETEHVSEGGVIGVTDGCVPVFNSNGEKKFFSERISFAFDCKRVEAA
 LiGspS 1 MLSLPRDHHYHHTHRGTGLVFPDQVIGITPDGVPVISNGNEFHFINLESVTPFYQALCSF
 LdGspS 1 MLSLPRDHHYHHTHRGTGLVFPDQVIGITPDGVPVISNGNEFHFINLESVTPFYQALCSF
 LmxGspS 1 MFPLPHDHHYHHTHRGTGLVFPDQVIGITPDGLPVISNGNEFHFSNLQSVTPSYQALCSF
 LmjGspS 1 MLSLPRDHHYHHTHRGTGLVFPDQVIGITPDGVPVISNGNEFHFINLESVTPSYQALCSF
 CfGspS 1 MSSLPNHHYHHTHRGTAEVFPDEITIGVTPDGVPVISNGNEAHHFSNLESITAAACLPISSE
 EcGspS 1 -----MSKGTTSQDAPFGTLLIGYAPGGVAIYSS-----DYSSLDPOE-----YED

TcGspS 59 APTT-VIGTHDTLGYKWLCEEFARRYLLMTKGVWLASVPTAEDIWEIDEIVTSVPIGTPV
 LiGspS 61 DRKAPVTVPYKKLGVKWCQVEFARRYLASRKAVWTASMPIAADMWRAETPFVVRVDGTPV
 LdGspS 61 DRKAPVTVPYKKLGVKWCQVEFARRYLASRKAVWTASMPIAADMWRAETPFVVRVDGTPV
 LmxGspS 61 DRKAPVTVPYAKLGVKWCQVEFARRYLASRKAVWTALMPIAADMWSAETPFVVRVDGTPV
 LmjGspS 61 VRKAPVIVPCTKLGAKWQVEFARRYLASRKAVWTASMPIAADMLRAEPPFVVRVDSTPV
 CfGspS 61 ERKAPCKQPYRKMGVKWCQVEFARRYLASRKAVWMTSICTAEVWREENLFDVVRDGRPV
 EcGspS 41 DEVFRSYTDEEYMGHKWQCVFARRFLFLNLYGVVFTDVGMAWEIIFSLR-FLREVVDNDNIL

TcGspS 118 PVEREKHGDTTSMPSVGDLLVWSRT--EDSPYGH LAVVTHVSDNGVCVAEQNYEFKRWQEG
 LiGspS 121 EFTRIANRSHGPAPAMSDIIVWGQS--EETPFGHVAVVTEVLPEAVRVAEQNQGFERWPOG
 LdGspS 121 EFTRIANRSHGPAPAMSDIIVWGQS--EETPFGHVAVVTEVLPEAVRVAEQNQGFERWPOG
 LmxGspS 121 EFTRTPNRSHGAPAMSDIIVWGQS--EETPFGHVAIVTEVLPEAVRVAEQNQGFERWAQGG
 LmjGspS 121 EFTRTPNRSHGAPAMSDIIVWDQS--EETPLGHVAVVTEVLPEAVRVAEQNQGFERWPOG
 CfGspS 121 EVVRTPNKSTGPAPAVADIIVWGE--PETPFGHVAIVTEVCASCVRVAEQNQGFERWPEP
 EcGspS 100 PLQAFPNQSP-RAPVAGALLIWDKGGEFKDTGHVAIITQLHGNKVRFAEQNVIHSPLPQG

*

*

TcGspS 177 KNYSRRFDCEKREDCV--TVFVGETHLLGWVITKAP-PYDFSLGDLPPDKYRHTIGPGHIV
 LiGspS 180 MLYSREIPVQRSSAGT--VEHVEDDPVLGWVTLHCP--YYDFRDGDLADKFRIVTGPGCIV
 LdGspS 180 MLYSREIPVQRSSAGT--VELVDEDPVLGWVTLHCP--YYDFRDGDLADKFRIVTGPGCIV
 LmxGspS 180 MLYSREILMQRSSAGT--VELVDNPPVLGWVTLHCP--YYDFCDGDLADKFRIVTGPGCIV
 LmjGspS 180 MLYSREISMQRSSAGT--VELVDEDSVLGWVTLQCP--YYDFRDGDLADKFRIVTGPGCIV
 CfGspS 180 VPFSSREIAMRTTESGE--VELLDEDPVLGWVTVQAP--FYNFDDGDLADSFRLVVGQGOIL
 EcGspS 159 QQWTRELEMVVENGGYTLKDTFDDTTILGWMIQTEDTEYSLPQPEIAGELLKISG----A

