

**Caracterización biológica y  
bioquímica de la  
Tripanotión Sintetasa  
de *Trypanosoma brucei*  
*brucei***

**María Lucía Fiestas** Pappo

**Tesina de grado**  
**Tutor: Dr. Marcelo Comini**  
**Co-tutor: Dra. Andrea Medeiros**

**Licenciatura en Bioquímica**  
**Facultad de Ciencias**  
**Universidad de la República**

## Resumen

Los tripanosomátidos, responsables de varias enfermedades tropicales, poseen un metabolismo redox único basado en el tripanotión. La bis-(glutathionil)espermidina[T(SH)<sub>2</sub>] es el tiol central que aporta poder reductor para la síntesis de precursores del ADN y la detoxificación de hidropéroxidos. El tripanotión es sintetizado a partir de la conjugación de dos moléculas de glutatión a la molécula de espermidina en dos reacciones ATP-dependientes catalizadas por la enzima tripanotión sintetasa (TryS). La ausencia de un sistema basado en tripanotión en mamíferos, la falta de redundancia funcional del sistema redox dependiente de tioles de los parásitos sumado a la sensibilidad que presentan los parásitos al estrés oxidativo, hacen a los componentes de este metabolismo atractivos blancos terapéuticos. Este trabajo tuvo como objetivo principal profundizar en la caracterización biológica y bioquímica de la tripanotión sintetasa de *T. brucei brucei*. La TbTryS es una proteína abundante en la forma infectiva del parásito (del orden  $\mu\text{M}$ ), que se expresa de forma constitutiva, presentando una localización citosólica, con una distribución predominantemente granular. Esta enzima es esencial para la forma infectiva del parásito donde concentraciones por debajo de 200 nM comprometen la viabilidad celular. Frente a un estrés oxidativo prolongado, se alcanzaron niveles de expresión de la TryS y TR 4 veces por encima de los valores normales. Si bien existen transportadores para GSH, el agregado de GSH, tanto como de T(SH)<sub>2</sub>, al medio extracelular no es capaz de revertir el fenotipo de parásitos depletados de la TryS. La comparación de las Km aparentes de la forma recombinante de TbTryS para espermidina y sus derivados N<sup>8</sup>-acetilado y N<sup>8</sup>- glutathionilado, indica que la enzima requiere 6 veces menos de este último sustrato para saturarse.

# Índice

<b>Introducción.....</b>	<b>4</b>
Ciclo de <i>Trypanosoma brucei</i> .....	5
Ciclo de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
Morfología y ultraestructura de tripanosomátidos .....	8
Diagnóstico de las enfermedades .....	12
Tratamientos anti-tripanosomiasis .....	13
Metabolismo redox de tripanosomátidos: composición y funciones .....	14
Biosíntesis del tripanotión .....	21
Sistema de interferencia del ARN en tripanosomátidos .....	25
<b>Objetivos .....</b>	<b>27</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>28</b>
Cultivo de parásitos.....	8
Determinación de densidad celular .....	29
Tratamiento de parásitos con agentes oxidantes y reductores.....	30
Electroforesis en geles de acrilamida .....	30
Ensayo de <i>Western-Blot</i> .....	31
Cuantificación de bandas por densitometría .....	32
Ensayo de inmunofluorescencia indirecta .....	32
Preparación de imágenes de microscopía láser confocal .....	33
Métodos de biología molecular .....	33
Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	37
Determinación de masa molecular por cromatografía de filtración en gel .....	38
Ensayos enzimáticos .....	39
Determinación de concentraciones .....	40
Síntesis bioquímica y purificación de tripanotión .....	41

<b>Resultados .....</b>	<b>44</b>
Análisis cuantitativo de la expresión de TryS en la forma sanguínea de <i>T. brucei</i> y determinación de su concentración intracelular.....	44
Silenciamiento de la TryS mediante ARNi en la forma sanguínea de <i>T. brucei</i> . Evaluación cuantitativa.....	46
Localización subcelular de la TryS en las forma infectiva de <i>T. brucei</i> .....	48
Efectos del peróxido de hidrógeno en la viabilidad y expresión de TryS y TR en la forma infectiva de <i>T. brucei</i> .....	51
Expresión de la TryS de <i>C. fasciculata</i> y síntesis de tripanotión .....	54
Ensayos de complementación metabólica de la línea ARNi-TbTryS .....	56
Construcción de una línea sobreexpresante de la TryS de <i>T. brucei</i> .....	58
Expresión de la TryS de <i>T. brucei</i> .....	61
Determinación de Km aparente de la TbTryS para distintas poliaminas .....	63
<b>Discusión y conclusiones .....</b>	<b>65</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>70</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>76</b>

## Introducción

Los tripanosomátidos son organismos protozoarios unicelulares del orden *Kinetoplastida* que parasitan una amplia variedad de huéspedes tanto invertebrados como vertebrados o bien llevan un ciclo de vida libre. Los especímenes más relevantes para la salud humana y animal pertenecen a dos géneros: *Trypanosoma* y *Leishmania*, responsables de la muerte de más de medio millón de personas en regiones (sub)tropicales alrededor del mundo (1). En países dentro de la región sub-sahariana, *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense* son los agentes causantes de la tripanosomiasis humana africana o enfermedad del sueño mientras que *T. brucei brucei*, *T. vivax* y *T. congolense* producen la enfermedad de Nagana que afecta al ganado. Por otro lado en América, *T. cruzi* es responsable de la enfermedad de Chagas. Diferentes especies de *Leishmania* producen distintos tipos de afecciones en diferentes regiones del mundo, algunas de ellas son conocidas con el nombre de fiebre negra, espundia, úlcera oriental y Kala-Azar. Por el contrario, *Crithidia fasciculata* es un tripanosomátido apatógeno que se utiliza comúnmente como organismo modelo (1).

Los tripanosomátidos representan una de las ramas evolutivas más primitivas dentro del dominio Eukarya, caracterizados por poseer mitocondria y organelos. Se trata de microorganismos flagelados que presentan ciertas características distintivas como por ejemplo: (a) la inusual organización del ADN mitocondrial en una única gran masa de maxi y mini-círculos concatenados, que se denomina kinetoplasto; (b) la localización de la mayoría de las enzimas de la glicólisis en un organelo de tipo microcuerpo, el glicosoma; y (c) el metabolismo redox basado en un ditiol de bajo peso molecular, el tripanotión (2).

Si bien *T. brucei* y *T. cruzi* son transmitidos por insectos hematófagos, los mecanismos de transmisión varían entre ambas especies. *T. brucei* ingresa al hospedero a través de la saliva de la mosca tsetse durante la picadura, mientras que *T. cruzi* penetra al hospedero cuando las heces del insecto infectado toman contacto con la herida producida por el propio invertebrado o el hospedero en el sector de la picadura. Otras vías de transmisión de ambas especies son la transfusión sanguínea, las agujas contaminadas o la congénita.

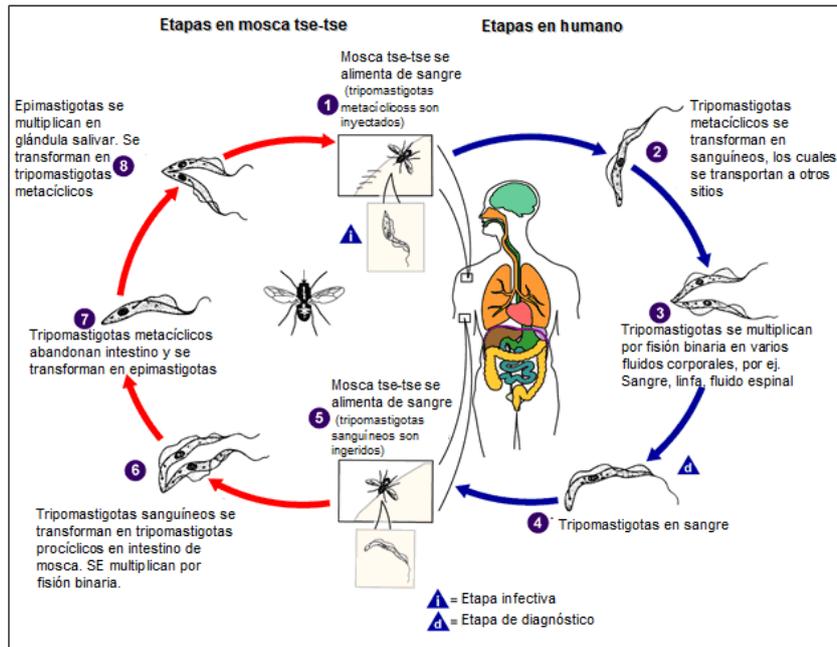
Aunque ambas especies de tripanosomátidos presentan similitudes bioquímicas y biológicas, los mismos difieren en los órganos y sistemas del hospedero donde se alojan y producen daño (forma extracelular vs. intracelular), así como en el desarrollo de la enfermedad (aguda vs. crónica)(3).

### **Ciclo de *Trypanosoma brucei*.**

Las diferentes subespecies de *T. brucei* son transmitidas por las moscas tsetse del género *Glossina* (orden *Diptera*). El vector reside casi de manera exclusiva en una región de África que comprende el sur del Sahara y el norte del desierto de Kalahari, lo cual explica por qué la enfermedad del sueño se encuentra discretamente distribuida a nivel geográfico (3). La OMS estima que alrededor de medio millón de personas portan esta infección potencialmente fatal, la cual representa la mayor tasa de muerte en África luego del HIV. Alrededor de 60 millones de personas se encuentran en riesgo de contagio, existiendo 10.000 nuevos casos de infección por año (datos actualizados al 2009). A pesar de esto, únicamente se diagnostican y tratan menos de 30.000 casos por año ([http://www.who.int/topics/trypanosomiasis\\_african/](http://www.who.int/topics/trypanosomiasis_african/))

El ciclo de vida de *T. brucei*, que comprende una etapa extracelular en un huésped mamífero (ser humano) y otra en la mosca tsetse, involucra dos estadios: tripomastigotas y epimastigotas (ver Fig. 1). El estadio tripomastigota puede aparecer bajo la forma metacíclica (en la sangre del hospedero y predominantemente en la glándula salivar de la mosca) y procíclica (en el intestino del insecto). La forma epimastigota se localiza en la glándula salivar de la mosca.

La infección del huésped humano por *T. brucei* presenta dos etapas: aguda y crónica. Luego del ingreso de los parásitos, estos proliferan en el sitio de entrada conduciendo a un nódulo o úlcera inflamatoria, que desaparece luego de 3-4 semanas. Los parásitos luego se extienden a nódulos linfáticos y alcanzan el torrente sanguíneo, iniciándose así la etapa hemolinfática o aguda de la enfermedad. En el segundo estadio de la enfermedad, el crónico, los parásitos invaden el sistema nervioso central. Estos eventos ocurren alrededor de algunas semanas luego de la infección con *T. b. rhodesiense* pero ocurren luego de meses o incluso años para *T. b. gambiense*. Esta fase se acompaña de una marcada inmunosupresión. A medida que la enfermedad avanza se produce un daño severo y progresiva del sistema nervioso central, que culmina en coma o incluso muerte si no se inicia a tiempo el tratamiento (3).



**Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *T. brucei*.** En rojo se señalan y explican las etapas que suceden dentro de la mosca tsetse, mientras que en azul aquellas que ocurren dentro del ser humano. (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

### Ciclo de *Trypanosoma cruzi*

Según datos de la OMS (actualizados al 2008), se estima que alrededor de 10 millones de personas portan esta infección, principalmente en Latinoamérica, siendo la tasa de mortalidad de 10.000 personas por año (3). Alrededor de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de contagio, cifra que se logró reducir considerablemente en la últimas dos décadas gracias a los programas de control del vector de transmisión. ([http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/))

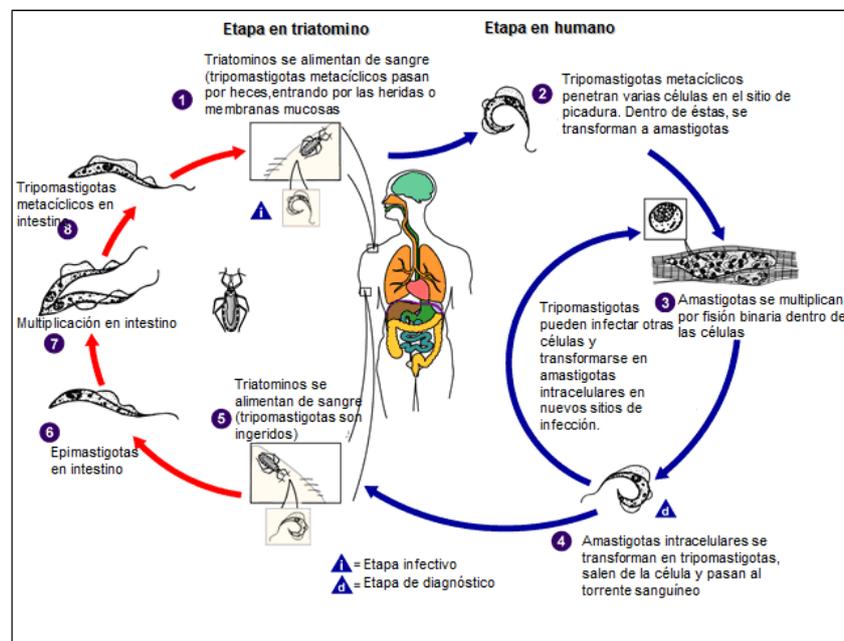
*T. cruzi* se transmite por insectos de la subfamilia *Triatominae* pertenecientes a la familia *Reduviidae* (orden *Hemiptera*). *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megitus* son los vectores más importantes. Sólo un linaje de *T. cruzi* es reconocido como causante de la enfermedad de Chagas, aunque la caracterización molecular distingue al menos dos linajes, el tipo I y el tipo II. *T. cruzi* tipo I tiene una distribución geográfica más amplia y silvestre asociada a las distintas especies de mamíferos que actúan como reservorio, como por ejemplo armadillos, marsupiales, roedores; mientras que el tipo II está restringido a algunos huéspedes con un hábitat peridoméstico, como por ejemplo perros, gatos y roedores. Por esto es que los parásitos del tipo II son los mayores causantes de la enfermedad de Chagas (3).

Luego de entrar en el organismo, *T. cruzi* invade las células del huésped. Los macrófagos tienen un importante rol inicial para reaccionar contra la infección y en transportar los

parásitos a otros sitios del cuerpo. La superficie del parásito está recubierta de una glicoproteína de tipo mucina que constituye el mayor receptor de ácido siálico transferido por trans-sialidasas de superficie. *T. cruzi* tiene varios cientos de genes que codifican para mucinas, siendo la región N-terminal hipervariable. Estas mucinas tienen un rol en la evasión de la respuesta inmune, además de proteger la membrana del parásito contra agentes externos y favorecer la adhesión celular (3).

El ciclo de vida de *T. cruzi*, que comprende una etapa intracelular en un huésped mamífero (ser humano) y otra en el insecto triatomino, involucra tres estadios: epimastigota, tripomastigota y amastigota (ver Fig.2). 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.

La manifestación clínica de la fase aguda comienza entre los 6-10 días luego de la infección y dura entre 1 y 2 meses. La inflamación en el sitio de infección produce un edema conocido como chagoma. 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 (3).



**Figura 2 Esquema del ciclo de vida de *T. cruzi*.** En rojo se señalan y explican las etapas que suceden dentro del triatomino, mientras que en azul aquellas que ocurren dentro del ser humano. (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

## ***Morfología y ultraestructura de los tripanosomátidos***

La estructura y composición celular de los tripanosomátidos es similar, aunque no idéntica, a la de una célula eucariota (ver Fig. 3). Estos parásitos conservan organelos tales como el núcleo celular, mitocondrias, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, pero han desarrollado a lo largo de la evolución nuevas estructuras celulares o modificado las ya existentes.

A continuación se enumeran algunas de las características morfológicas, ultraestructurales y funcionales más representativas de los tripanosomátidos.

### *A- Superficie celular*

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.

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 (4). 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 (4).

Un componente importante de la superficie celular son las glicoproteínas. En el caso particular de los tripanosomas africanos, 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). A diferencia de *T. cruzi* y muchos otros parásitos protozoarios, los cuales adoptan una forma intracelular, los tripanosomas africanos permanecen casi exclusivamente en el

medio extracelular, y se hayan por lo tanto expuestos a la respuesta inmune de tipo humoral. *T. brucei* logra evadir la misma mediante el recambio frecuente de las distintas variantes de glicoproteínas de superficie, el cual se lleva a cabo por la expresión secuencial de sus genes codificantes (más de mil diferentes), generando así poblaciones antigénicamente diferentes. Por esta razón, la activación de células B policlonales y el aumento de la producción de IgM son característicos de la tripanosomiasis africana (3).

#### B- Ruta de endocitosis

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. 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 (4). En la forma infectiva de *T. brucei*, la endocitosis a nivel del bolsillo flagelar cumple un rol importante en el recambio de las glicoproteínas de superficie dado que la generación de la nueva envoltura es acompañada de la remoción de la antigua a través de un proceso endocítico (5).

#### C- Flagelo

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 las membranas perimicrovillares 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) (6) 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 (7). 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 (4).

#### D- Complejo kinetoplasto-mitocondria

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 0,45  $\mu\text{m}$ , siendo altamente heterogéneos en cuanto a su secuencia, haciendo posible la diferenciación entre cepas y/o clones dentro de una misma

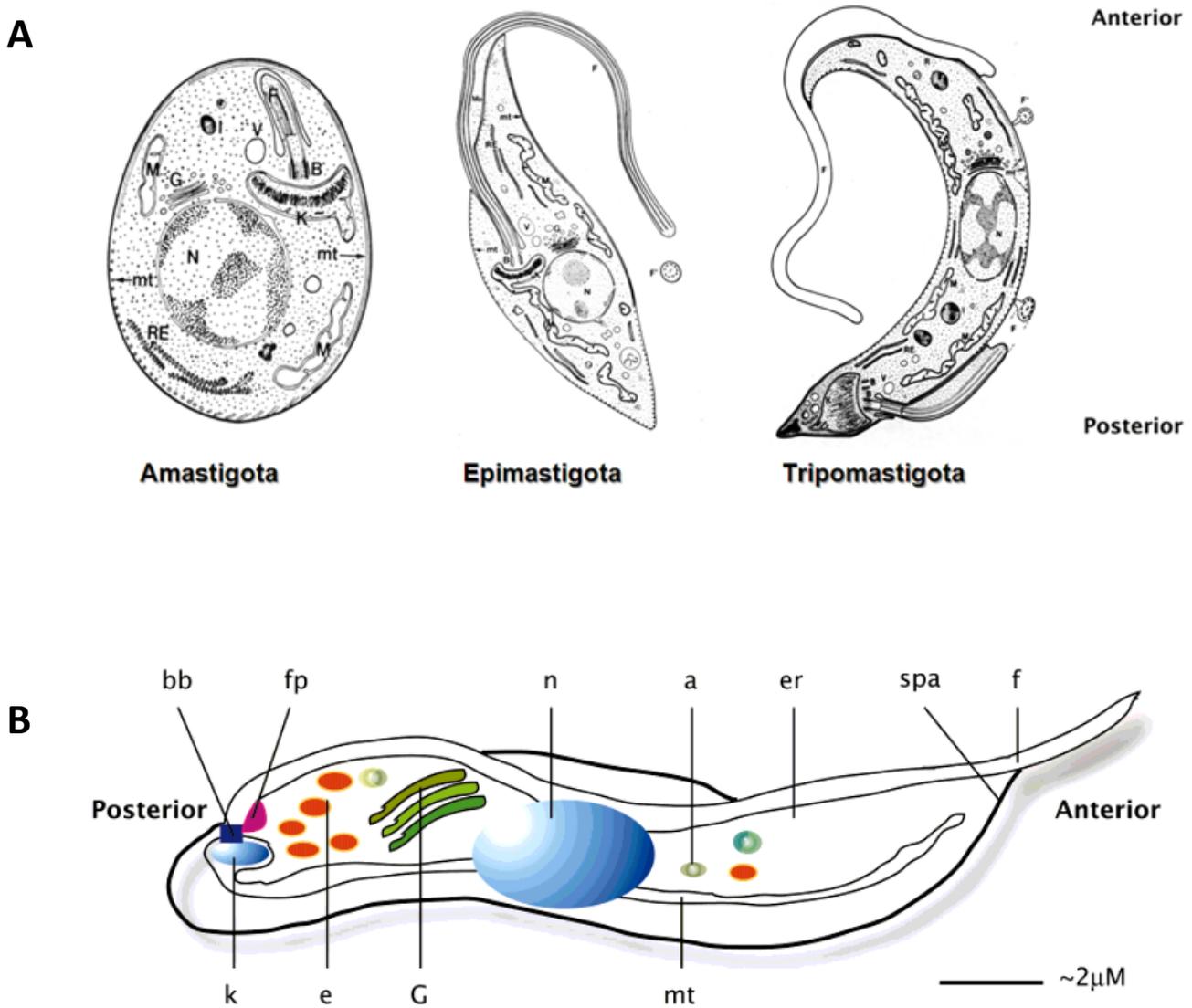
especie por ejemplo. Los minicírculos codifican para pequeños ARN guías, que controlan la especificidad del proceso de edición del ARNm formado por los maxicírculos (4). Además de los minicírculos, el K-ADN también se compone de maxicírculos de un largo de 6 a 11  $\mu\text{m}$ , siendo estos análogos, tanto estructural como funcionalmente, al ADN mitocondrial presente en todas las células eucariotas. El K-ADN codifica ARNr y subunidades de la cadena respiratoria (6). 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 (4).

#### E- *Glicosoma*

El glicosoma es un organelo redondeado o alargado con un diámetro de 0,3  $\mu\text{m}$ , alcanzando un largo máximo de 2,8  $\mu\text{m}$  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 (4). La compartimentalización de estas enzimas, típicamente citoplasmáticas en células eucariotas, le permite al parásito además afrontar periodos cortos de anaerobiosis (8).

#### F- *Acidocalcisoma*

Los acidocalcisomas son organelos acídicos 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  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar,  $\text{Ca}^{2+}$ -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 (8).



**Figura 3. Representación esquemática de la morfología y ultraestructura de los tripanosomátidos (A) Distintos estadios de *T. cruzi* y (B) Forma infecciosa de *T. brucei*. En las imágenes se señalan: acidocalcisoma (a), cuerpo basal (bb), endosoma (e), retículo endoplasmático (er), flagelo (f), bolsillo flagelar (fp), aparato de Golgi (G), kinetoplasto (k), mitocondria (mt), núcleo (n) y arreglo de microtúbulos subpeliculares (spa) (55)**

## **Diagnóstico de las enfermedades**

Para la tripanosomiasis africana, las posibilidades de detección temprana de la enfermedad son escasas, dado que los síntomas primarios de la infección son poco específicos y los métodos disponibles poseen una baja sensibilidad, por lo que en la gran mayoría de los casos el diagnóstico se realiza en una fase avanzada de la enfermedad. Las pruebas diagnósticas que se realizan se dividen en dos grupos:

*Directas* - La comprobación se hace mediante la observación de tripanosomas en sangre, líquido céfalo raquídeo, medula ósea y aspirado de chancro (úlceras) o ganglio linfático. Esta metodología sólo detecta entre el 30 y 70% de los casos

*Indirectas* - La respuesta inmune del huésped es el factor fisiopatológico principal para el diagnóstico, ya que los niveles de IgM se encuentran siempre elevados. El recuento de linfocitos también da elevado (mayor a  $5 \times 10^6/L$ ), aparecen células plasmáticas espumosas (*foamy cells*) y las proteínas del fluido cerebroespinal aumentan (más de 25 mg/100mL).

Las pruebas serológicas empleadas en el laboratorio para detectar anticuerpos séricos son: ELISA, inmunofluorescencia indirecta o hemaglutinación indirecta. Actualmente estas pruebas serológicas son útiles únicamente contra *T. b. gambiense* (3)

Para el caso del mal de Chagas, aparte de un diagnóstico sintomático (signo de romaña, chagoma, fiebre, inflamación de ganglios linfáticos, malestar general, etc), las pruebas diagnósticas que se realizan también se dividen en dos grupos:

*Directas* - Detección microscópica de parásitos (tripomastigota) en la sangre no-coagulada del paciente o en un frotis sanguíneo bajo la tinción de Giemsa, lo que es posible realizar sólo en la fase aguda (2 semanas post-infección). Esta técnica permite detectar más del 60% de los casos de infección aguda.

*Indirectas* - Pruebas inmunológicas que detectan de anticuerpos específicos contra el parásito en suero de pacientes. Al ser una enfermedad crónica, donde los parásitos permanecen en estado latente en los tejidos, la IgG permanecerá positiva por el resto de la vida, motivo por el cual la evaluación del título de esta inmunoglobulina tiene valor diagnóstico. La presencia de IgM, en cambio refleja una etapa aguda dada por la primoinfección. Los inmunoensayos pueden realizarse, al igual que para *T. brucei*, por: ELISA, hemaglutinación indirecta, fijación del complemento, aglutinación directa o de partículas e inmunofluorescencia indirecta.

- Detección del ADN del parásito por PCR.

- Xenodiagnóstico, donde el paciente es intencionalmente expuesto a la picadura por el insecto transmisor no contaminado y cuatro semanas después el intestino de este último es examinado en la búsqueda de parásitos; o por la inoculación de la sangre del

enfermo en animales de laboratorio (ratones, por ejemplo) y posterior confirmación de infección de los mismos.

### **Tratamientos anti-tripanosomiasis**

Existen 4 drogas con licencia para el tratamiento de la enfermedad del sueño. Dos de ellas, pentamidina y suramina, son usadas antes del compromiso del SNC. En la etapa tardía de la enfermedad, el fármaco utilizado es el melarsoprol y la eflornithina que sólo resulta efectiva contra *T. b. gambiense* (53,54). Todas estas drogas provocan efectos adversos en los pacientes. Por ejemplo, melarsoprol causa encefalopatía en aproximadamente 1/5 de los pacientes. A su vez, una proporción considerable (2-12%) de los infectados muere como resultado del tratamiento (3). La epidemia actual de la enfermedad del sueño se caracteriza por niveles inusualmente altos de recaídas luego del tratamiento con melarsoprol, lo cual indica la aparición de resistencia a la droga (3).

Por otra parte, la terapia antichagásica depende de dos fármacos: nifurtimox y benznidazol (54). El nifurtimox, 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 (3). Se ha propuesto que el grupo nitro de ambos compuestos heterocíclicos es reducido a un grupo amino por nitroreductasas del parásito, con la formación de un radical libre intermediario y metabolitos electrofílicos. Se cree que el nifurtimox actúa como agente pro-oxidante, produciendo  $O_2^-$ , mientras que el benznidazol actúa principalmente a través de la formación de conjugados con grupos nucleofílicos de proteínas o tioles de bajo peso molecular (9,10). Dado que las especies reactivas generadas por estos fármacos no discriminan entre moléculas del parásito y el hospedero, ambos compuestos presentan serios efectos secundarios, y ninguno resulta altamente eficaz para combatir la etapa crónica de la enfermedad. Es así que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas es altamente prioritaria (3).

Aquellas rutas bioquímicas indispensables para los tripanosomátidos y no compartidas con los mamíferos, son interesantes fuentes de potenciales candidatos para el diseño de drogas más específicas y efectivas. Sin embargo, cierta divergencia biológica entre *T. brucei* y *T. cruzi* plantea un gran desafío para el desarrollo de fármacos doblemente eficaces. Por ejemplo, para el tratamiento de la fase tardía de la tripanosomiasis africana, las drogas deberían ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica para ser efectivas. En el caso de la fase crónica de la enfermedad de Chagas, un tratamiento exitoso debería incluir compuestos capaces de eliminar el estadio intracelular del parásito (amastigotas) sin producir efectos tóxicos en las células del huésped.

### **Metabolismo redox: composición y funciones**

Los organismos aerobios utilizan oxígeno (O<sub>2</sub>) para la respiración y oxidación de nutrientes con el fin de obtener energía. Especies reactivas del oxígeno (EROs), como el radical aniónico superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (·OH), así como especies reactivas del nitrógeno (por ejemplo ONOO<sup>-</sup>), son generadas continuamente en células que crecen de forma aerobia o en respuesta al medio ambiente (como por ejemplo la radiación UV o compuestos que al ser metabolizados por la célula generan EROs) (11). 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 (12). Los radicales y peróxidos pueden atacar directamente los ácidos grasos poliinsaturados 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 poliinsaturados 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 (12).

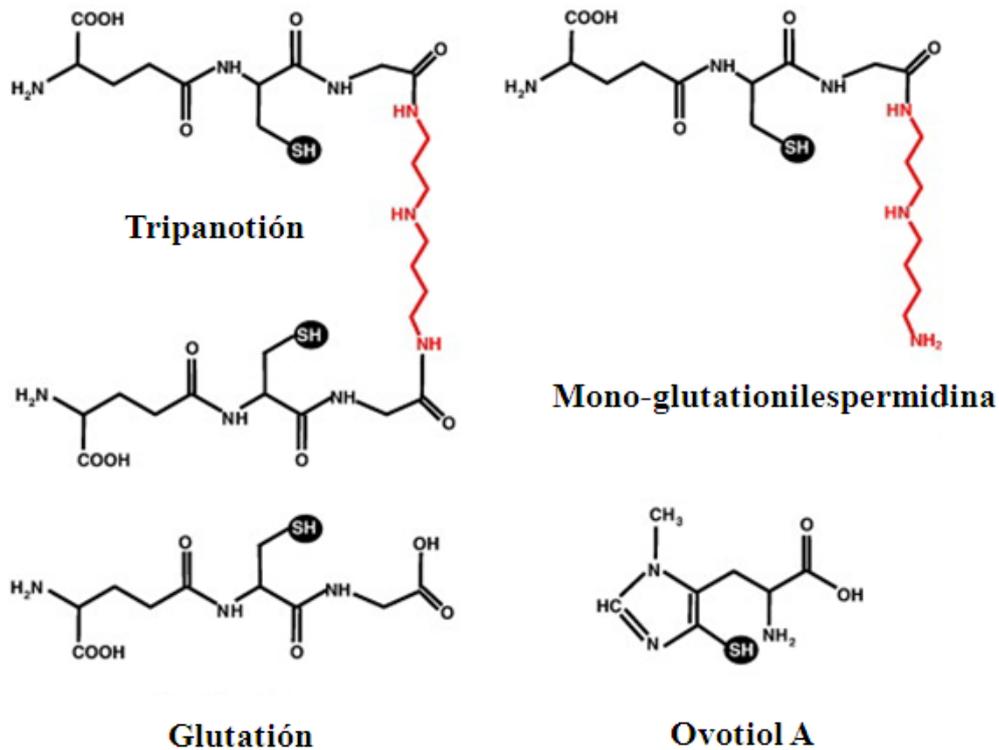
A lo largo de su evolución los organismos vivos desarrollaron mecanismos de protección contra las especies oxidantes. Uno de ellos lo constituyen los grupos tiólicos activos tanto en proteínas como en compuestos de bajo peso molecular que juegan un rol fundamental como amortiguadores que equilibran cualquier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

#### *Composición*

Los kinetoplastos están equipados con tioles de bajo peso molecular (ver Fig. 4) 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 [N<sup>1</sup>-N<sup>8</sup>-bis (glutationil)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 (13). Trabajos posteriores confirmaron su existencia en distintas especies de la familia *Trypanosomatidae* (1). 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 recientemente confirmaron que estos organismos carecen de glutatión reductasa (GR) y tiorredoxina reductasa (TrxR), dos enzimas que gobiernan la homeostasis redox en las células de mamíferos (1,2). 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 de tripanotión y una oxidoreductasa, la triparredoxina (TXN), que aporta control catalítico a las reacciones de oxidoreducción dependientes del ditiol. 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, son indicadores de la gran eficiencia de este sistema redox condensado, si se lo compara al presente en otros organismos eucariotas (1).

El tripanotión reemplaza a GSH en la mayoría de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro que ocurren a nivel celular. Se ha determinado que  $T(SH)_2$  presenta una 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 forma desprotonada, tiolato, la cual es más reactiva para intervenir en reacciones de intercambio tiol-disulfuro. 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 ( $RSO\cdot$ ), 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, mientras que para *T. brucei* sanguíneos los valores oscilan entre 0.1 y 0.34 mM y para procíclicos su valor es cercano a 0.34 mM (1). Al menos en *Leishmania major*, la enzima encargada de la síntesis de tripanotión fue detectada en el citoplasma (14). 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 (10).

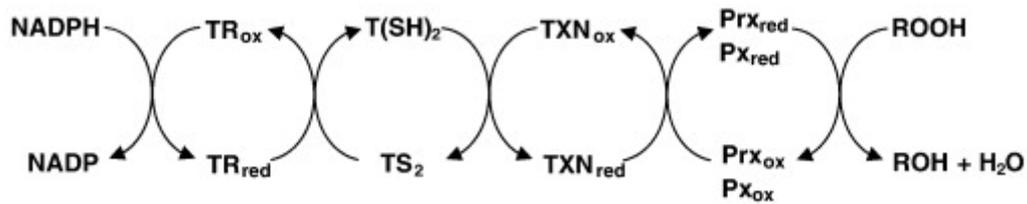


**Figura 4. Tioles de bajo peso molecular presentes en tripanosomátidos.** El glutatión (GSH), un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina, contiene un enlace péptido inusual ( $\gamma$ ) entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutámico. El tripanotión [T(SH)<sub>2</sub>] es el principal (di)tiol de bajo peso molecular de los tripanosomátidos, formándose a partir de la conjugación de 2 GSH (en negro) y una molécula de espermidina (en rojo). Mono-glutationilespermidina (intermediario en la síntesis de tripanotión) y ovotiol A son otros dos tioles de bajo peso molecular presentes en estos parásitos. Los grupos sulfhidrilo de las moléculas se marcan con círculos negros.

El tripanotión se mantiene en su estado reducido gracias a la actividad de una enzima NADPH-dependiente, la tripanotión reductasa (TR) (ver Fig. 5). Esta enzima, perteneciente a la familia de las FAD-cisteín-oxidoreductasa, es un homodímero, con una masa de 55 kDa por subunidad (52). 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 tripanotión y glutationilespermidina mientras que GR sólo acepta glutatión oxidado cuya carga neta es negativa (GSSG). 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. 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 haya en este compartimento además del citosol. 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 (10, 51).

Triparredoxina 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: (a) comparten sólo un 15% de homología con ellas, (b) son aproximadamente 5 kDa más grandes que las Trxs y (c) su sitio activo es WCPPCR, en lugar del clásico WC(G/A)PCK presente en la mayoría de las Trxs. A diferencia de las Trxs típicas, TXN no es reducida directamente por una flavoproteína NADPH-dependiente (la TrxR) sino por tripanotión, el cual se reduce a expensas de la flavoenzima TR y NADPH (ver Fig. 5). TXN es una proteína muy abundante, en la forma infectiva de *T. brucei* alcanza una concentración intracelular de 100  $\mu$ M (15) mientras que en *C. fasciculata* representa entre un 3-5% del contenido proteico soluble total de la célula (16). 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 tripanotión (16). El mecanismo de reacción de la TXN con sus blancos involucra a ambas cisteínas de su sitio activo. La cisteína más 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 mixto 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. La regeneración de TXN reducida se da por una reacción espontánea con el tripanotión (1). Los sustratos mejor estudiados de la TXN son distintos tipos de peroxidasas y la ribonucleótido reductasa. 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) (17), en la biogénesis de centros ferro-sulfurados (glutarredoxinas monotiólicas) (18), en la generación de NADPH y pentosas-5-fosfato (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) (1), precursores de poliaminas (cistationin- $\gamma$ -liasa, metiltioadenosin fosforilasa, amidino transferasa) y algunas involucradas en la síntesis y degradación proteica (1,19). 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.