TcGspS 234 RRHLEKDVLLPWLNPQRCDFFLKRSLTVGGYMGEDAVAEAHSPDGFYMDYDMWCRFR
 LiGspS 237 RQFPFKHVELPWLQPEERCDFFYLKRSLAIGGNVGDDARAKECDVPSAFYFLDYNIWCRLG
 LdGspS 237 RQFPFKHVELPWLQPEERCDFFYLKRSLAIGGNVGDDARAKECDVPSAFYFLDYNIWCRLG
 LmxGspS 237 RQFPFKHVELPWLQPEERCDFFYLKRSLAIGGNVGDDARAEECDVPSAFYFLDYDIWCRLG
 LmjGspS 237 RQFPFKHVELPWLQPEERCDFFYLKRSLAIGGNVGDDARAEECDVPSAFYF-----
 CfGspS 237 RQFPFKHVDVPWLNTEGEECDTTLKHSLVVDGNMGEGAHAEEGDVPFAFYFLDYDMFCRLG
 EcGspS 215 RLENKGFQDGKWLDEK---DPLQNAVYQANGQVINQD-----PYHYTITTESAEQELI

TcGspS 294 FATKNLHAAVAEATRIILNSRDSEALLVQYFGLPKELHLQLRRSFETIPSS--MGRGDFDG
 LiGspS 297 RAAHSLHRIAMTATAQVLDADSAYLLEHYFGLPPEIHPLLRSSWEMMPP--MSGRDFDG
 LdGspS 297 RAAHSLHRIAMTATAQVLDADSAYLLEHYFGLPPEIHPLLRSSWEMMPP--MSGRDFDG
 LmxGspS 297 RAAHSLHRIAMAATAKVLDDADSAYLLEHYFGVPPEIHPLLRSSWEMMPP--MGRGDFDG
 LmjGspS 287 -----YFLDY*-----
 CfGspS 297 RAASSLHRIAMAATAKVLDDPESTHLLLEHYFGVPPEIQPLLRSSWEMMPP--MGRGDFDG
 EcGspS 265 KATNELHLMYHATDKVLKDDN----LLALFDIPKILWPRRLLSWQRRRHHMTGRMDFC

TcGspS 352 YDGKEITMLAYNCDSSAAMLECGDTQEKFAHRYGVELGTSTGSFLYSRIANYENCLIQNE
 LiGspS 355 YDGNKVAMLEYNCDSSGALLECCNTQEKMANYYGVSQGMSTGSFLGAKCVSHFARLMSNE
 LdGspS 355 YDGNKVAMLEYNCDSSGALLECCNTQEKMANYYGVSQGMSTGSFLGAKCVSHFARLMSNE
 LmxGspS 355 YDGNKVAMLEYNCDSSGALLECCNTQEKMAIYYGVSQGMSTGSFLGAKCLSHFARLMSNE
 CfGspS 355 YDGKNVVMLEYNCDSSGALLECCNTQEKMARFYGVSQGTSTGSFLGAKCVIYFORLLTNE
 EcGspS 321 MDERGLKVYEYNADSASCHTEAGLILERWAEQGYKGNFNPN-----AEGLINELAGAW