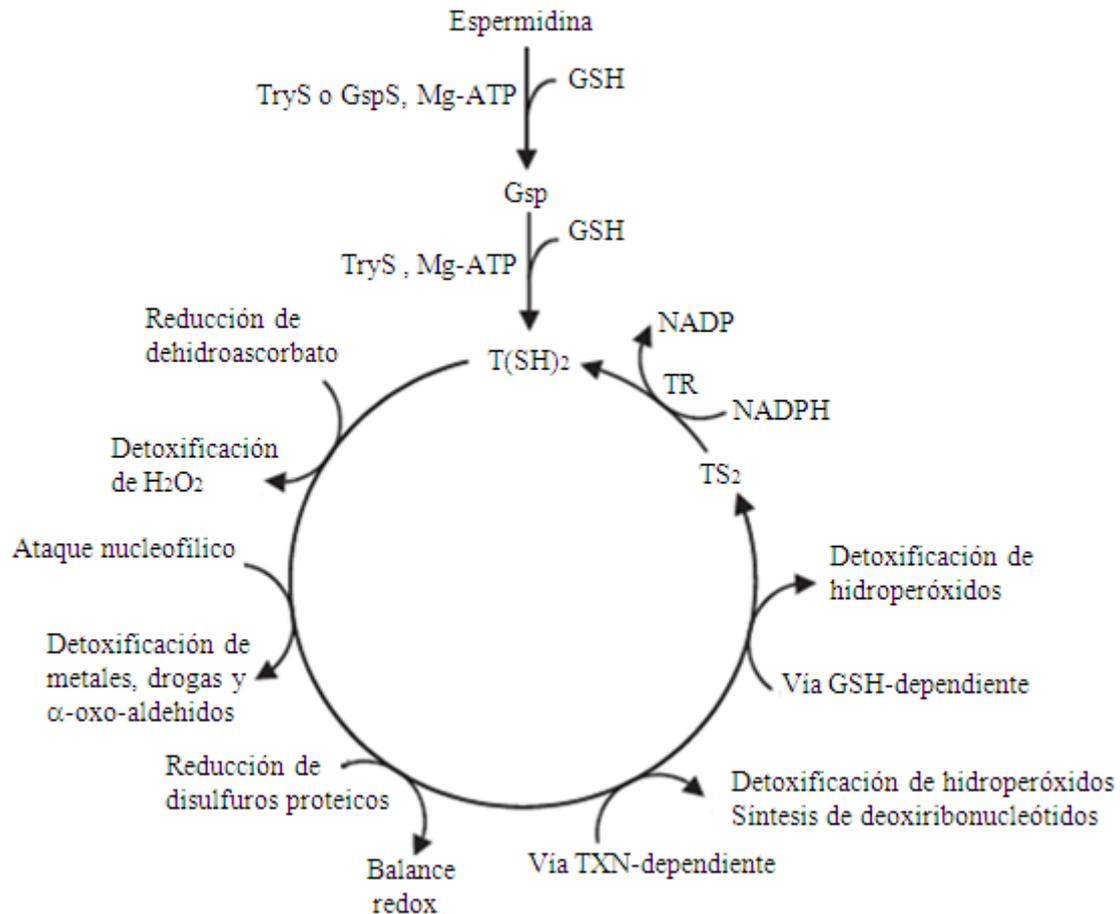


**Figura 5. Esquema del metabolismo de peróxidos mediado por tripanotión.** La detoxificación de peróxido (ROOH) se logra gracias a la participación de las enzimas peroxirredoxinas (Prx) y peroxidasa (Px), las cuales obtienen sus equivalentes de reducción de una cascada compuesta por tripanredoxina (TXN), tripanotión [T(SH)<sub>2</sub>] y tripanotión reductasa (TR), siendo el NADPH la principal fuente de electrones. Los subíndices red y ox hacen referencia al estado de redox, ditiólico o disulfúrico, respectivamente, de las proteínas.

### Funciones

#### A- Defensa antioxidante: metabolismo de hidroperóxidos.

Una de las rutas metabólicas a las cuales el tripanotión dona poder reductor es aquella que incluye los sistemas de detoxificación de especies oxidantes (ver Fig. 5) tal como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el peroxinitrito, ciertos peróxidos de compuestos orgánicos de cadena corta, de ácidos grasos y de fosfolípidos. 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, peroxidasa del tipo glutatión peroxidasa (GPx) y las superóxido dismutasas (SOD). *T. cruzi* posee además una hemoperoxidasa ascorbato-dependiente (APx) (10). 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 (20, Medeiros y col. no publicado). Esto puede interpretarse como una adaptación del parásito previa a la invasión del huésped, en el cual deberá hacer frente a las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno generadas por las células del sistema inmune. En ese sentido, los macrófagos activados por citoquinas proinflamatorias (como por ejemplo IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) 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 sugerido 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<sub>2</sub><sup>-</sup> que en presencia de NO forma peroxinitrito (20), una molécula altamente tóxica capaz de matar al parásito recientemente fagocitado. Dentro de las enzimas antioxidantes del parásito se destacan las peroxidasa del tipo peroxirredoxina clásicas (PRXs) y las estructuralmente relacionadas a las glutatión peroxidasa (GPXs). Ambos grupos de enzimas emplean TXN como fuente de electrones durante la descomposición de peróxidos, y por lo



**Figura 6. Formación y funciones del tripanotión.**

tanto a nivel de actividad biológica se las denomina como triparredoxina-peroxidadas. Las PRXs presentan actividad reductora de hidropéroxidos, peroxinitrito e hidropéroxidos orgánicos. 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 (21,22). 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 (16).

La APx es una hemoperoxidasa localizada en el retículo endoplásmico de *T. cruzi*, la cual utiliza ácido ascórbico como agente reductor (23). 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, la función de esta enzima dependería en última instancia del poder reductor provisto por el sistema redox del tripanotión (ver Fig. 6) (10, 24).

Además de tripanotión y glutatión, *T. cruzi* también presenta otros tioles de bajo peso molecular, incluyendo a la mono-glutationilpermidina (Gsp) y ovotiol A (N1-metil-4-mercaptohistidina (ver Fig. 4). La concentración de estos tioles varía durante el ciclo de vida del parásito y sus fases de crecimiento, siendo el tripanotión el más abundante en todas las etapas (1). Aunque se han reportado algunas funciones para la Gsp y el ovotiol A *in vitro*, (1, 56, 61, 62) las mismas no fueron verificadas *in vivo*. Por otro lado, el pool de tioles de bajo peso molecular, incluyendo al T(SH)<sub>2</sub>, podría estar jugando un rol importante como *buffer* y *scavenger* de radicales primarios de NO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (:NO<sub>2</sub> o CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y de proteínas (radical tirosil) (10).

#### *B- Síntesis de ADN*

El tripanotión 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)<sub>2</sub> 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 (TS<sub>2</sub>) 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 (1). Asimismo se ha sugerido que T(SH)<sub>2</sub> 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 (10,17).

#### *C- Defensa contra xenobióticos*

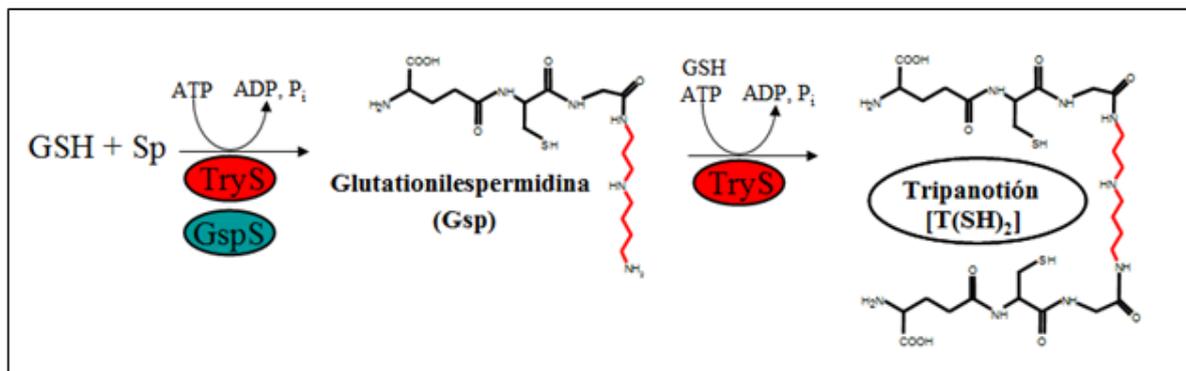
Los organismos superiores están equipados con una gran familia de glutatión-S-transferasas capaces de catalizar el ataque nucleofílico del glutatión a una variedad de xenobióticos electrofílicos e hidrofóbicos, para formar productos S-conjugados que son generalmente menos tóxicos y más fáciles de excretar que los compuestos originales. En tripanosomátidos, no se ha encontrado actividad glutatión S-transferasa (25), 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 tripanotión y glutationilpermidina, denominada tripanotión S-transferasa (26). 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).

### D- Detoxificación de metales pesados

Los grupos tiólicos son blancos de drogas que poseen metales pesados en su estructura y que incluyen mercurio, cadmio, oro, arsénico, entre otros. Algunos metales, como el zinc o cobre, son nutrientes traza que participan como cofactores de una gran variedad de enzimas indispensables, sin embargo en altas concentraciones estos metales resultan citotóxicos. El secuestro de estos metales involucra frecuentemente a grupos sulfidriilo, presentes tanto en moléculas de bajo peso molecular como en proteínas ricas en cisteína. En ese sentido, se ha demostrado que el tripanotión confiere protección contra ciertos metales pesados como el  $\text{Cd}^{2+}$  o el  $\text{Hg}^+$  (25).

### Biosíntesis del tripanotión

La síntesis del tripanotión es resultado de la convergencia de las rutas metabólicas del GSH y la espermidina, las cuales se encuentran desvinculadas en mamíferos. El tripanotión se crea por la unión secuencial covalente de dos moléculas de GSH a los grupos  $\text{NH}_2$  terminales de la espermidina, proceso que consume un total de dos moléculas de ATP (ver Fig. 7). 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 glutamilsteína 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. 8) (10).

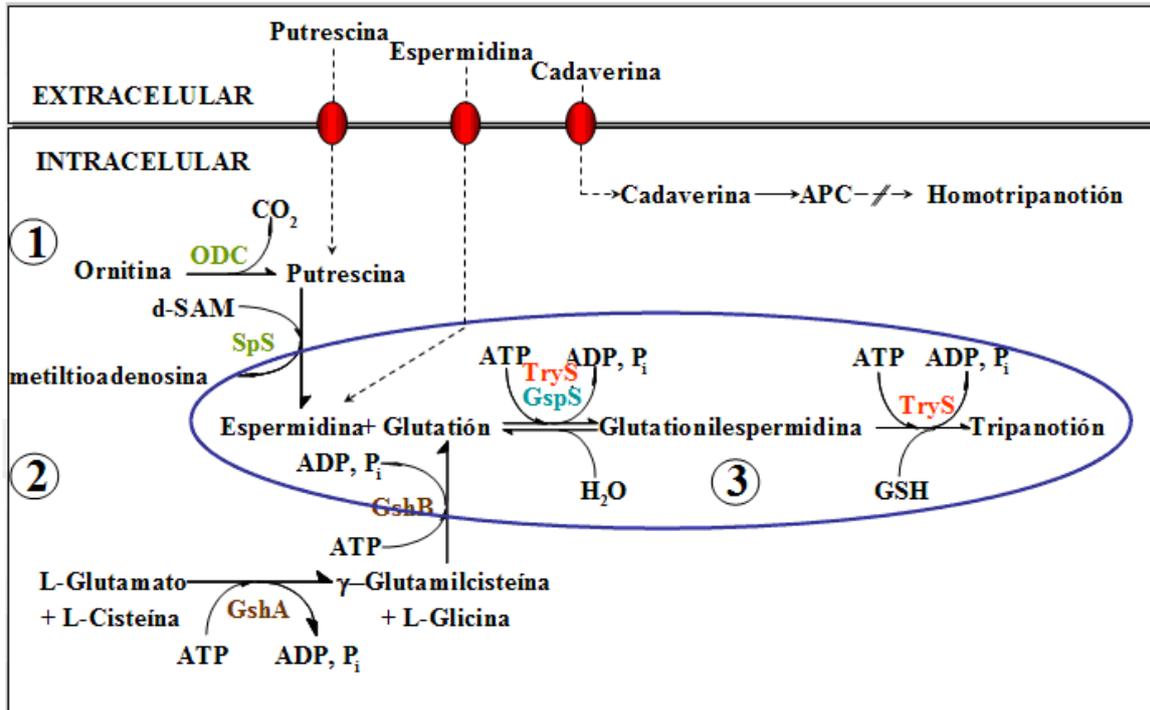


**Figura 7. Biosíntesis del tripanotión.** La formación de tripanotión requiere ATP y ocurre en dos etapas sucesivas, en las cuales se adiciona una molécula de glutatión (GSH-en negro) a espermidina (Sp -en rojo) o a mono-glutationil-espermidina. La enzima tripanotión sintetasa (TryS) es capaz de catalizar ambas reacciones de conjugación, mientras que la monoglutationil-espermidina sintetasa (GspS) sólo la primera.

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. 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 (27). 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. 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 procariotas y el parásito protozoario *Cryptosporidium parvum*. Esta vía involucra a la enzima arginina descarboxilasa (ADC), que forma agmatina a partir de arginina y la agmatinasa que convierte agmatina en putrescina (ver Fig. 8) (10).

Ambos pasos en la reacción de síntesis de tripanotión pueden ser catalizados por una única enzima, denominada tripanotión sintetasa (TryS), que ha sido caracterizada tanto para *T. cruzi* como *T. brucei*, *L. major* y *C. fasciculata* (ver Fig. 7 y 8) (14, 41, 47, 59, 60). Esta enzima se presenta como monómero con un peso molecular de aproximadamente 74 kDa. El gen de la TryS de *T. cruzi* es de copia única por genoma haploide y la proteína que codifica presenta un 74-81% de identidad con las secuencias aminoacídicas correspondientes a las homólogas de otros tripanosomátidos. Cabe destacar que no existen homólogos de esta enzima en los mamíferos. En presencia de cantidades iguales de GSH y espermidina, el T(SH)<sub>2</sub> se forma sin aparente acumulación de Gsp. La actividad sintetasa de la TryS reside en su dominio C-terminal. El mecanismo catalítico propuesto involucra la formación de un complejo ternario entre GSH, Mg<sup>2+</sup>-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 glutationilación del grupo amino terminal de la espermidina o Gsp (10).

Aparte de la TryS, *C. fasciculata* posee una glutationilespermidina sintetasa (GspS) (59,60). Esta enzima posee una Km por la espermidina 126 veces menor que la CfTryS y una relación Kcat/Km para este sustrato que es de dos órdenes de magnitud superior al de esta última enzima (28). 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. 7 y 8). 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. TcGspS comparte un 63% de identidad con CfGspS y contiene ciertos residuos de arginina que participan en la unión del sustrato a la enzima (28,29). Se ha sugerido que la Gsp, aparte de ser el intermediario en la biosíntesis de tripanotión, cumple funciones de almacenamiento de espermidina y GSH (1). Su forma disulfuro es reducida por la TR con una eficiencia comparable a la



**Figura 8. Esquema de las síntesis de (1) espermidina (2) glutatión y (3) tripanotión.** *T. cruzi* es incapaz de sintetizar poliaminas *de novo*, por lo tanto debe incorporar putrescina, espermidina y cadaverina del medio extracelular (las rutas de transporte se muestran con líneas punteadas). La cadaverina exógena puede convertirse, vía aminopropilcadaverina (APC) en homotripanotión en *T. cruzi* (no se muestran los pasos adicionales). La biosíntesis de espermidina (1) ocurre en tripanosomas africanos y leishmania a través de dos reacciones: i) decarboxilación de la ornitina por la ornitina decarboxilasa (ODC), ii) transferencia de un grupo aminopropil desde d-SAM hasta la putrescina por la espermidina sintasa (SpS), este último paso tiene lugar en *T. cruzi*. La ruta de biosíntesis de GSH (2) es compartida por todos los tripanosomátidos y otras células eucariotas, consiste en dos reacciones ATP dependientes catalizadas por i)  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa (GshA) y ii) glutatión sintetasa (GshB). En *C. fasciculata*, la biosíntesis de tripanotión involucra la conjugación ATP-dependiente del GSH a las dos aminas primarias de la espermidina vía dos enzimas diferentes: i) glutationileespermidina sintetasa (GspS) y ii) tripanotión sintetasa (TryS), mientras que *L. major* y *T. brucei* disponen únicamente de una TryS para llevar a cabo dicha reacción.

reacción que tiene lugar con TS<sub>2</sub>. Además, la 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 (10).

A su vez, además de presentar actividad sintetasa, todas las TryS y GspS estudiadas hasta la fecha presentan una actividad T(SH)<sub>2</sub>/Gsp- amidasa localizada en el dominio N-terminal. 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.

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 N<sup>1</sup>-acetiltransferasa. 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 superior a la de los mamíferos (menor a una hora) (25). Esto plantea la posible existencia de vías alternativas de regulación del *pool* de poliaminas

Los niveles de poliaminas se ven elevados durante la fase de crecimiento exponencial en tripanosomátidos. En *C. fasciculata*, la espermidina libre puede ser secuestrada como N-glutationilespermidina o tripanotión en la fase estacionaria de crecimiento, cuando comienzan a escasear los nutrientes y el medio de cultivo se acidifica. Cuando el parásito es nuevamente cultivado en condiciones óptimas, la N-glutationilespermidina y el tripanotión se convierten rápidamente en espermidina libre y glutatión, 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 glutationilespermidina sintetasa y tripanotión sintetasa (ver más adelante) (25).

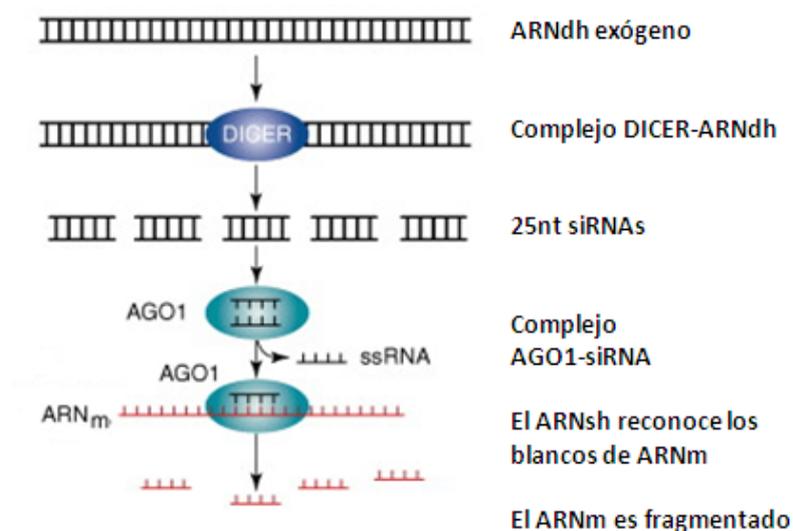
La TcTryS tiene un amplio espectro de especificidad por sustratos poliamínicos, como la aminopropilcadaverina y la espermina. Los respectivos productos glutationilados, llamados homotripanotión y mono o bis-(glutationil) espermina, también son sustratos de la TR (10). Esta afinidad por distintas poliaminas 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 tripanotión pueden participar en las mismas reacciones/funciones asignadas a este último.

La relevancia del metabolismo redox tripanotión-dependiente se ha demostrado experimentalmente a través de la tecnología de ARNi. La disminución en los niveles de muchas enzimas involucradas en la formación, regeneración y utilización (GshA, TR, TXN-1, cTXNPx, TryS, Gpx-1 y SpS) de este ditiol, ha demostrado que éstas son indispensables para la sobrevivencia del parásito (10).

### **Sistema de interferencia del ARN en tripanosomátidos.**

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 sirve como, control del desarrollo celular/tisular (30). 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 (58). A la fecha, se han descrito 3 clases de pequeños ARNs: 1) pequeños ARNs interferentes (siRNA) doble hebra derivados de ARNdh endógeno o exógeno que producen la degradación de ARNm blancos vía apareamiento complementario y activación del complejo DICER-RISC (*RNA induced silencing complex*); 2) micro ARNs (miRNAs) simple hebra derivados de *hairpins* de aproximadamente 70 nucleótidos; 3) pequeños ARNs heterocromáticos similares en estructura a los siRNAs, derivados de transcritos de ARNdh de regiones cromosómicas de heterocromatina (31).

La ruta de interferencia en tripanosomas africanos involucra dos complejos multidominio: DICER y RISC. DICER es un complejo proteico multidominio capaz de generar pequeños siRNAs a partir del ARNdh. Este complejo presenta un dominio PAZ de unión al ARN y dos dominios ARNasaIII capaces de degradar el ARNdh a siRNA.



**Figura 9. Representación esquemática del mecanismo y componentes más relevantes del fenómeno de silenciamiento postranscripcional mediado por ARN doble cadena (interferencia del ARN).**

A causa de la distancia entre ambos dominios catalíticos de la RNAsaIII de cada subunidad (DICER forma dímeros), es que los siRNAs 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 siRNAs (30).

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 (siRNAs). 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 (ver Fig. 9) (32).

El mecanismo de interferencia de la transcripción se utiliza 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 dentro de la ruta del ARNi (31).

Por otra parte, tanto *T. cruzi* como *L. major* serían incapaces, en principio, de llevar a cabo el silenciamiento de genes mediado por ARN doble cadena ya que no contienen en su genoma secuencias homólogas para AGO1 ni para alguno de los otros genes que componen los complejos DICER y RISC (31, 57).

## *Objetivo general*

Profundizar la caracterización biológica y bioquímica de la tripanotión sintetasa del tripanosoma africano *T. brucei brucei*. Los estudios biológicos se realizaron sobre la forma infectiva del parásito mientras que los análisis bioquímicos sobre la forma recombinante de la proteína.

## *Objetivos específicos*

- 1- Análisis cuantitativo de la expresión de la tripanotión sintetasa (TbTryS) en la forma sanguínea de *T. brucei* y determinación de la concentración intracelular de la proteína.
- 2- Determinación de la concentración de TryS compatible con la sobrevivencia del parásito en cultivo mediante el empleo de una línea celular de *T. brucei* con ARN interferente para la TryS.
- 3- Evaluación de los niveles de expresión de la TbTryS en parásitos sometidos a tratamiento con un agente oxidante.
- 4- Generación de una cepa sobreexpresante de TryS en *T. brucei*
- 5- Síntesis bioquímica de tripanotión y ensayos de complementación metabólica en línea celular de *T. brucei* depletada de TryS
- 6- Producción de TbTryS recombinante y análisis preliminar de parámetros cinéticos.

# Materiales y métodos

## 1- Materiales

Todos los químicos utilizados fueron de la más alta pureza de Sigma-Aldrich.

Las enzimas utilizadas en métodos de biología molecular fueron de Invitrogen, Roche o New England Biolabs.

## 2- Métodos

### 2.1 - Cultivo de parásitos

En este trabajo se emplearon las líneas celulares 514-1313 y 514-1313/p2T7TA-177-28 de la forma sanguínea de *T. brucei* cepa 427, las cuales contienen integrado en su genoma secuencias codificantes para la T7-ARN polimerasa (plásmido 514), la proteína represora de tetraciclina (plásmido 1313) y el cassette de ARN de interferencia para la TryS de *T. brucei* (vector p2T7TA-177-28 ver Fig. 10) (33). La primera de estas líneas celulares se denominó línea control (o wild-type WT) y la segunda línea ARNi-TbTryS.

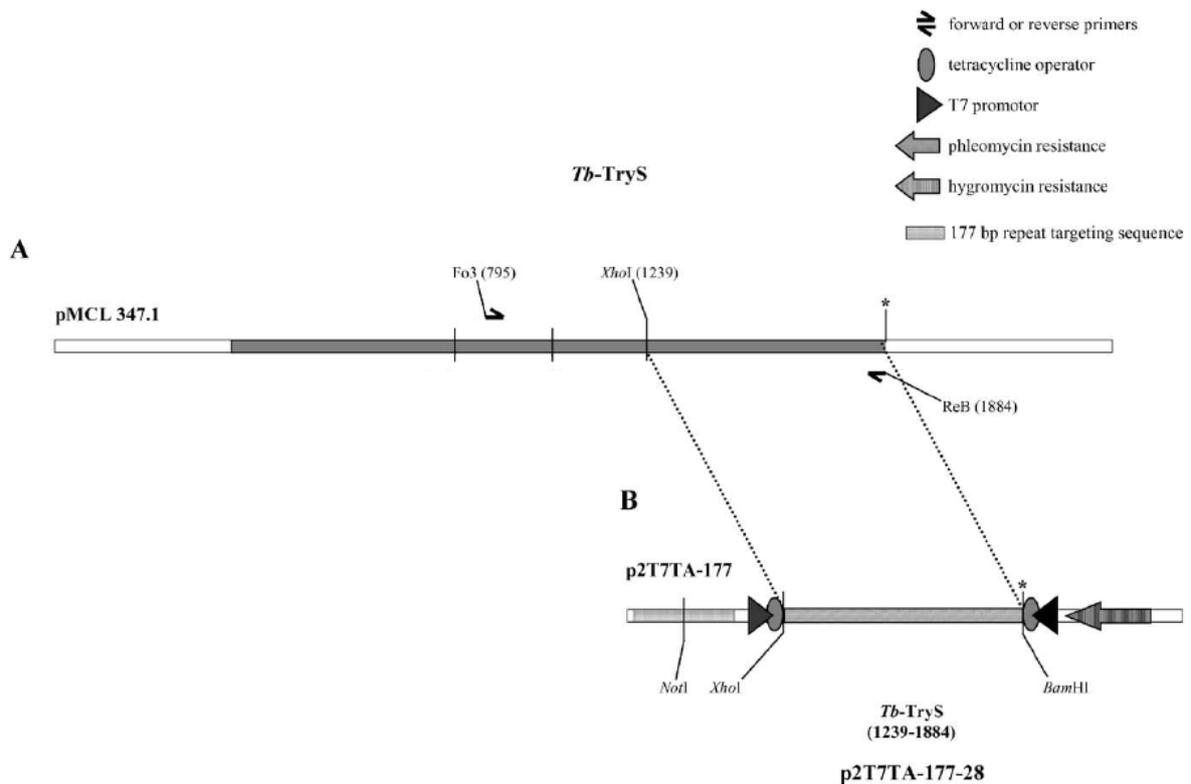
Los cultivos se realizaron en medio HMI-9 completo suplementado con 10% suero fetal bovino libre de tetraciclina (PAA), diferentes antibióticos dependiendo de la línea celular (ver Tabla 1), e incubando en forma aeróbica a 37°C en estufa gaseada con 5% de CO<sub>2</sub>.

Tabla 1. Composición del medio HMI-9.

	Medio HMI-9 básico	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	
Suplementos		Stock	mL/L de medio
	Bactocuproína	2,82 mg/mL	10
	Timidina	3,9 mg/mL	10
	Hipoxantina	13,6 mg/mL	10
	L-cisteína	18,2 mg/mL	10
	β –mercaptoetanol	14,3 M	0,014

		línea 514-1313	Línea 514-1313 p2T7TA-177-28
Antibióticos	Penicilina/ Estreptomicina	0,01 µg/mL	0,01 µg/mL
	Fleomicina	0,2 µg/mL	0,2 µg/mL
	Gentamicina	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL
	Higromicina	-	5 µg/mL



**Figura 10. Esquema de la construcción plasmídica que controla de manera inducible el ARNi de la TryS.** (A) Fragmento del vector pMCL 347.1 con la secuencia codificante de la TbTryS (en gris), donde se muestra la posición de los *primers* y sitios de restricción que se utilizaron para las posteriores estrategias de subclonado, el asterisco marca el codón STOP. (B) Construcción p2T7TA-177.28 derivada de un fragmento de 1,1 kb de la TbTryS que fue digerido con XhoI/BamHI e insertado como un producto de 650 pb entre los promotores T7 del vector p2T7TA-177.

## 2.2 – Determinación de densidad celular

Para determinar la densidad celular, los cultivos de *T. brucei* se homogeneizaron sacudiendo la botella de cultivo brevemente o por pipeteo repetido en los pocillos de placas de cultivo. 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. Las células viables (definidas como móviles y morfológicamente normales) ubicadas en los cuatro cuadrantes laterales, compuestos de 16 campos cada uno de ellos, de cada hemicámara se contaron y el promedio  $[(n_1/4 + n_2/4)/2]$  se multiplicó por  $1 \times 10^4$  para obtener el número de células por mL. En caso de corresponder, este valor se afectó por el factor de dilución.

### **2.3 – Tratamiento de parásitos con agentes oxidantes y reductores**

Para determinar si un estímulo oxidativo induce expresión de la TryS en la forma infectiva de *T. brucei*, parásitos de la línea celular control fueron expuestos a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno por diferentes tiempos.

Parásitos de la línea celular WT de *T. brucei* en crecimiento exponencial se centrifugaron a 2.000 g durante 10 minutos a 4 °C y diluyeron en medio de cultivo de forma tal de obtener  $5 \times 10^5$  parásitos/mL. Se distribuyó 1 mL de esta suspensión celular por pocillo en una placa de cultivo de 24 pocillos, adicionando luego  $H_2O_2$  a concentraciones finales de 1, 10 y 100  $\mu$ M. En los pocillos control se omitió el agregado de oxidante. A continuación, la placa se incubó durante 6 y 18hs, bajo las condiciones mencionadas en la sección 2.1. A dichos tiempos se efectuaron recuentos celulares (sección 2.2). El ensayo fue realizado por triplicado.

Para determinar si la forma infectiva de *T. brucei* depletada de la TbTryS es capaz de revertir su fenotipo por el agregado exógeno de tioles de bajo peso molecular, parásitos de la línea celular ARNi-TbTryS fueron inducidos con tetraciclina y crecidos en un medio de cultivo con GSH y  $T(SH)_2$ .

Para llevar a cabo los ensayos de complementación metabólica, la línea ARNi-TbTryS fue cultivada durante un total de 72hs en presencia de 1  $\mu$ g/mL de oxitetraciclina. Cada 24hs los cultivos fueron iniciados nuevamente a una densidad de  $1 \times 10^5$  parásitos/mL. En una placa de 24 pocillos se sembraron  $1 \times 10^5$  parásitos/mL por pocillo y se suplementó el cultivo con 1 mM de GSH o  $T(SH)_2$  según correspondiera. Se utilizaron como control la misma línea celular sin inducir e inducida pero sin tratar con los agentes reductores. La placa se incubó durante 24 hs en las condiciones descritas en la sección 2.1, realizándose un recuento al cabo de este tiempo. El experimento se llevó a cabo por duplicado.

### **2.4 – Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)**

Para la separación y visualización de proteínas en las diferentes muestras, se realizaron geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Se montaron los elementos para ensamblar el molde: los cristales con los espaciadores se fijaron con pinzas y se colocaron en el soporte de placas adecuado (Bio-Rad). A continuación, se vertió el gel separador con una concentración de acrilamida del 12% p/v, preparado como se detalla a continuación, hasta una altura de 2 cm por debajo del cristal pequeño, se alisó la superficie colocando isopropanol y se esperó a que polimerizara a temperatura ambiente. Luego, se retiró el exceso de isopropanol con papel secante y se agregó el gel concentrador al 5% p/v de acrilamida preparado como se detalla a continuación y por último se colocó el peine para formar los pocillos donde se sembró la muestra.

Para preparar 10 mL de gel separador se debieron agregar y mezclar: 3,4 mL de agua destilada, 4,0 mL de acrilamida/bis-acrilamida al 30% p/v degaseada, 2,5 mL buffer de separación (Tris-HCl 1,5M a pH 8,8) y 0,1 mL de SDS al 10% p/v.

Para preparar 10 mL de gel concentrador se debieron agregar y mezclar: 5,7 mL de agua destilada, 1,7 mL de acrilamida/bis-acrilamida al 30% p/v degaseada, 2,5 mL buffer de concentración (Tris-HCl 0,5M a pH 6,8) y 0,1 mL de SDS al 10% p/v.

Para comenzar la reacción de polimerización, se agregó a la mezcla 50  $\mu$ L de APS 10% p/v y 5  $\mu$ L o 10  $\mu$ L de TEMED para el caso del gel separador o concentrador respectivamente.

Un vez pronto el gel, se montó al electrodo y se colocó en la cámara de electroforesis (Bio-Rad) con buffer de corrida (Tris base 0,25 M, glicina 0,52 M y SDS 35 mM, pH 8,3). Se sacó el peine con cuidado y cargaron las muestras con una jeringa Hamilton. Asimismo se sembró en un carril un marcador de pesos moleculares sin teñir o preteñido, este último para el caso de geles para Western-blot (ambos de Fermentas, ver sección 2.5). Se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se aplicaron 40 mA de corriente continua hasta que el frente de azul de bromofenol llegó al final del gel (60-90 minutos). A continuación, se desmontó el gel, se separó de las placas y colocó a teñir en una solución con Coomassie blue R350 0,1% p/v, metanol 20% v/v y ácido acético 10% v/v durante 1-2hs. Para finalizar, el gel se destiñó durante 1-2hs en una solución de metanol 50% v/v en agua destilada con ácido acético 10% v/v.

## **2.5 – Ensayo de Western-Blot**

Los extractos proteicos separados por técnicas de SDS-PAGE (ver sección 2.4) se transfirieron a una membrana de PVDF (GE healthcare) previamente sumergida 30 segundos en etanol 95% v/v, 5 minutos en agua destilada y luego 10 minutos en buffer de transferencia según indicaciones del fabricante. Los papeles Whatman se sumergieron también en buffer de transferencia y luego se ensambló el cassette de transferencia junto con el gel y la membrana en un equipo de Mini Trans-Blot (Bio-Rad). La transferencia se realizó a 80V durante 2 horas, en baño de hielo. Terminada ésta, se lavó la membrana con buffer fosfato salino (PBS – NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM pH 7,4) en agitación orbital a 200 rpm durante 5 minutos. El bloqueo de la membrana se realizó en PBS 4% p/v de leche entera de vaca (PBS-L) durante toda la noche a 4 °C y en agitación (60 rpm). Se realizaron 2 lavados con PBS con 0,2% v/v Tween-20 (PBS-T) de 5 minutos cada uno y luego se incubó la membrana con una dilución 1/500 en PBS-L del anticuerpo primario anti- TbTryS y anti-TR de conejo durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación a 60 rpm. Terminada la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-L conteniendo Tween-20 0,2% v/v (PBS-L-T). Se incubó la membrana durante 45 minutos a temperatura ambiente con una dilución 1/2000 en PBS-L-T del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (Invitrogen). Finalmente se lavó la membrana 5 veces con PBS-T. La detección de la peroxidasa se

desarrolló por quimioluminiscencia con el kit quimioluminiscente SuperSignal West Pico siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). Las láminas radiográficas Amershan Hyperfilm ECL (GE Healthcare) se revelaron manualmente utilizando solución química reveladora y fijadora (GBX developer and fixer - Kodak).

## **2.6 – Cuantificación de bandas por densitometría**

Se evaluó la expresión de TryS y TR mediante cuantificación de las bandas obtenidas en el Western-Blot usando el programa Image j®.

Para ello, se realizó una curva de calibración por Western-Blot (ver sección 2.5) sembrando cantidades conocidas de la proteína recombinante TryS de *T.brucei* (rango entre 5-200 ng). Las láminas radiográficas fueron fotografiadas con un scanner SNAPSCAN 1236 (AGFA). A partir de estas imágenes y haciendo uso del programa Image J® 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 TR se siguió el mismo procedimiento ya mencionado, comparando las intensidades de banda obtenidas contra la curva de calibración.

## **2.7 – Ensayo de inmunofluorescencia indirecta**

Para llevar a cabo la detección de la localización subcelular de la TryS en la forma infectiva de *T. brucei*, se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Previamente se procedió a la tinción de la mitocondria del parásito como se describe a continuación. Se centrifugaron 10 ml de cultivo de parásitos conteniendo aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/mL a 2.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los parásitos se resuspendieron en 10 ml de medio HMI-9 agregando 250  $\eta$ M del reactivo Mitotracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos (Invitrogen) y se incubaron 25 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la acumulación del colorante en el organelo y su conversión (mediada por oxidación) a una especie fluorescente. Luego las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación (2.000 x g, 10 minutos) y se lavaron con 10 ml de PBS. Se repitió la centrifugación y el pellet fue resuspendido de manera homogénea en p-formaldehído 4% v/v en PBS (50  $\mu$ L cada  $10^6$  parásitos) incubando 18 minutos a temperatura ambiente para permitir el proceso de fijación de las estructuras celulares. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS intercalados con centrifugaciones. Finalmente, los parásitos se resuspendieron en PBS de forma tal de obtener  $2 \times 10^6$  células/50  $\mu$ l (una gota). Las gotas se colocaron en las láminas correspondientes y se incubaron durante toda la noche a 4 °C para facilitar la adhesión de las células al portaobjetos.