● ● ★
 ▲ ▲

◆

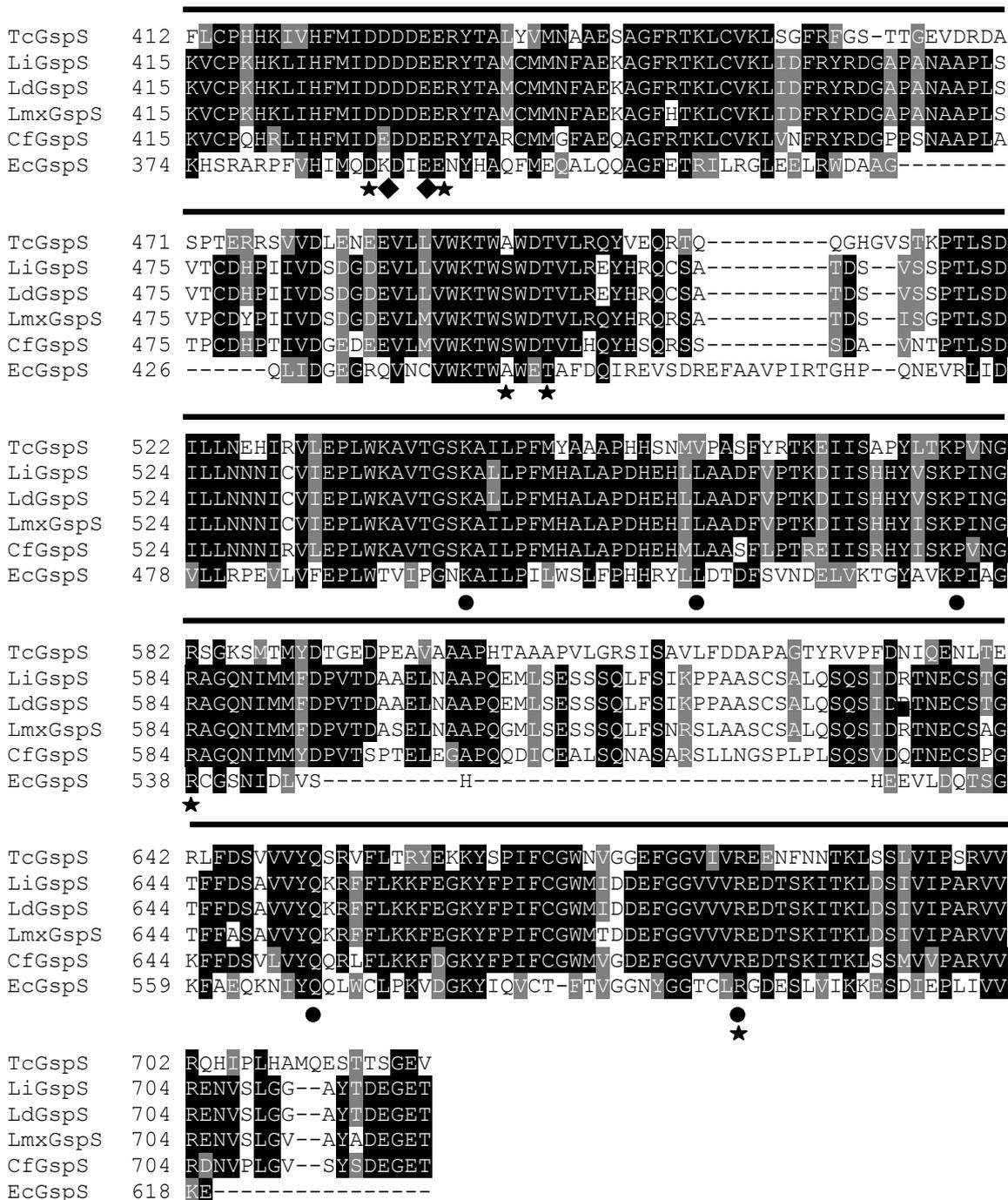


Figura 62. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de TcGspS con otras GspS. Se utilizaron las secuencias de *T. cruzi* (TcGspS - TcCLB.508479.110), *L. infantum* (LiGspS - LinJ.25.2500), *L. donovani* (LdGspS - LdBPK_252500.1), *L. mexicana* (LmxGspS - LmxM.25.2380), *L. major* (LmjGspS - LmjF.25.2380), *C. fasciculata* (CfGspS - AAC48361.2) y *E. coli* (EcGspS - ACB04078.1). La identidad de residuos se representa con letras blancas en fondo negro, mientras que los residuos similares en letras blancas y fondo gris. Las secuencias resaltadas con líneas corresponden a los dominios amidasa (línea punteada) y sintetasa (línea recta). La región

implicada en la regulación de la actividad del dominio amidasa en EcGspS se marca en verde (Whang AH,2011). Algunos residuos son resaltados con diferentes marcadores de acuerdo a los roles que estos posean en la enzima (Comini, 2005; Fyfe, 2008; JBollinger, 1995; Koch, 2013; Oza, 2002; Pai, 2006). El asterisco indica la triada catalítica del dominio amidasa; cuadrado: unión de glutathionilespermidina; círculo, unión de ATP; estrella, unión de glutatión; rombo, unión de espermidina; triángulo, coordinación de Mg^{2+} . Existen residuos que contribuyen a más de una actividad.