Paso seguido, se permeabilizaron las membranas de los parásitos mediante el agregado de 200  $\mu$ 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 bloquearon 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 y anti-TR. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS e inmediatamente se incubaron durante 45 minutos en oscuridad con 200 µL de una dilución 1/1000 en PBS-G del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Invitrogen) conjugado al fluoróforo Alexa 488. Se lavaron 5 veces las láminas con PBS y a continuación se incubaron durante 15 minutos en oscuridad con 200 µL de una dilución 1/500 del reactivo TO-PRO 3 (Invitrogen) para teñir ácidos nucleicos. Finalmente, las láminas se lavaron con PBS, se secaron sobre mesada y el cubre objetos se montó con glicerol 90% v/v en PBS.

## **2.8 – Preparación de imágenes de microscopía de láser confocal**

La visualización de los preparados se llevó a cabo en un microscopio láser confocal espectral invertido Leica DM6000 TCS SP5 con lente objetivo de inmersión en aceite 63x (HCXPL APO NA 1.4) equipado con el software LASAF v2.0 (Servicio de Microscopía, Unidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo). Se emplearon longitudes de excitación de 579, 495 y 671 nm para la detección de la señal del Mitotracker, 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.

## **2.9 – Métodos de biología molecular**

### **2.9.1 – PCR para la amplificación de secuencias de la TryS**

Para la amplificación de secuencias de la TbTryS se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se colocó en un tubo de PCR entre 0,1-250 ng del templado conteniendo la secuencia a amplificar junto con el buffer de reacción aportado por el fabricante (conteniendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) a una concentración final de 200 µM cada uno, *primers* adecuados a una concentración final entre 0,1-0,6 µM (ver tabla 2) y la enzima polimerasa con una actividad final de 1,25 U para el caso de la polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) o 2,5 U para la de *Pyrococcus woesei* (Pwo). La reacción se llevó a un volumen final con agua destilada.

El programa de PCR que se utilizó para la amplificación constó de un paso inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, unión de los *primers* al templado a 55°C por 1 minuto, y extensión de la reacción de polimerización a 72°C por un tiempo variable entre 60 a 150 segundos (dependiendo del largo de fragmento) y finalmente

un último paso a 72°C por 5 minutos para asegurarse que la extensión fuese completa para todos los fragmentos.

**Tabla 2. Secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de secuencias de TbTryS** (ver Fig. 25 del Anexo), donde se subraya en negro, en los casos que corresponde, los sitios de restricción introducidos. Todos los oligonucleótidos se encontraban a una concentración de 100 pmol/μL. En rojo se muestra la mutación silenciosa que se introduce a través del *primer* para mutar el sitio HindIII interno de la TbTrys.

Nombres	Secuencias
Fo TbbTs BamHI	5'- GCG <u>CGG ATC CAT</u> GAC GAA GTC GGC ACT T-3'
Re TbbTs BamHI	5'- CGC <u>GGG ATC CCT</u> ACA TTT GAA TAC GTA CGG-3'
P2T7 - if	5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3'
Re 4 TbbTs	5' – AG TCC AGC CAC TCA GTC TTT - 3'
Re 5 TbbTs	5' – CTT TAA CGC ACG GGA CGG GGG TTG GAG TGC – 3'
Fo1 TbbTs	3' – ATG ACG AAG TCG GCA CTT GCA GAC ACT AAA – 3'
Fo TbTryS HindIII-del2	5'- GGT GTA CGT GAG GAC AAA AA <sup>A</sup> CTT ACC ACT GGG CTC GAA TCT CCG-3'
Fo TbTryS HindIII	5'- TTA <u>AAG CTT</u> ATG ACG AAG TCG GCA CTT GC-3'

Para preparar una muestra de colonias bacterianas para realizar el *screening* por PCR, se debió picar una colonia y resuspenderla en 50 μL de agua estéril. A continuación se incubó dicha muestra a 95°C por 10 minutos para lisar las células, liberar el ADN e inactivar endonucleasas endógenas. Se centrifugó a 28.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó como templado para la PCR siguiendo el protocolo recién mencionado.

### 2.9.2 – Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon soluciones de agarosa 0,8-1,5% p/v en buffer TBE 0,5x (40 mM Tris base, 45 mM ácido bórico y 4 mL EDTA 0,5 M). Para disolver esta solución se calentó en horno microondas hasta que lograra fundirse. A continuación, se volcó la solución en el molde con el peine colocado, eliminando toda burbuja presente, y se esperó hasta que el gel solidifique completamente. Se colocó el gel en la cuba de electroforesis (Biorad), previamente cargada con suficiente cantidad de TAE 0,5x para cubrir todo el gel, y se retiró el peine. Se sembraron las muestras previamente preparadas como se detalla a continuación y se aplicó una

diferencia de potencial de 100 V durante la corrida que duró entre 30-90 minutos, dependiendo el caso.

Las muestras se prepararon con buffer de carga 1x con azul de bromofenol (New England Biolabs). Como referencia, se utilizó un marcador de tamaños moleculares en un rango entre 0,5-10 Kpb o 0,1-1,5 Kpb (1kb ladder y 100 bp ladder, respectivamente - New England Biolabs).

Una vez terminada la corrida, se colocó el gel en una solución TBE 0,5x con unas gotas de bromuro de etidio (stock 0,7 mg/mL - Eurobio) durante 30-40 minutos para teñirlo y luego se visualizaron las bandas en un transiluminador UV G-box (Syngene).

### **2.9.3 – Tratamiento con endonucleasas y ligación**

Para la digestión de ADN con las enzimas de restricción, se colocó en un tubo eppendorf entre 0,2-2 µg de ADN a digerir, la/s enzima/s de restricción correspondiente/s (10 unidades) y el buffer de restricción adecuado según indicaciones del fabricante, llevándose a volumen con agua destilada. La reacción se incubó a 37°C durante 5-16 hs según el caso.

Para la ligación de fragmentos de ADN a plásmidos, se colocaron en un tubo eppendorf las muestras de inserto y vector en una relación 4:1 según la fórmula que se detalla a continuación, T4 ligasa de ADN (10 unidades), el buffer correspondiente, llevándose a volumen con agua destilada. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 16 hs. Para finalizar, previo a la transformación, se incubó la reacción a 65°C durante 5 minutos para inactivar a la enzima y detener la reacción.

La fórmula que se utilizó para calcular la masa de ADN a colocar en las reacciones de ligación fue la siguiente:  $m_{\text{inserto}} \text{ (ng)} = [m_{\text{vector}} \text{ (ng)} \times \text{pares bases}_{\text{inserto}} \text{ (kb)} / \text{pares bases}_{\text{vector}} \text{ (kb)}] \times 4$

### **2.9.4 – Preparación de bacterias quimio y electro-competentes**

Para la preparación de células *Escherichia coli* Tuner (DE3) quimiocompetentes se realizó un pre-cultivo de 5 mL en medio LB el cual se extendió durante toda la noche a 37 °C y 220 rpm. El medio LB (Luria-Bertani) se compone de 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona y 10 g de NaCl por litro de medio a un pH final de 7.4. A continuación se realizó el escalado 1/50 del cultivo y se lo dejó llegar hasta una D.O.<sub>600nm</sub> = 0,4 UA. El cultivo se incubó 20 minutos en hielo y luego se centrifugó 10 minutos a 3.000 xg a 4 °C. Las células se resuspendieron en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril y frío, con especial cuidado de no pipetearlas ni agitarlas mecánicamente para evitar la lisis, y se las incubó 30 minutos en hielo. A continuación se volvieron a centrifugar las células a 3.000 xg por 10 minutos a 4 °C y se las resuspendió en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M.

Para la preparación de células *E. coli* electrocompetentes se realizó un pre-cultivo de 5 mL en medio LB durante toda la noche a 37 °C y 220 rpm. Luego se realizó el escalado 1/50 del cultivo y se lo dejó llegar hasta una D.O.<sub>600nm</sub> = 0,6 UA. A continuación, se centrifugaron dos

veces por 10 minutos a 1.500 x g a 4°C lavando con 500 y 250 mL de agua destilada respectivamente. Las células se resuspendieron en 1,5 mL de glicerol 10% v/v.

Las células *E. coli* quimiocompetentes DH5α y One Shot TOP10 utilizadas provinieron de un kit comercial (Invitrogen)

### **2.9.5 – Transformación de bacterias competentes**

Para la transformación de *E. coli* Tuner (DE3) quimiocompetentes, se tomó una alícuota de 250 µl de las células y se les agregó entre 1-5 µl del plásmido. Para la transformación se las incubó por 30 minutos en hielo y luego se realizó un shock térmico a 42°C durante 2 minutos para lograr la incorporación del plásmido. Inmediatamente se colocaron las células en hielo y se les agregó 750 µl de medio LB. La suspensión se incubó 1 hora a 37 °C a 220 rpm. Para finalizar, las células se centrifugaron y se plaqueó el pellet resuspendido en el medio remanente sobre placas de LB agar ampicilina (100 µg de ampicilina/ml de medio) incubándolas toda la noche a 37°C.

Para la transformación de *E. coli* DH5α y One Shot TOP10 quimiocompetentes, se siguió el protocolo del fabricante. Se tomaron alícuotas de 50 µl de las células y se les agregó entre 1-5 µl del plásmido. El procedimiento continuó como fue mencionado anteriormente, con algunas modificaciones: se realizó el shock térmico a 42°C por 30 segundos y se agregaron 950 µl de medio LB para la resuspensión celular.

Para la transformación de células *E. coli* electrocompetentes se tomó una alícuota de 50 µl de las células y se les agregó entre 1-5 µl del plásmido. Para la transformación, se traspasaron las células a una cubeta de electroporación con un paso de 0,1 cm y se las transformó con un electroporador BTX ECM830 *Electro Square Porator*, utilizando el modo de alto voltaje con los siguientes parámetros: 10 pulsos durante 99 µs a 2,0 KV. A continuación se les agregó 1 mL de LB y se continuó como ya fue descrito anteriormente.

### **2.9.6 – Purificación de ADN**

Para la purificación de ADN a partir de reacciones enzimáticas, se utilizó el kit de Invitrogen *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit*, siguiendo el protocolo aportado por el fabricante.

Para la purificación de ADN a partir de fragmentos de geles de agarosa, se utilizó el kit de Qiagen *QIAquick Gel Extraction Kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.10 – Expresión y purificación de proteínas recombinantes

### 2.10.1 – Mutante C59A de la TryS de *C. fasciculata*

Para la expresión de la forma recombinante del mutante C59A de la TryS de *C. fasciculata* se emplearon bacterias *E. coli* de la cepa Tuner DE3 (Novagen) transformadas con el plásmido pET19b- CfTryS C59A (34) en los días previos al inicio del cultivo para producción de proteína. El protocolo de expresión y purificación es similar al descrito por Comini y col. (34) con algunas modificaciones.

El precultivo de la cepa transformante se realizó a partir del inóculo de una colonia de placa en 10 mL de medio TB ampicilina (100 µg de ampicilina/mL de medio) que se incubó a 37°C, 220 rpm, durante 16-18hs aproximadamente. El medio TB (Terrific-Broth) se compone de 24 g de extracto de levadura, 12 g de triptona, 9,4 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 4 mL de glicerol por litro de medio a pH final de 7,4. Luego, se inocularon 5 mL del precultivo en un frasco Erlenmeyer de 2L conteniendo 500 mL de medio TB suplementado con 25 mL de glucosa 20% p/v (1% p/v final) y ampicilina 100 µg/mL final, el cual se incubó a 37°C, 220 rpm, hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de aproximadamente 1,4 UA. Posteriormente, el cultivo se enfrió a 4 °C sin agitación por 30 minutos y luego se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 250 µM y retomando la incubación a 25 °C, 120 rpm, durante 16-18hs aproximadamente.

A continuación, se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 3.000 x g 4°C durante 10 minutos en centrífuga Sorvall RC 6 plus (Thermo electron corporation). El *pellet* se resuspendió completamente en buffer A (composición NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM pH= 8,0) en una relación 10 mL de buffer de A/ g de pellet. Para iniciar la lisis celular e inhibir la actividad de serin-proteasas, se agregaron lisozima (concentración final de 3,1 mg/mL) y fenil metil sulfonil fluoruro concentración final de 1 mM, respectivamente. 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- 2 min, impulso *on* -30 seg, impulso *off* – 60 seg, amplitud 40%. A continuación se realizaron dos centrifugaciones a 34.000 x g durante 30 minutos a 4 °C en centrífuga Sorvall RC 6 plus para separar los restos celulares del sobrenadante. Previo al pasaje por la columna de afinidad, el extracto líquido se filtró utilizando filtros de 0,8 µm para eliminar partículas insolubles.

La purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) empleando una columna de 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 buffer A y luego se aplicó el extracto soluble filtrado a la columna a un flujo de 1 mL/minuto. A continuación se realizaron 2 lavados sucesivos, el primero con 10 volúmenes de buffer A y el segundo con 5% v/v de buffer B (imidazol 500 mM en buffer A pH 8,0) en buffer A. La elución de la proteína

se realizó en modo isocrático con 15 mL de buffer B recolectando fracciones de 1 mL. Tanto los lavados como la elución se realizaron manteniendo 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 12% descrito en punto 2.4. Asimismo, la concentración proteica de las fracciones se determinó mediante ensayo del ácido bicinonínico (BCA) descrito en punto 2.13.1. También se evaluó la actividad enzimática de TryS en las fracciones obtenidas de acuerdo al método descrito en el punto 2.12.1.

Aquellas fracciones que mostraron un nivel de pureza (homogeneidad de la muestra mayor a 90%) y actividad enzimática específica (mayor a 0,45 U/mg) aceptables, se juntaron y concentraron por filtración en un filtro Amicon con un corte de 30 KDa (Millipore) centrifugando a 4.000 x g y 4°C hasta obtener la concentración de proteína adecuada.

### **2.10.2 – TryS de *T. brucei***

Para la expresión y purificación de la TbTs se siguió el protocolo descrito anteriormente para el mutante C59A de la CfTryS, con la única modificación que el cultivo se dejó crecer hasta una D.O.<sub>600nm</sub> = 0,6 UA antes de la inducción.

Para la obtención de proteína recombinante con un grado de pureza mayor al 90% se realizó una cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular posterior a la IMAC. Para ello se empleó una columna Sephadex G-200 16/60 (GE healthcare – rango de separación entre 10-600 KDa) conectada a un equipo AKTA (Amersham –Pharmacia) la cual se equilibró con 5 volúmenes de buffer PBS a un flujo de 1 mL/min. A continuación se inyectaron 500 µL de la muestra con especial cuidado que no contuviera burbujas de aire, y luego se procedió a eluir en PBS, colectando automáticamente fracciones de 1 mL. El patrón de elución se siguió mediante medición en línea de absorbancia a 280 nm.

### **2.11 – Determinación de masa molecular por cromatografía de filtración en gel**

Para la calibración de la columna se utilizó un estándar de proteínas de pesos moleculares (PM) conocidos como se detalla en la Tabla 3. La columna Sephadex G-200 16/60 se equilibró con buffer NaPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0,5 M y luego se inyectó 1 mL de dicha muestra, procediendo a su elución a un flujo constante de 1,2 mL/min. Con los datos obtenidos, se graficó el log PM en función de  $V_{\text{elución}}/V_{\text{muerto}}$

**Tabla 3. Composición de la muestra de estándares para la calibración de la columna Sephadex G-200 16/60**

PROTEINAS	PM (KDa)	[ ] en la muestra (mg/mL)
Blue Dextran	2000	0,1
Tiroglobulina	669	0,5
Apoferritina	443	1
$\beta$ -amilasa	200	1
Alcohol deshidrogenasa	150	2
BSA	66	1
Lisozima	13	2

## 2.12 - Ensayos enzimáticos

### 2.12.1 – Determinación de actividad sintetasa de la TryS

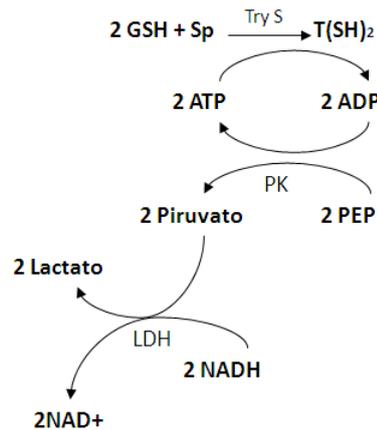
La actividad sintetasa de la TryS de diferentes especies se determinó espectrofotométricamente empleando un ensayo enzimático acoplado (ver Fig. 11), donde el consumo de ATP (o producción de ADP) por la TryS es directamente proporcional y equimolar a la oxidación de NADH por la lactato deshidrogenasa (LDH).

En este ensayo, la piruvato quinasa conecta ambas reacciones al regenerar ATP a partir de ADP y fosfoenol piruvato, y producir piruvato, que es convertido (reducido) en lactato por la LDH a expensas de NADH.

Los ensayos fueron realizados en un volumen final de reacción de 120-135  $\mu$ L empleando una cubeta de cuarzo QS 10.00 mm con un espectrofotómetro Varian Cary 50 Uv-Vis *Spectrophotometer*. La mezcla de reacción contiene: DTT 0,8 mM, GSH 0,8 mM, PEP 3,6 mM, ATP 3,1 mM, LDH 1,6 U y PK 1,6 U en buffer HEPES 100 mM con EDTA 0,5 mM y  $MgSO_4$  10 mM.

Para testear que el sistema enzimático acoplado esté funcionando correctamente, se llevó a cabo un ensayo control agregando a la mezcla de reacción NADH y luego ADP a concentraciones finales de aproximadamente 250  $\mu$ M y 3,1 mM respectivamente.

Para ensayar la actividad enzimática de las muestras en estudio se agregaron a la mezcla de reacción entre 5-15  $\mu$ L de las mismas y NADH en una concentración final de 240-270  $\mu$ M y se procedió a incubar a temperatura ambiente hasta obtener una línea de base estable a 340 nm. Finalmente, la reacción se inició con el agregado de espermidina a una concentración final de 9,3-10,5 mM.



**Figura 11. Esquema de las reacciones acopladas que tienen lugar durante el ensayo de actividad enzimática.** Al agregar las enzimas PK y LDH a la mezcla del ensayo, se hace posible seguir el consumo de NADH mediante variación de la absorbancia a 340 nm.

### 2.12.2 – Ensayo de punto final de la lactato deshidrogenasa

Para determinar la producción de tripanotión durante la reacción de síntesis bioquímica (ver punto 2.14) se empleó el ensayo de la LDH, donde el tripanotión producido es directamente proporcional en una relación 1:2 a la oxidación de NADH por la lactato deshidrogenasa.

El ensayo se inicia con el agregado de 10  $\mu\text{L}$  de la muestra en estudio en un volumen final de reacción de 120-135  $\mu\text{L}$  con LDH 1,6 U y NADH 240-270  $\mu\text{M}$  en buffer HEPES ya descrito. La oxidación de NADH se monitoreó a 340 nm en espectrofotómetro Varian Cary 50 Uv-Vis *Spectrophotometer* hasta que se logró alcanzar una línea de base estable.

## 2.13 – Determinación de concentraciones

### 2.13.1 – Proteínas

El ácido bicinconínico es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^+$  en medio alcalino capaz de absorber a 562 nm. Este reactivo forma la base de un método capaz de cuantificar el ión cuproso producido en una reacción entre los grupos NH de los enlaces peptídicos de las proteínas con el ion  $\text{Cu}^{2+}$ , en una estequiometría 4:1 (reacción de Biuret). La intensidad de coloración será por lo tanto, directamente proporcional a la cantidad de proteína en la muestra (35).

Para la determinación de la concentración proteica de una muestra, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la misma por pocillo en microplacas de 96 pocillos, a los que se les agregó 200  $\mu\text{L}$  de una mezcla de  $\text{CuSO}_4$ :BCA en una relación 1:51 y se lo dejó incubando 1 hora a 37°C para que la reacción

desarrollara color. Para la curva de calibración se utilizaron diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) en un rango de 0,1- 1 mg/mL. Luego, se leyó la absorbancia a 562 nm en un lector de placas Multiskan Ex (Thermo Scientific).

Para calcular la concentración proteica se graficaron los datos de la curva de calibración (absorbancia en función de la concentración). A partir de la misma se calculó la ecuación de la recta y se determinaron los valores de concentración de proteína en las muestras.

### **2.13.2 – Ácido nucleico**

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta dado que contienen bases aromáticas nitrogenadas. El máximo de absorción se da a una longitud de onda de 260 nm, siendo aquí la absorción proporcional a la concentración (ley de Lambert-Beer).

La determinación de las concentraciones de ADN de las muestras se realizó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop1000 (Thermo Scientific), que permite analizar volúmenes muy pequeños de muestras (1  $\mu$ L)

### **2.13.3 – Tioles**

La cuantificación de tioles en las muestras se realizó a través de la reacción de Ellman. El reactivo de Ellman [5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) – DTNB] es un aril disulfuro que rápidamente sufre una reacción de intercambio tiol-disulfuro en presencia de tioles libres. El dianion TNB presenta una intensa absorbancia a 412 nm en comparación con ambos disulfuros, el del DTNB y el disulfuro mixto TNB-tiol de la muestra. Dado que la estequiometría de los tioles libres con el TNB es 1:1, la formación de éste puede ser utilizada para calcular el número de tioles presentes en una muestra (36).

Para determinar la concentración de tioles en una muestra, esta se incubó con 1mM de DTNB durante 5-10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se midió la  $Abs_{412nm}$ .

La concentración de tioles totales en la muestra se calcula haciendo uso de la ley de Lambert-Beer ( $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ ) con un coeficiente de extinción molar para el TNB  $14,15 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y en caso de corresponder, este valor se afectó por el factor de dilución.

## **2.14 – Síntesis bioquímica y purificación de tripanotión**

Para la síntesis de tripanotión se siguió el protocolo previamente descrito en Comini y col. (34) con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

En primer lugar se procede a cambiar el buffer de solución donde se encuentra la proteína recombinante CfTryS C59A obtenida como se describió en el punto 2.10.1. Para ello se utilizó una columna de Sephadex G-25 (GE healthcare). La columna se lavó con 4 volúmenes de agua destilada y luego se equilibró con 4 volúmenes de buffer HEPES. A continuación se

sembraron 2,5 mL de la muestra, eluyéndola posteriormente con 3,5 ml de buffer HEPES. La muestra obtenida a partir de la columna se concentró por centrifugación en un filtro Amicon con un corte de 30 kDa.

Para la reacción de síntesis, se colocó el volumen total de muestra que contiene la CfTryS C59A la cual presentaba una actividad específica de 0,46 U/mg, los sustratos de la reacción de acuerdo a las cantidades presentadas en la tabla 3, llevando luego hasta un volumen final de 10 mL con buffer HEPES. La reacción se incubó a temperatura ambiente y a distintos intervalos de tiempo se analizaron pequeñas alícuotas para determinar el grado de avance de la reacción mediante el ensayo de la LDH (ver punto 2.12.2). Cuando se comprueba que la reacción alcanza un 100%, la muestra se almacena a 4°C para su posterior procesamiento.

Previo al paso de purificación del tripanotión, se procedió a la separación y concentración de los compuestos de bajo peso molecular de la reacción de síntesis de tripanotión mediante centrifugación en Amicon con un corte de 15 KDa.

**Tabla 4. Concentraciones finales de los diferentes compuestos necesarios para la reacción de síntesis de tripanotión.**

	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>final</sub>
<b>GSH</b>	0,4 M	12 mM
<b>Sp</b>	180 mM	5 mM
<b>ATP</b>	90 mM	1 mM
<b>PEP</b>	36 mM	10 mM
<b>DTT</b>	1 M	20 mM
<b>PK</b>	200 U/ml	1,13 U

La purificación del tripanotión se realizó por columna de Sephadex Sp de 7,5 ml a un flujo de 1,5 mL/min mantenido por bomba peristáltica. El filtrado (9 mL) de la reacción a través de filtro Amicon se diluyó con el agregado de 35 mL de agua destilada y se sembró en la columna. La columna se lavó con 4 volúmenes de agua destilada, recolectándose fracciones (5) para su posterior análisis. La elución de la muestra se realizó con 2 volúmenes de acetato de amonio 100 mM pH 6,8, recolectándose fracciones (10) de 1,5 mL

La cuantificación de tripanotión se realizó de manera indirecta mediante la determinación de tioles libres por la reacción de Ellman (ver sección 2.13.3).

Las fracciones conteniendo tripanotión se juntaron y el lote se concentró en rotavapor hasta llegar a una concentración final de 30 mM de tripanotión. Para finalizar, se confirmó la presencia de tripanotión en la muestra por espectrometría de masa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Ionization Time-Of-Flight*) en un equipo Applied Biosystems 4800 Analyzer (Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica, Institut Pasteur de Montevideo) utilizando como matriz CHCA 60%ACN/0,1%TFA.

La muestra concentrada se filtró en esterilidad con filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) para poder ser empleada luego en ensayos de complementación metabólica en cultivo de parásitos (sección 2.3)

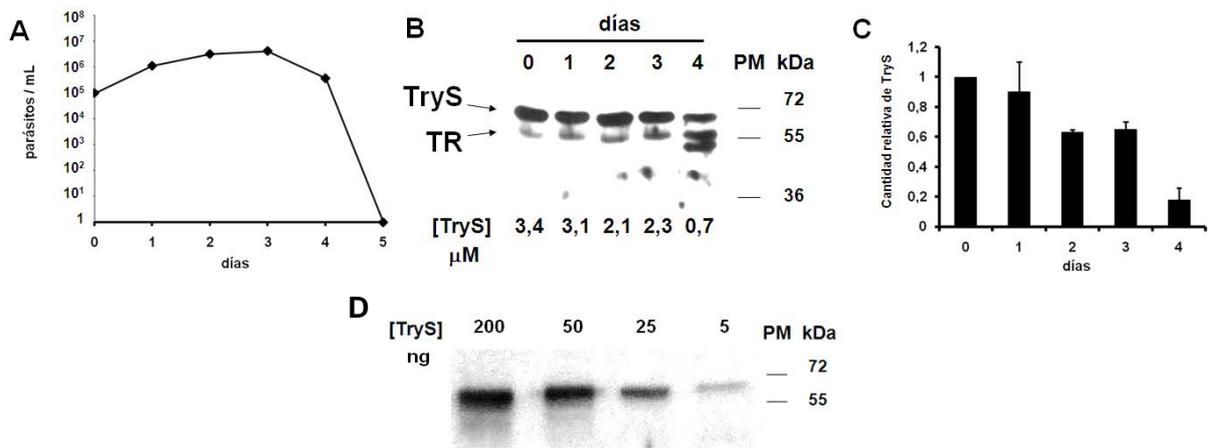
## Resultados

### 1 –Análisis cuantitativo de la expresión de la TryS en la forma sanguínea de *T. brucei* y determinación de su concentración intracelular

Para determinar la curva de crecimiento de la forma sanguínea de *T. brucei* línea celular control, los parásitos se cultivaron en modo continuo bajo las condiciones ya mencionadas (sección 2.1) partiendo de una densidad celular de  $1 \times 10^5$  parásitos/mL y efectuando recuentos cada 24hs. El análisis de la curva de crecimiento muestra un patrón de crecimiento típico (Fig. 12 A). En los primeros dos días, se observa un crecimiento exponencial con un tiempo de duplicación estimado en 3 horas. Entre los días 2 y 3, se produce un enlentecimiento en el crecimiento del cultivo, correspondiendo con la fase estacionaria, en donde la proliferación de los parásitos se iguala con la tasa de muerte de los mismos por lo tanto el coeficiente neto de crecimiento es cercano a cero. Esto es debido a que en este período se agotan nutrientes esenciales, se acumulan sustancias de desecho y el pH del medio se acidifica volviéndose inadecuado para la multiplicación de las células. La última etapa de la curva de crecimiento se observa a partir del día 3 hasta el 5, correspondiente a la fase de muerte celular, en donde la densidad celular del cultivo descendió abruptamente de  $1 \times 10^6$  células/mL a prácticamente cero.

Para la evaluación de la expresión de la TryS durante la curva de crecimiento de *T. brucei* se realizó un Western-Blot sembrando un extracto correspondiente a  $6.10^6$  parásitos por cada carril utilizando anticuerpos anti-TryS y empleando la señal de la tripanotión reductasa (TR) como control de carga como ya fue descrito (sección 2.5) (ver Fig. 12 B). Para la cuantificación de los niveles de TryS intracelulares, se realizó en primera instancia una curva de calibración utilizando cantidades conocidas de la proteína recombinante TryS (ver Fig. 12 C). A partir de la misma y mediante análisis de densitometría se obtuvieron los ng TryS/célula para cada día de la curva de crecimiento que fueron luego convertidos a concentración molar de enzima teniendo en cuenta el peso molecular de la proteína (71.400 Da) y el volumen celular correspondiente a un parásito (56 fL) (37,38).

Durante el período de cultivo se detectó expresión tanto de TryS como de TR. Los resultados muestran que tanto TryS como TR son proteínas que se expresan en las distintas fases de la curva de crecimiento del parásito. Asumiendo que los extractos celulares fueron preparados a partir del mismo número de parásitos se observa que la intensidad de las bandas para la TR permaneció relativamente uniforme a lo largo de los 5 días, implicando que sus niveles de expresión permanecen constantes a lo largo de las distintas etapas de la curva de crecimiento. En el caso de la TryS, y sin tener en cuenta la normalización con los niveles de TR, recién a partir del día 3 se percibe una disminución en el contenido de esta proteína Fig. 12 B). Cuando los niveles de TryS se relativizaron a los de TR (Fig. 12 D), se observa que el



**Figura 12. Evaluación de la expresión de la tripanotión sintetasa de *T. brucei* (TbTryS) durante la curva de crecimiento de la forma sanguínea de la línea celular WT (A)** Curva de crecimiento representativa de tres ensayos iniciada a partir de un inóculo de  $1 \times 10^5$  parásitos/mL; **(B)** Western-Blot a partir de extractos de  $6 \times 10^6$  parásitos/carril utilizando anticuerpos policlonales anti-TryS y anti-tripantotión reductasa (TR). Las concentraciones intracelulares de TryS fueron estimadas empleando distintas concentraciones de la forma recombinante de la proteína como estándar **(C)** y considerando un volumen celular de 56 fL ( $n=2 \pm$  desviación estándar); **(D)** Nivel de TryS normalizado al contenido de TR.

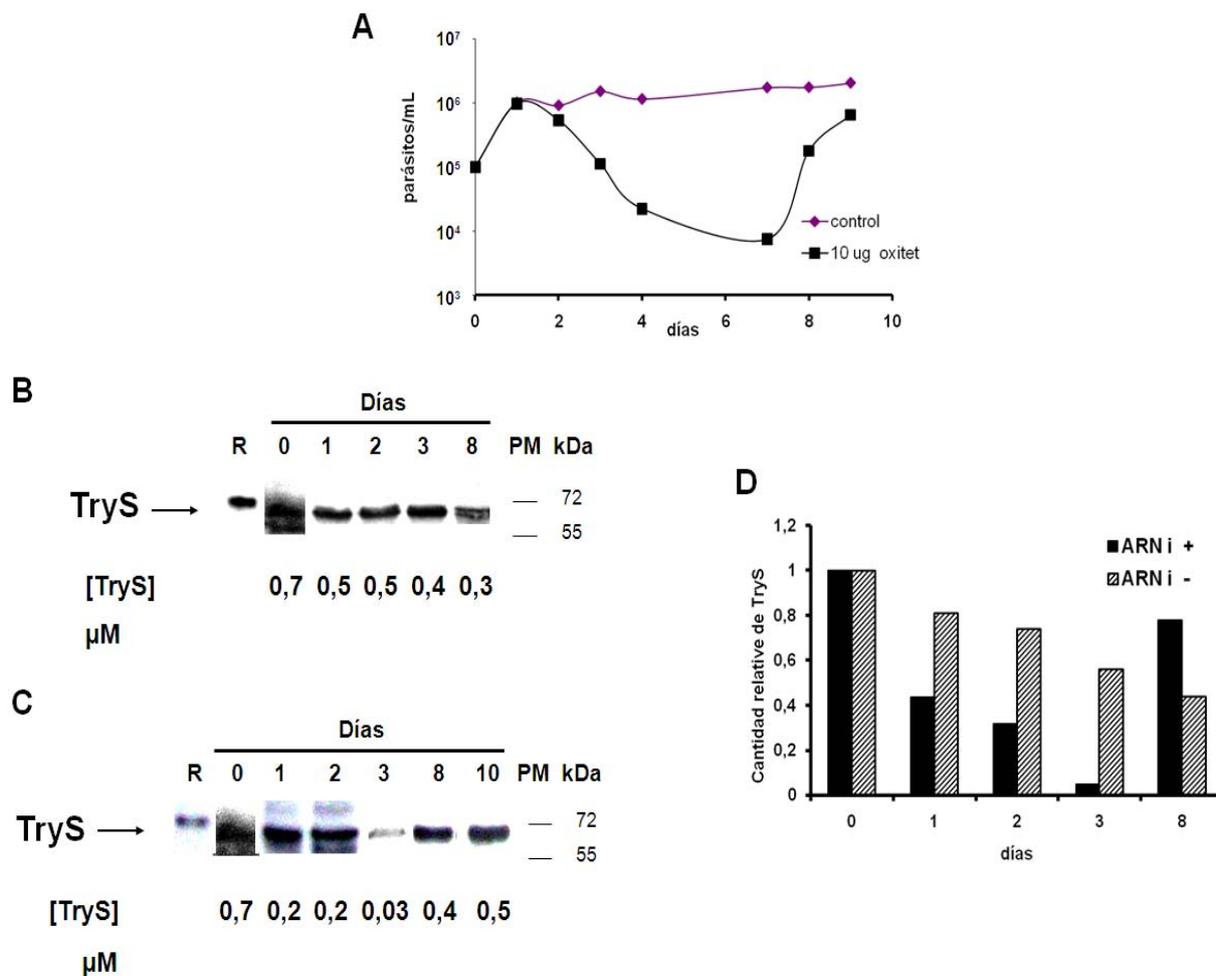
contenido de la primera disminuye cerca de un 40% coincidiendo con el ingreso del cultivo en la fase estacionaria de crecimiento (días 2 y 3; Fig. 12 A). Dicha disminución en los niveles de TryS es aún más marcada en parásitos que se encuentran en la etapa de muerte celular (día 4; Fig. 12 A), con valores 5 veces inferiores a los hallados en la fase de crecimiento exponencial (día 1).

Por otro lado, del análisis de los valores obtenidos, se observa que la TryS es una proteína abundante en la forma infectiva del parásito, del orden  $\mu\text{M}$ , comparada con otras (por ejemplo TXN, ver introducción). Durante la fase de crecimiento exponencial, la concentración de la TryS se encuentra entre 3,1-3,4  $\mu\text{M}$ . En la fase logarítmica tardía y estacionaria (días 2 y 3) se detecta una disminución en los niveles de TryS (2,1-2,3  $\mu\text{M}$ ) los cuales descienden hasta 0,7  $\mu\text{M}$  en la fase de muerte celular. De estos resultados se repara que, el descenso en los niveles de TryS se asocia a una disminución en la tasa de proliferación y a la pérdida de viabilidad celular.

## 2 - Silenciamiento de la TryS mediante ARNi en la forma sanguínea de *T. brucei*. Evaluación cuantitativa.

Para determinar el crecimiento de la forma sanguínea de *T. brucei* línea TbTryS-ARNi, los parásitos se cultivaron bajo las condiciones ya mencionadas (sección 2.1) partiendo de una densidad celular de  $1 \times 10^5$  parásitos/mL inducidos con  $10 \mu\text{g/mL}$  de oxitetraciclina. Como control se utilizó la misma línea, cultivada en ausencia de oxitetraciclina (control no inducido). Cada 24hs se realizaron recuentos celulares para estimar la densidad celular de los cultivos y se diluyeron en medio fresco (con y sin oxitet) hasta obtener una densidad de  $1 \times 10^5$  parásitos/mL. La figura 13 A muestra la densidad celular inicial y la alcanzada en cada ciclo de 24hs. Se observa como la línea TbTryS-ARNi sin oxitetraciclina mantuvo una velocidad de duplicación casi constante durante los días en que se desarrolló el experimento. Sin embargo, para la línea TbTryS-ARNi inducida se observa una disminución en la tasa de proliferación a partir del día 2 respecto al control. Al tercer día el crecimiento se detiene y da comienzo a una etapa de marcada muerte celular que se extiende hasta el día 7. A partir del día 7 se observa una recuperación del cultivo retornando la densidad celular a valores normales, lo cual podría estar asociado al escape de la inducción del silenciamiento de la TbTryS (ver más adelante).