TcGspS 1 MENTDKQRGVHASETEHVSVFGGVIIGVTDGCVPVVSNGEKFFSERISFAPDCKRVEAAAP
TcTryS 1 MPITL-----QSLAVPFGCVQGYAPGGIPAYSNKHESYFSGERSIDG-----
TbTryS 1 MTKSAL-A--DTKEEPHVPFGEIQGYTPCGVPAYSNGHGFFSGERSIDG-----
TbTryS_2 1 MTKSAL-A--DTKEEPHVPFGEIQGYTPCGVPAYSNGHGFFSGERSIDG-----
LmTryS 1 MSSLQR-ASVSFNKPGHIFPGAVQGYAPGGVPAYSNKHDHYFSGERNIED-----
LiTryS 1 MSSLPR-ASVSFNRPGHIFPGAVQGYAPGGVPAYSNKHDHYFSGERSIEG-----
CfTryS 1 MASAER-VFVSFNKPGRVPFGEVQGYAPGHIIPAYSNKHDHFFSGERSIDD-----

TcGspS 61 TTVIGTHDTLGYKWLCLIEFARRYLLMTKGVWLASVPTAEDIWEIIDEIVTSVPIGTPVPVE
TcTryS 42 -----NLFCEGFKYQCVEFARRWLFERKSLVLPDVEWAVHIFNLKEVSD-ARTGQNVRCV
TbTryS 48 -----NLFCEGFKYQCVEFARRWLYEAKGLVLPDWNWAAHIFDLTEVHD-ASTATPVPCV
TbTryS_2 48 -----NLFCEGFKYQCVEFARRWLYEAKGLVLPDWNWAAHIFDLTEVHD-ASTATPVPCV
LmTryS 50 -----NIFFGFKYQCVEFARRWLLVRKGLLDPDWNWACHIFQLKEVRD-AATTESFAVL
LiTryS 50 -----NIFFGFKYQCVEFARRWLLVRKGLVLPDWNWACHIFQLKEVRD-AATAESFAVL
CfTryS 50 -----NVFCGFKYQCVEFARRWLLERKGLVLPDWNWACHIFKLNKVKD-AATAEVPVI

TcGspS 121 REKHGDTTSMPSVGDLLVMSRTEDSPYGHIAVVTHTVSDNGVCVAEQNYEFKRWQEGKNYS
TcTryS 95 AIRNG-TAAKPVADSLLIYPSDDYSPVGHVAAITEVGDNWRRIADQNHRFHKWDANVAAE
TbTryS 101 KVSNG-TAAKPVADSLLIYAVNEDAPWGHVAVITEVGDKWRRIADQNHRFHKWKGTYSAE
TbTryS_2 101 KVSNG-TAAKPVADSLLIYAVNEDAPWGHVAVITEVGDKWRRIADQNHRFHKWKGTYSAE
LmTryS 103 QVRNG-TTKPEADALLVYPSTANPVGHVGTITEVGDYVCVADQNYRFHKWESSCAYK
LiTryS 103 PVRNG-TCTKPEADALLVYPSTATNPVGHVCAITEVGDYVCVADQNYRFHKWESSYAYK
CfTryS 103 AVRNG-TEAKPEPDILLIYPSDVNTVGHVCAITEVGDYVCVADQNYRFHKWEASYSYK