Para la evaluación de la expresión de la TbTryS en la línea TbTryS-ARNi se realizó un Western-blot procediendo como ya fue mencionado (sección 2.5). En el Western-blot de la línea sin inducir (ver Fig. 16 B), se observan niveles relativamente constantes de la TryS, ya que las intensidades de las bandas observadas durante los diferentes días son muy similares. Las pequeñas fluctuaciones en los niveles de la proteína (entre 0,4-1 en cantidades normalizadas a la TR y comparadas contra  $t=0$  – ver Fig. 13 D) podrían estar debiéndose al error propio de la técnica de recuento celular. Sin embargo, para la línea inducida, como era de esperarse, los niveles de TryS disminuyen considerablemente (ver Fig. 13 C). A partir del día 1 ya se observa una disminución del 60% en la intensidad de la banda, pasando de 1 a 0,4 en cantidades relativas. El mayor descenso en los niveles de TryS ocurre el día 3, con un valor estimado de 5% respecto al inicial. Estos resultados confirman el correcto funcionamiento del silenciamiento de la expresión de la TbTryS, ya que sus niveles disminuyen de manera progresiva y considerable respecto al control sin inducir. Luego del día 8 se observa un aumento en la expresión de la proteína, retornando a valores normales a partir del día 10, lo cual señala un escape del fenómeno de silenciamiento, que viene asociado con la recuperación del cultivo, como ya fue mencionado. En este sentido se puede concluir que la expresión de TryS, y por lo tanto la producción de  $T(\text{SH})_2$ , es indispensable para mantener la proliferación y viabilidad de los parásitos en cultivo.



**Figura 13. Evaluación de la expresión de la tripanotión sintetasa (TbTryS) en la forma sanguínea de *T. brucei* al inducir el ARNi de la enzima con oxitetraciclina. (A)** Fenotipo de crecimiento de la cepa interferente (densidad celular inicial de  $1 \times 10^5$  parásitos/mL) inducida con  $10 \mu\text{g/mL}$  de oxitetraciclina (negro) y sin inducir (control- violeta). Cada 24hs aproximadamente se realizó recuento celular y los cultivos con densidad mayor a  $1 \times 10^5$  parásitos/mL fueron llevados nuevamente a  $1 \times 10^5$  parásitos/mL con medio fresco. Western blot de extractos totales de  $6 \times 10^6$  parásitos/carril, a partir de cultivos en (B) ausencia y (C) presencia de  $10 \mu\text{g/mL}$  de oxitetraciclina (R:  $5 \text{ ng}$  de proteína recombinante). (D) Nivel de TryS relativizado al contenido de TR a partir del análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los Western-blots. Datos representativos de tres ensayos.

A partir de la cuantificación de los niveles intracelulares de la TryS en los parásitos de la línea TbTryS-ARNi inducida, se observó que ya a partir del día 1 la concentración cae de  $0,7$  a  $0,2 \mu\text{M}$ , llegando en el día 3 a un valor mínimo de  $30 \text{ nM}$ . De esta manera, fue posible determinar que concentraciones intracelulares de TbTryS por debajo de  $200 \text{ nM}$  comprometerían la viabilidad del parásito, seguramente al verse afectadas distintas funciones celulares importantes que dependen de  $\text{T(SH)}_2$  (ver introducción).

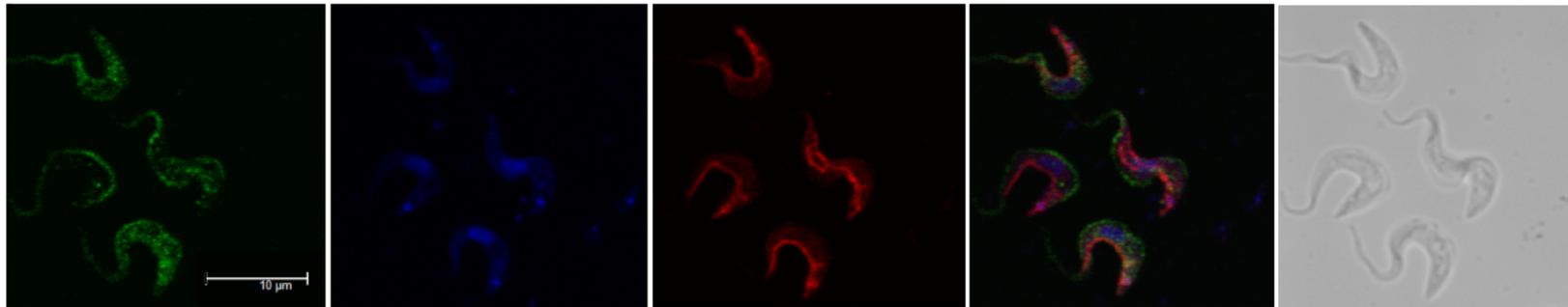
### 3 - Localización subcelular de la TryS en la forma infectiva de *T. brucei*

El estudio de la localización subcelular de la TryS en la forma infectiva de *T. brucei* se realizó por inmunofluorescencia indirecta. 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).

Las imágenes de inmunofluorescencia de la línea control (*wild-type*) de *T. brucei* muestran una localización citosólica de la proteína, con una distribución predominantemente granular (ver Fig. 14). Esta imagen difiere de la observada para la TR, otra proteína citosólica, que presenta un patrón de distribución más homogéneo de tipo no granular (imágenes no mostradas). La señal verde correspondiente a la TbTryS (Alexa 488) no estaría co-localizando ni con núcleo, kinetoplasto o mitocondria 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) o pequeños organelos (por ejemplo glicosomas). Asimismo se observó señal de la TryS a lo largo del flagelo del parásito. Tanto la distribución granular como esta novedosa localización flagelar de la TryS ameritan estudios más detallados y confirmatorios que incluirían microscopía electrónica y marcadores de proteínas flagelares.

Para el caso de la línea TbTryS-ARNi (ver Fig. 14) sin inducir (ARNi -), como era de esperar, se observa la misma distribución citosólica que para el caso de la línea *wild-type*. Mientras que en la línea inducida (ARNi +), si bien se obtiene una localización subcelular similar de la proteína, la señal detectada es mucho menos intensa, lo cual se condice con los menores niveles de TryS detectados en parásitos donde el ARNi se indujo durante 48hs (Fig. 13 C). Tal cual se mencionó anteriormente, la técnica de interferencia del ARN no es capaz de suprimir la expresión de la proteína completamente (Fig. 13 C), lo cual explica porque en condiciones de inducción del ARNi aún ha sido posible detectar señal de TryS por inmunofluorescencia.

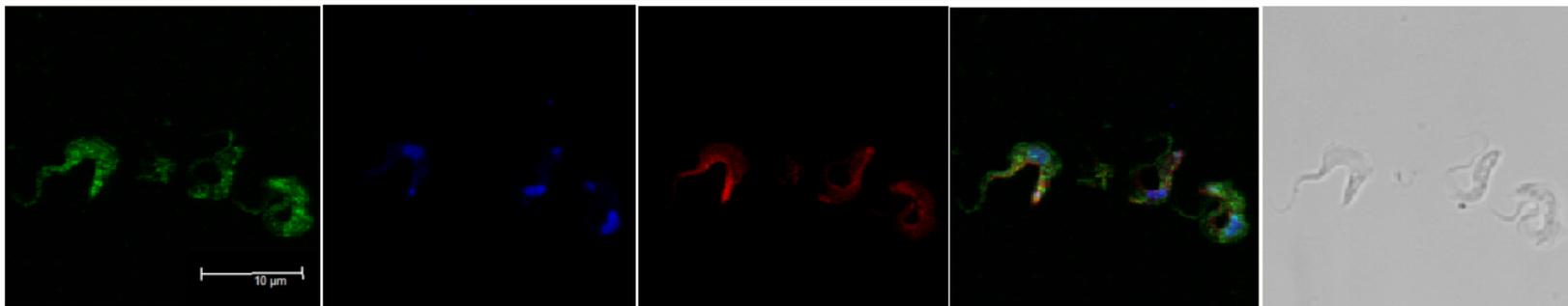
# wild-type



# TryS-ARNi

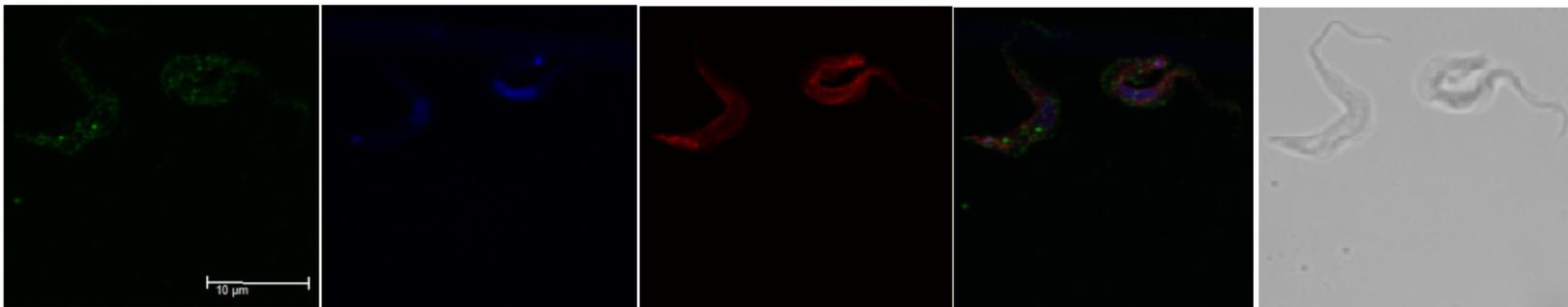
ARN i

-



ARN i

+



TryS  
Alexa 488

ADN  
TOPRO

Mitocondria  
Mitotracker

Superposición

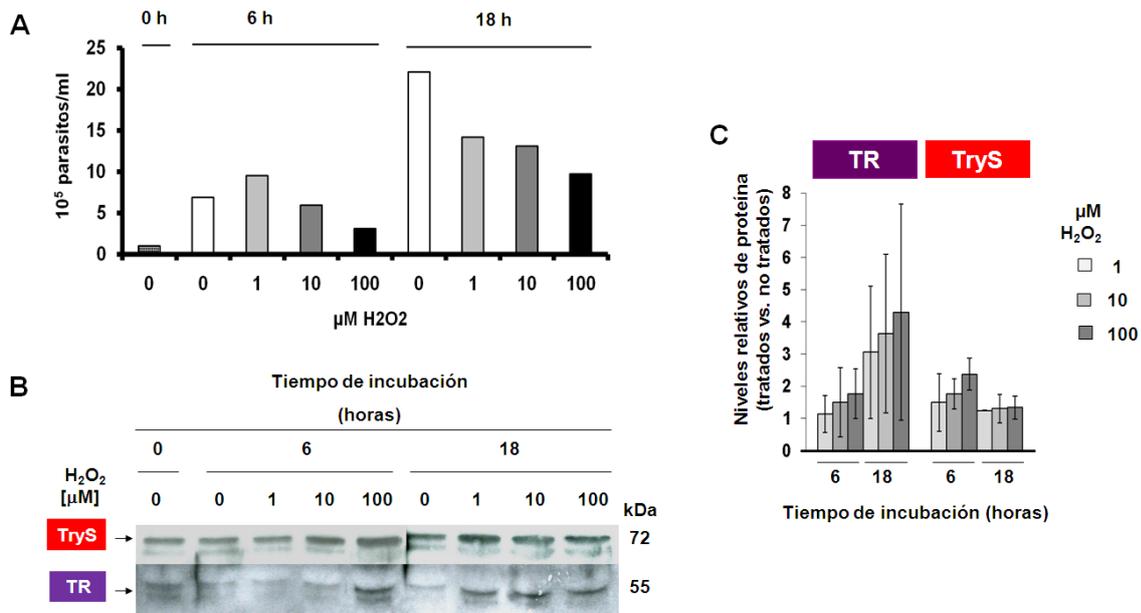
Campo claro

**Figura 14. Localización subcelular de la TryS en la forma sanguínea de *T. brucei*.** Imágenes de inmunofluorescencia de los parásitos *wild type* y ARNi-TbTryS sin inducir (ARNi-) e inducido (ARNi+) utilizando suero de conejo anti-TbTryS purificado por afinidad (dil 1:500); Anti-conejo Alexa 488 (verde), TO-PRO (azul) y Mitotracker (magenta) se utilizaron como anticuerpo secundario, marcador de ADN y mitocondria respectivamente. El ARNi de la TryS fue inducido con 10 µg/mL oxitetraciclina por 48 horas previo al inmunoensayo. A la derecha se muestran las imágenes de superposición (Alexa488+TO-PRO+Mitotracker) y de campo claro.

#### **4 - Efectos del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad y expresión de TryS y TR en la forma infectiva de *T. brucei*.**

Para determinar si un estímulo oxidativo induce expresión de la TryS en la forma infectiva de *T. brucei*, un inóculo de  $5 \times 10^5$  parásitos/mL de la línea celular control fue expuesto a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (1, 10 y 100 µM) por diferentes tiempos (6 y 18 horas).

En primer lugar se determinó el efecto de los distintos tratamientos mediante recuento celular (ver Fig. 15 A). A las 6 horas, se observa como el  $H_2O_2$  en concentraciones bajas (orden 1 µM) podría estar actuando como inductor del crecimiento de los parásitos, ya que el número de parásitos aproximadamente se duplicó respecto al control sin  $H_2O_2$  (de  $6 \times 10^5$  a  $10 \times 10^5$  parásitos/mL). Sin embargo, para afirmar esto se debería analizar si la diferencia de densidades celulares entre 0 y 1 µM de  $H_2O_2$  es significativa, o se debe al error en el recuento celular. Dado que este experimento fue realizado una sola vez, sería conveniente repetirlo para confirmar este resultado con cierto peso estadístico. Por otro lado, se observa que concentraciones crecientes del oxidante tienen un efecto antiproliferativo o citotóxico sobre los parásitos. En presencia de 10 µM de  $H_2O_2$ , el cultivo mantuvo una densidad celular de  $5 \times 10^5$  parásitos/mL, número ligeramente menor que el control sin tratar; mientras que cuando se agregó el agente oxidante a una concentración 10 veces superior (100 µM), el número de parásitos vivos resultó un 60% inferior respecto al cultivo control no tratado ( $2,5 \times 10^5$  parásitos/mL). Los efectos citotóxicos del peróxido de hidrógeno estarían ocurriendo de una manera dosis dependiente, ya que a mayor concentración del mismo, se observa una mayor muerte celular. A las 18 horas post-tratamiento, ya no se observa el efecto inductor del crecimiento a bajas concentraciones de  $H_2O_2$ , debido probablemente a que el parásito se vio expuesto muchas horas al mismo. Mientras que el cultivo control alcanzó los  $2,25 \times 10^6$  parásitos/mL (valor esperable según las curvas de crecimiento ya vistas en la sección 1), los tratados con 1, 10 y 100 µM de  $H_2O_2$  llegaron a densidades de  $1,4 \times 10^6$  (62%),  $1,3 \times 10^6$  (58%) y  $1,0 \times 10^6$  (44%) parásitos/mL respectivamente. Se observa el mismo efecto dosis dependiente, donde concentraciones mayores de peróxido de hidrógeno resultan más citotóxicas para el parásito.



**Figura 15. Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la expresión de TryS y TR de *T. brucei* sanguíneo** (A) Viabilidad de los parásitos luego de 6 y 18 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1, 10 y 100 μM) partiendo de una densidad celular inicial de 5×10<sup>5</sup> parásitos/mL. (B) Western-blot para analizar los niveles de TryS y TR en parásitos tratados con un bolo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1, 10 y 100 μM) luego de 6 y 18 horas. Se cargaron por carril los extractos totales de 5×10<sup>6</sup> parásitos, incubando la membrana con suero de conejo purificado por afinidad anti-TbTryS y anti-TcTR (dil 1:500) (C) Cuantificación de los niveles de TryS y TR luego del análisis densitométrico de las bandas del Western- blot. Los valores se expresaron como cantidades relativas normalizadas frente a parásitos sin tratar.

El efecto de estos tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la expresión de TryS y TR fue estudiado en la línea control de *T. brucei* mediante la técnica de Western-blot con anticuerpos específicos contra estas proteínas (ver Fig. 15 B). El análisis de los resultados que sigue a continuación se realizó sobre la asunción que, para cada condición, se han cargado por carril el extracto total del mismo número de parásitos. El análisis cuantitativo de las bandas correspondientes a la TryS (Fig. 15 C) muestra que tratamientos con 1, 10 y 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducen un incremento de 1,5, 1,7 y 2,3 veces, respectivamente, en los niveles de la proteína con respecto al contenido hallado en los parásitos no tratados. Luego de 18 horas, los niveles de proteína encontrados en los parásitos tratados con diferentes concentraciones de peróxido son muy similares entre si y a aquellos presentes en parásitos no tratados. La cuantificación de las bandas correspondientes a la TR (ver Fig. 15 C), indica que a las 6 hs la expresión de la misma aumenta 1,5 y 1,7 veces en los parásitos tratados con 10 y 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, en comparación a los no tratados, mientras que el contenido de TR no se ve afectado por la exposición con 1 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Al cabo de 18 horas de exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se alcanzan niveles de sobreexpresión de esta enzima de 3, 3,5 y 4 veces para 1, 10 y 100 μM respectivamente.

Los datos extraídos de estos experimentos muestran que la expresión de ambas enzimas, TryS y TR, es inducida en parásitos expuestos a peróxido de hidrógeno por tiempos cortos (6 horas) siguiendo un patrón dosis dependiente. Sin embargo la magnitud del efecto inductor difiere para ambas proteínas. Por ejemplo, a iguales concentraciones de agente oxidante, los niveles de TryS y TR aumentaron entre 50-130% y 0-70% respectivamente, respecto a los valores determinados en parásitos no tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado, tiempos de exposición prolongados (18 horas) en presencia de distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produjeron un incremento importante en la expresión de TR, que se evidenció en niveles 3-4 veces superiores a los detectados en parásitos no estimulados, pero no así de la TryS cuyo contenido no se modificó respecto de los valores alcanzados al cabo de 6 horas de tratamiento.

Estos resultados indicarían que el parásito pone en marcha mecanismos compensatorios para contrarrestar el estrés oxidativo generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, permitiéndonos proponer los siguientes escenarios: i) estímulo oxidante fuerte (100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), tanto la síntesis de tripanotión (TryS) como su reducción (TR) se verían rápidamente incrementados; ii) estímulo oxidante medio (10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en una primera instancia se produciría un aumento en la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> la cual se sostendría en el tiempo y sería luego (más de 6 horas) complementada por un incremento en los niveles de TR; iii) estímulo oxidante menor (1 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en una primera etapa habría un incremento marginal en la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> acompañada por una segunda fase (luego de 6 horas) donde tanto la síntesis como la reducción se verían aumentadas.