TcGspS 181 RRFDCREKREDGVTVFVGET-----HLGWWIIKAPPY-----DFSLGDLF
TcTryS 154 LPLI---HEKGVWTTILDPL-EDEVLRPLGWVTFPETPDRNP-NEPLVLHESLHFKRGEVVP
TbTryS 160 LLLK---HEGSVWTVEDHA-AEGIFVPLGWVTFPSRPNRNP-KEPLVLHESLYFKOPEKP
TbTryS_2 160 LLLK---HEKGVWTVEDHA-AEGIFVPLGWVTFPSRPNRNP-KEPLVLHESLYFKOPEKP
LmTryS 162 LKLD---HRDGIWTIIDDIDADEIEIPLGWVTFPGRANRPEGAPPVALHPSLHFKEPKPK
LiTryS 162 LKLD---HRDGIWTIIDDIDADEIEIPLGWVTFPGRANRPEGAPPVALHPSLHFNKPKPK
CfTryS 162 LKIQ---HKDGVWTTIIDDIDPNDEIPLGWVTFPCYENRPEGAPPALHPSLHFQPPPEP

TcGspS 221 DKYRHIIGPGHIVRRHLEKDVLLPWLNPSCRCDFFLKRSLTVGGYMGEDAV-AEAHSVPD
TcTryS 209 TLRRLT-----TPNSREKDWLDLTNEAEAYFAS-----VCGIDVKNPKVEK--A
TbTryS 215 FLRRVVE-----TPENRKTDWLDLTNEAEAEFYK-----TFGKEATRGGVYE--S
TbTryS_2 215 FLRRVVE-----TPENRKTDWLDLTNEAEAEFYK-----TFGKEATRGGVYE--S
LmTryS 219 YLLRRNF-----LPTESKANWLDMKNPAERLFEVE-----EFGMDVSRTRLEEKVV
LiTryS 219 YLLRRNF-----LPTESKANWLDMKNPAERLFEVE-----EFGMDVSRTRLEEKAV
CfTryS 219 YLVRKTY-----EPTETKANWLDLNDPAEKLEFEVE-----EFGMDVSRSRLEETTV

TcGspS 280 GFYMDYDMWCFRFRFATKNLHAVAVEATRLIINSRDSEALLVQYFGLPKELHLQLRRSEFE
TcTryS 252 SYQMNRELYLDCTKYGNQLHQMFLKATKQVIGSDEQ----LRVFRIPPEEYWPRLRHSWE
TbTryS 258 CYLNMNRELYLNCVRYGTQLHSFFLEATKQVLESDDK----LRRFRIPPEEYWPRIHRSWK
TbTryS_2 258 CYLNMNRELYLNCVRYGTQLHSFFLEATKQVLESDDK----LRRFRIPPEEYWPRIHRSWK
LmTryS 264 SYYESNHEFHLRCVAYGTQLHAFMEATAQVIESDEK----LRLFAIPEEFWPRIRHSWK
LiTryS 264 SYYESNHEFHLRCIAYGTQLHDIFMEATAQVIESDEK----LRLFAIPEEFWPRIRHSWK
CfTryS 264 NYEEDHEFHLRCIAYGTQLHDYFMEATAQVINDDER----LRIFKIPEELWPRMRHSWK

TcGspS 340 TIP-SMCGRFDGFDG--KEIIMLAYNCDSSAAMLECGDTQEKFFARHYGVELGTST--GS
TcTryS 308 TQPHAITGRFDFAFDEDTQQFKCFEYNADSASTLLECGVIQQKWARSVGLDDGTTYSCGS
TbTryS 314 TQPHAITGRFDVFDENTQEFKCFEYNADSASTLLECAVIQEKWANSVGLDDNATRSSGK
TbTryS_2 314 TQPHAITGRFDVFDENTQEFKCFEYNADSASTLLECAVIQEKWANSVGLDDNATRSSGK
LmTryS 320 YQQTYISGRFDFAFNNETGGEVKCFEYNADSASTLLECGLIQQKWAESVGLDKQDTRGSGF
LiTryS 320 YQQTYISGRFDFAFNNETGGEVKCFEYNADSASTLLECGRIQQKWAESVGLDKQDTRGSGF
CfTryS 320 YQQTYISGRFDFAFNNETHQMCKFEYNADSASTLLECGRIQQKWAESVGLDKQDTRGSGW

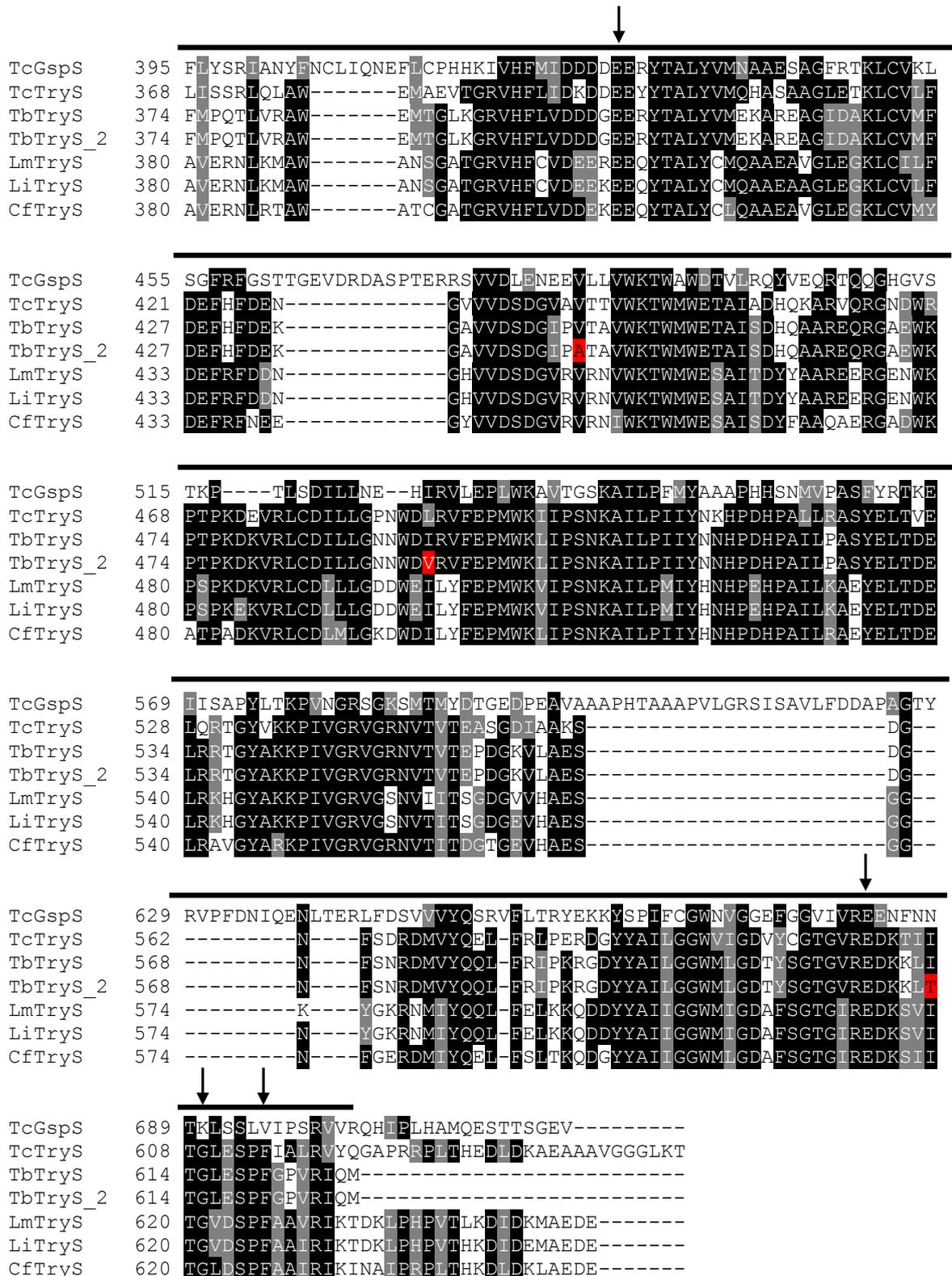


Figura 63. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de TcGspS con otras secuencias de TryS de kinetoplastos. Se utilizaron las secuencias de *T. cruzi* (TcGspS - TcCLB.508479.110), *T. cruzi* (TcTryS - AAG15409.1), *T. brucei* (TbTryS - CAC87573.1 y TbTryS_2 - AAO00721.1), *L. major* (LmTryS - CAC83968.1), *L. infantum* (LiTryS - CAM69145.1) y *C. fasciculata* (CfTryS - AAC39132.1). La identidad de residuos se representa con letras blancas en fondo negro,

mientras que los residuos similares en letras blancas y fondo gris. Las secuencias resaltadas con líneas corresponden a los dominios amidasa (línea punteada) y sintetasa (línea recta). Algunos residuos de LmTryS son resaltados con diferentes marcadores por su importancia en la unión de Gsp para producir tripanotión (Koch, 2013). Con flecha, se señalan los residuos claves en la interacción con Gsp. En azul, se destacó una secuencia que interviene en la formación del bolsillo de unión de Gsp. Las secuencias de *TbTryS* y *TbTryS_2* corresponden a las reportadas por Oza y col. (2003) y Comini y col. (2003), respectivamente. En esta segunda secuencia, se detectaron cuatro mutaciones que se resaltan en rojo, producto de errores durante la PCR y/o clonado. Una de ellas se localiza en el dominio amidasa y las otras tres en el dominio sintetasa.

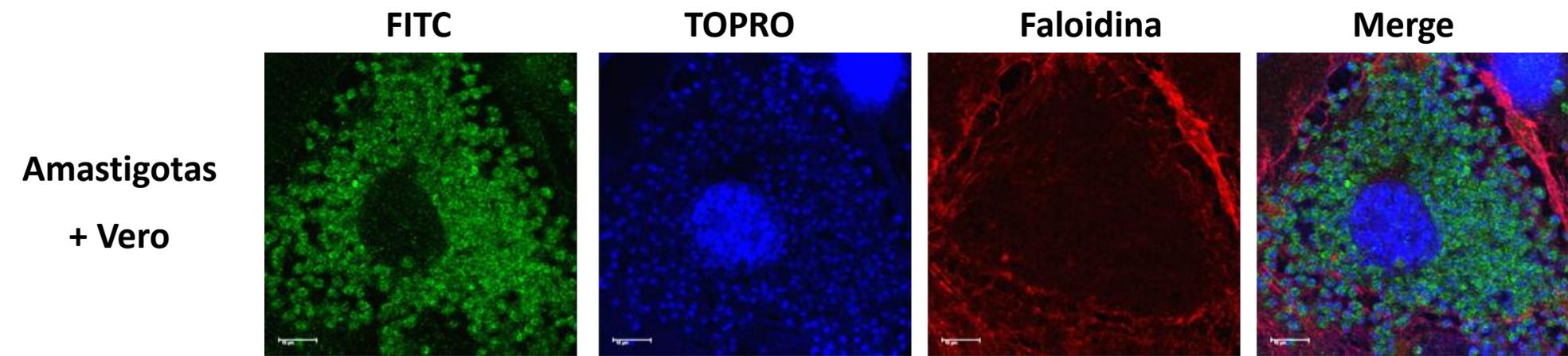
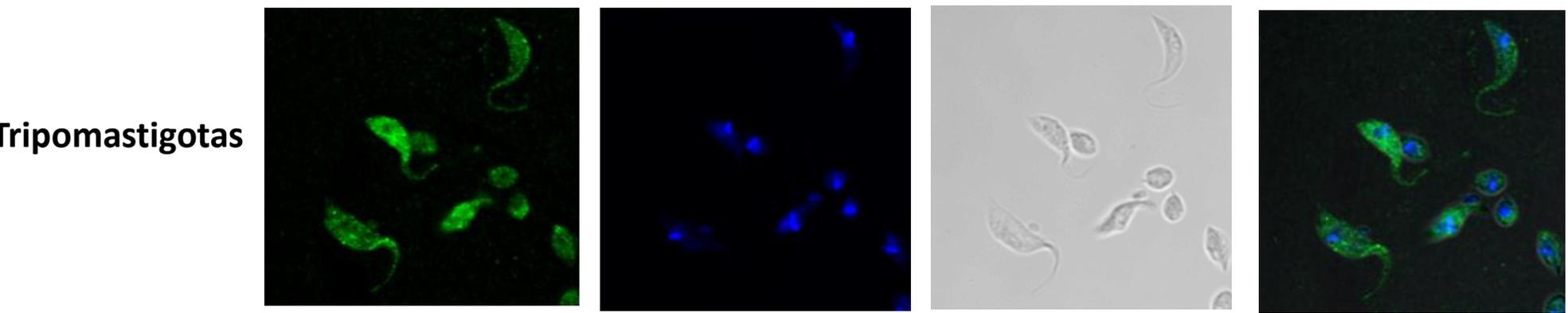
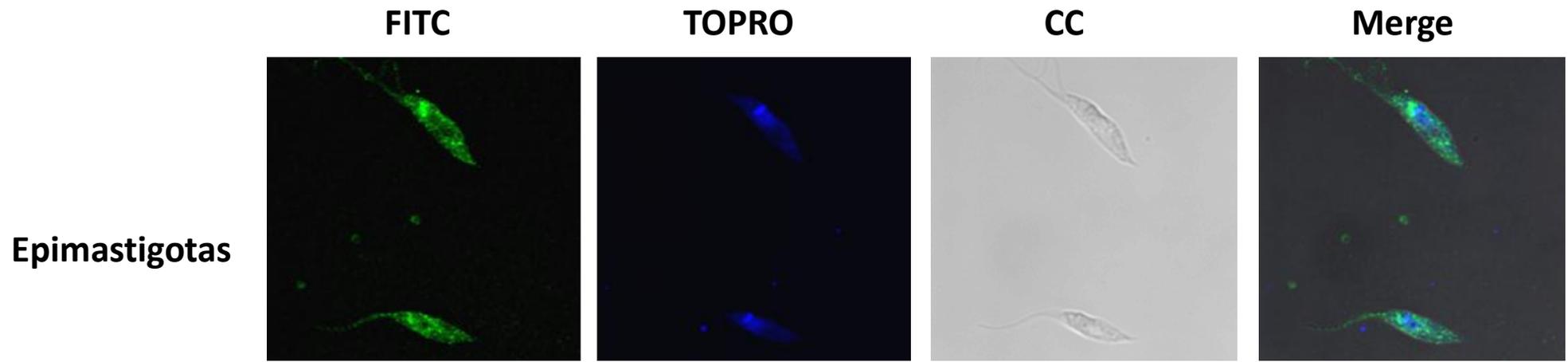


Figura 64. Localización subcelular de TR en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* cepa DM28c. Inmunofluorescencia indirecta sobre las formas epimastigota, tripomastigota y amastigota de *T. cruzi* DM28c utilizando un suero de conejo purificado anti-*T. cruzi* TR (dilución 1/1000) y el anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Alexa 488 (verde, FITC). TOPRO (azul) y faloidina (rojo) marcan ADN y filamentos de actina, respectivamente. CC: campo claro y Merge: superposición de las imágenes de FITC, TOPRO y CC. Los amastigotas se encuentran dentro de las células Vero.

8. Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a Marcelo, por abrirme las puertas de su laboratorio allá por el 2009. Por la confianza, paciencia y todo lo que he podido aprender junto a él. Esta experiencia fue sumamente enriquecedora para mi y estas enseñanzas me servirán de por vida.

No menos importante también me gustaría agradecer a mi tutora Andrea, gran persona y mejor aún compañera de laboratorio. Por todas las catársis que hemos compartido cuando las cosas no salían y la motivación para seguir intentándolo. El laboratorio no hubiera sido lo mismo sin ti.

A mis compañeros de laboratorio, los que estuvieron, los que están y los que estarán. Por siempre estar ahí en las buenas y en las malas.

A toda persona que ya sea directa o indirectamente ha contribuido a esta tesina.

A mis amigos, principalmente al H4.

A mi familia; en especial a mi madre y hermana, el apoyo incondicional de toda la vida. Por no tener ni idea de ciencia pero preguntarme siempre “¿Cómo andan *tus* vinchucas?”

A mi novio, que me ha bancado en estos años de fines de semanas de recuentos y principalmente por todo el apoyo que me ha dado en esta recta final. No lo hubiera logrado si ti.

A los integrantes del tribunal, Dra. Mercedes González, Dra. Gloria Serra, Dra. Lucia Piacenza, por la gentileza de aceptar leer mi trabajo y la gran disposición que han tenido para conmigo.

A ti, lector.