En general, es de destacar que frente a concentraciones bajas de oxidante, el parásito activaría en primer lugar la expresión de TryS, seguramente para asegurar un aumento en el *pool* de T(SH)<sub>2</sub>, para en una segunda fase sumar a esto el incremento en la capacidad reductora o de regeneración del ditiol a través de la TR.

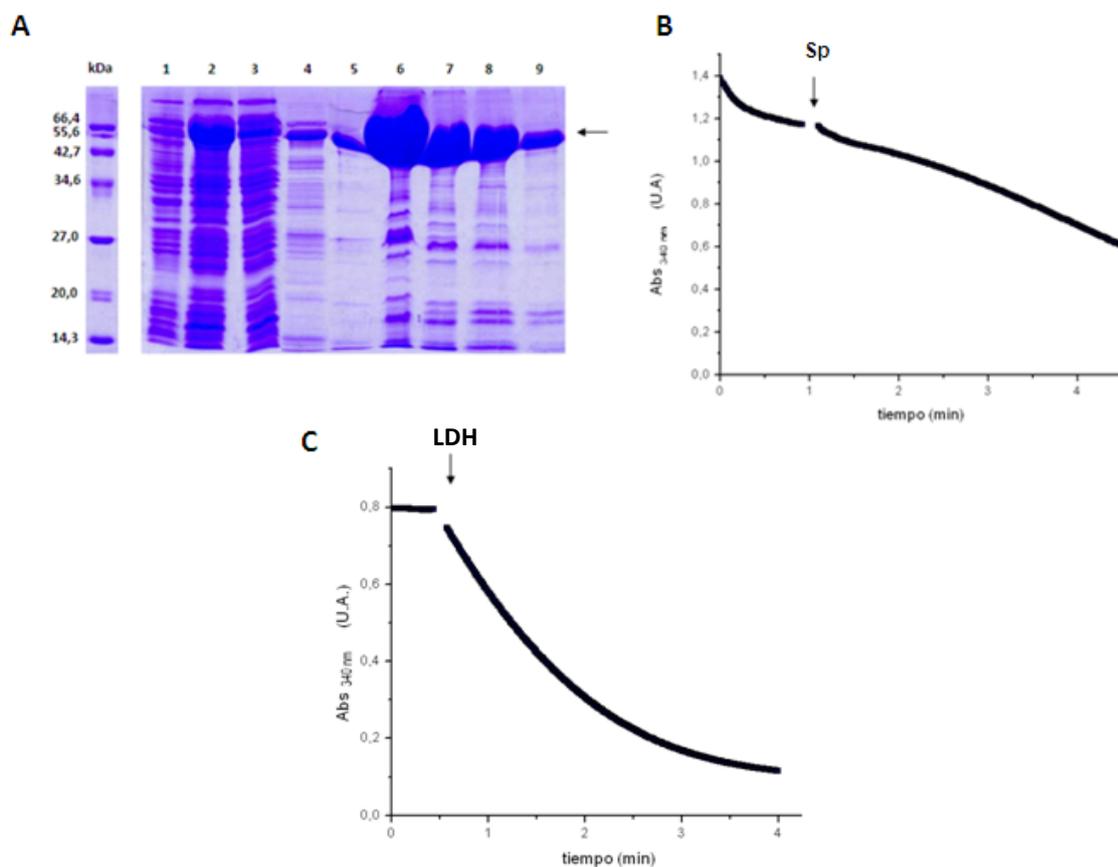
## 5 - Expresión de la TryS de *C. fasciculata* y síntesis de tripanotión

Para la síntesis bioquímica de tripanotión fue necesario, en primera instancia, la expresión y purificación de la TryS de *C. fasciculata*. A la secuencia de este gen se le introdujo una mutación en la posición 59 que sustituye una cisteína por una alanina. Este residuo tiólico, junto con la histidina 130 y aspartato 146, son responsables de la actividad amidasa presente en la forma nativa de la proteína (29, 62). Por lo tanto su reemplazo elimina la actividad C-N hidrolasa de la enzima, permitiendo aumentar la eficiencia en la producción de tripanotión (34).

Para analizar la expresión y purificación de la CfTryS C59A, se realizó un gel SDS-PAGE al 12% (ver Fig. 16 A). Producto de la inducción de la proteína recombinante, se observa la aparición de una banda por encima de los 66 KDa (carril 2 Fig. 16 A) que antes no se encontraba presente (carril 1 Fig. 16 A). Esta misma banda se encuentra en las diferentes fracciones de lavado (carril 4 Fig. 16 A) y elución (carriles 5-9 Fig. 16 A) provenientes de la columna Histrap, no así en la fracción de material no unido (carril 3 Fig. 16 A), indicando que la proteína fue retenida en su gran mayoría. Del análisis de las fracciones, se observa que la mayor parte de la proteína eluye principalmente en las fracciones 3, 4 y algo en la 5, por lo que se decidió juntar las mismas.

La cantidad de proteína obtenida fue de 1 mg por litro de cultivo con un nivel de pureza de CfTryS estimado en 95% a partir del análisis del gel SDS-PAGE (Fig. 16 A). La concentración final del lote de las fracciones fue de 0,83 mg/mL, no pudiendo concentrarse, tal vez por problemas de solubilidad de algunos contaminantes que llevaban a la co-precipitación de la enzima. A partir del ensayo de actividad enzimática acoplado (ver Fig. 16 B), se corroboró que la enzima producida presentaba actividad sintetasa, ya que en presencia de GSH y Sp se produjo la hidrólisis de ATP a ADP. A través del cálculo de la pendiente de la recta y de la concentración proteica, se determinó que la actividad específica de la enzima fue de 0,459 U/mg. Este valor de actividad específica es aproximadamente un orden de magnitud inferior al reportado por Comini y col. (3.5 U/mg) (1), lo cual podría deberse a una conformación inadecuada y poco productiva de la proteína preparada en nuestro laboratorio, explicado en parte los bajos niveles de expresión obtenidos.

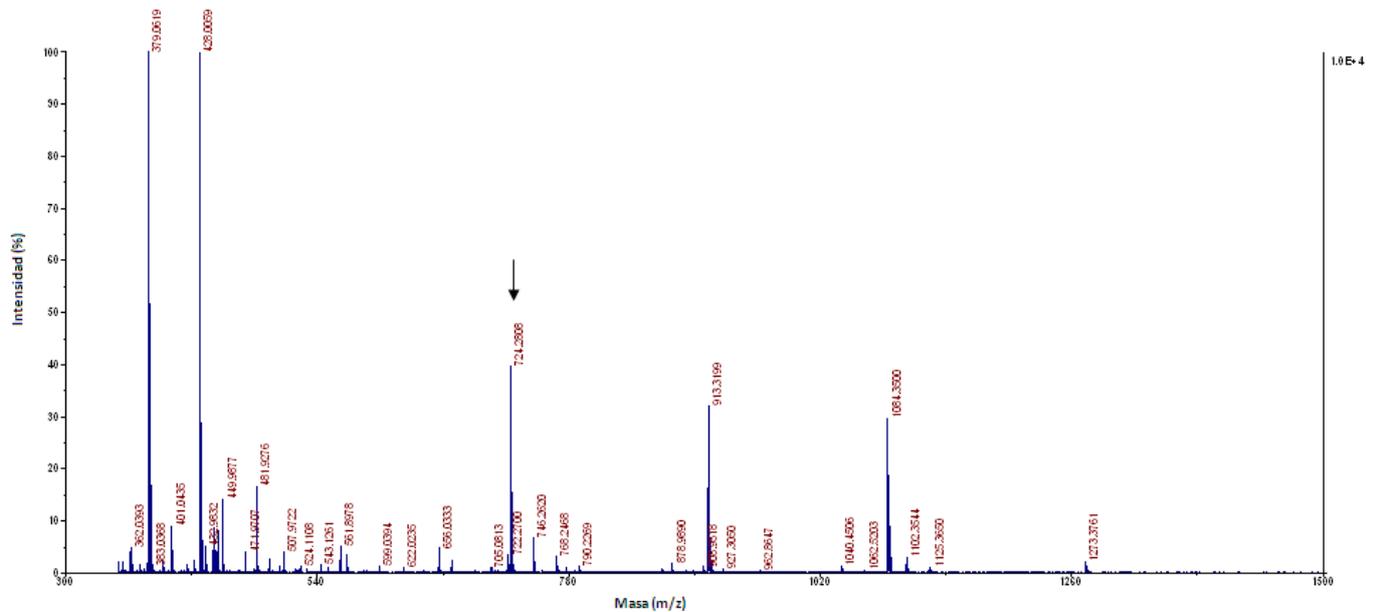
La síntesis se llevó a cabo por duplicado en un volumen final de 10 mL conteniendo 0,73 U de CfTryS C59A y a partir de la cual deberían generarse 0,5 mM de T(SH)<sub>2</sub> si la reacción fuera completa. Debido a la baja actividad enzimática del mutante de CfTryS, se decidió monitorear cada 60 minutos el grado de avance de la reacción de síntesis mediante ensayos espectrofotométricos de punto final (ver Fig. 16 C). Esto permitió establecer que al cabo de 4 horas se completó la síntesis del ditiol dado que se detectó la formación de 1 mM de piruvato lo cual equivale a 0,5 mM de tripanotión, teniendo en cuenta que por cada molécula de T(SH)<sub>2</sub> se consumen (o forman) dos de ATP (o piruvato).



**Figura 16. Expresión de CfTryS y síntesis de tripanotión.** (A) Análisis de la expresión y pureza de CfTryS por SDS-PAGE 12% carril: 1) 8 μL extractos totales de *E. coli* pre-inducción con IPTG; 2) 8 μL de fracción soluble de extractos celulares inducidos durante 18hs con IPTG 500 μM; (3) 8 μL de material no unido a la columna de HisTrap; (4) 8 μL muestra del lavado de la columna; (5, 8 y 9) 20 μL de fracciones 2, 5 y 6 de elución; (6 y 7) 10 μL de fracciones 3 y 4 de elución. (B) Determinación de la actividad sintetasa de la CfTryS utilizando 5 μL de la fracción número 3 de elución. Con flecha negra se indica el agregado de espermidina a una concentración final de 10 mM. La oxidación de NADH (reacción enzimática acoplada) se monitoreó midiendo la absorbancia a 340 nm en función del tiempo. (C) Determinación del grado de avance de la reacción de síntesis de tripanotión a las 4 horas utilizando 10 μL de la misma en un volumen final de reacción de 125 μL. Con flecha negra se indica el agregado de 1,6 U de LDH a la mezcla de reacción. La oxidación de NADH se monitoreó midiendo la absorbancia a 340 nm en función del tiempo.

La cantidad de T(SH)<sub>2</sub> obtenida luego de la purificación por cromatografía de intercambio catiónico (resina de sulfopropil sefarosa) se determinó mediante cuantificación de tioles libres por la reacción de Ellman, la cual luego de la conversión 2 SH: 1 T(SH)<sub>2</sub> arrojó un valor de 49,5 mg de de tripanotión totales. El rendimiento total en la producción y purificación de tripanotión fue de 69%, teniendo en cuenta que si la reacción de síntesis fuera completa se esperaban obtener 72 mg del mismo.

Una muestra con una concentración final de 30,8 mM de tripanotión purificado fue analizada por espectrometría de masas. La determinación confirmó que la muestra contenía tripanotión al observarse una señal de masa de 724,28 Da, siendo la masa teórica del tripanotión reducido de 721,86 Da (Fig. 17).



**Figura 17.** Espectro de masas de la muestra purificada de T(SH)<sub>2</sub> por MALDI-TOF. Se indica con flecha negra el pico correspondiente a tripanotión reducido y monocargado (724,28 g/mol)

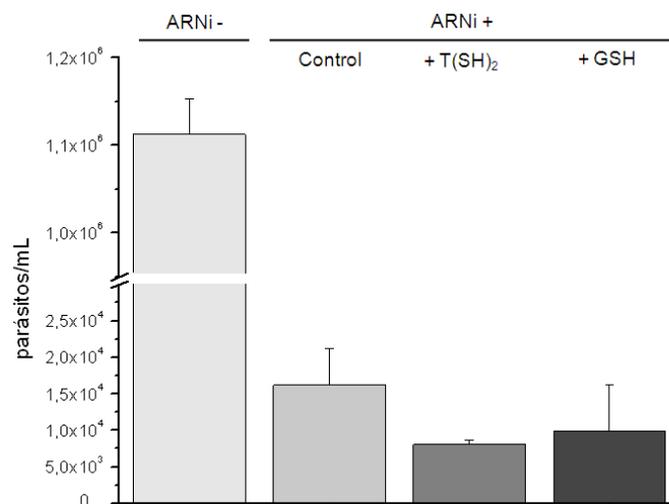
## 6 – Ensayos de complementación metabólica sobre parásitos de la línea ARNi-TbTryS

La depleción sostenida de TryS, y en consecuencia de T(SH)<sub>2</sub> (33), en *T. brucei* conlleva a una disminución en la tasa de proliferación seguida de una pérdida de la viabilidad celular (Fig. 13). Dicho fenotipo tenía lugar incluso cuando la concentración intracelular de GSH en esos parásitos alcanzaba valores 1,5 veces superiores respecto a los presentes en la línea celular no inducida, sugiriendo que GSH no es capaz de reemplazar en sus funciones a T(SH)<sub>2</sub> (33). Sin embargo, dado que al cabo de aproximadamente una semana se observa una reversión en el fenotipo asociado a una pérdida en la supresión de la expresión de TryS, se plantea el interrogante si los elevados niveles de GSH permitieron a algunos pocos parásitos sobrevivir en un estado quiescente hasta que los mismos produjeran las mutaciones necesarias para escapar al mecanismo de inducción del ARNi. Por otro lado, se ha reportado la existencia de transportadores de GSH en *T. brucei* (39). Dicho estudio demostró además que la suplementación del medio de cultivo con 80 μM de GSH permitió complementar de manera eficiente el fenotipo de una línea celular de *T. brucei* depletada de glutatión sintetasa (Gsh

B). A la fecha no se han descrito para los tripanosomátidos transportadores de membrana celular específicos para  $T(SH)_2$  y es poco probable que existan en el caso especial de *T. brucei*, un parásito con un ciclo de vida extracelular. Sin embargo se desconoce si los transportadores de GSH podrían servir también para incorporar  $T(SH)_2$ .

El experimento que aquí se describe tuvo por finalidad determinar si GSH y  $T(SH)_2$  agregados al medio de cultivo logran complementar el fenotipo observado en los parásitos con niveles reducidos de TryS. Con este fin se indujo el ARNi de la TryS durante 48 horas mediante el agregado de tetraciclina (1  $\mu\text{g/mL}$ , ver sección 2.1 materiales y métodos). Al cabo de este período se adicionó al medio de cultivo GSH y  $T(SH)_2$  a una concentración final de 1 mM y luego de 24 horas se determinó el número de células viables por recuento celular. Los controles incluyeron cultivos de parásitos sin inducir con tet (ARNi -) e inducidos pero no tratados con tioles de baja masa molecular (ARNi +). Las densidades celulares alcanzadas en los cultivos control, ARNi - =  $1 \times 10^6$  células/mL y ARNi + =  $1 \times 10^4$  células/mL, son los esperados de acuerdo al patrón de crecimiento observado para estas líneas (ver Fig. 12 A y 13 A).

En los cultivos tratados durante 24 horas tanto con 1 mM de  $T(SH)_2$  como con 1 mM de GSH, no se observaron variaciones significativas en el número de parásitos por unidad de volumen respecto a la línea ARNi-TbTryS inducida, detectándose valores de  $0,8 \times 10^4$  y  $1,0 \times 10^4$  parásitos/mL respectivamente. Estos resultados por un lado confirman nuevamente que GSH no puede reemplazar a  $T(SH)_2$  en sus funciones biológicas en *T. brucei*, y por otro lado indican que no existen transportadores específicos para  $T(SH)_2$  a nivel de membrana.



**Figura 18. Efectos del  $T(SH)_2$  y GSH sobre el crecimiento de parásitos con niveles bajos de TryS.** Recuento a las 96 hs de parásitos de la línea ARNi-TbTryS a partir de un inóculo de  $1 \times 10^5$  parásitos/mL inducidos por 72hs (ARNi+) con oxitetraciclina [control], oxitetraciclina + 1 mM tripanotión [+ $T(SH)_2$ ] y oxitetraciclina + 1 mM glutatión [+GSH]. Como control positivo se utilizó la misma línea, pero sin inducir [ARNi-]. (n=2  $\pm$  desviación estándar).

## 7 - Construcción de una línea sobreexpresante de la TryS de *T. brucei*

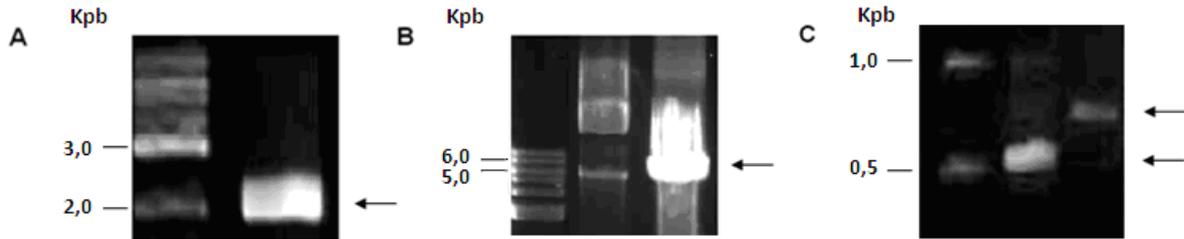
La primera estrategia para la construcción del vector de ADN para la sobreexpresión de la TbTryS se basó en el clonado BamHI/BamHI de la secuencia codificante para la TryS en el plásmido para tripanosomátidos pHD1700 (ver Fig. 24 - Anexo). Este posee 2 copias de la secuencia codificante para el epítipo de 1,2 kDa del proto-oncogen c-myc en el extremo C-terminal y resistencia a higromicina. Para ello, se diseñaron los primers Fo y Re TbbTryS BamHI (ver Tabla 2), los cuales introducen un sitio de corte para dicha enzima en cada extremo del gen, permitiendo así su ligación en el plásmido.

Se empleó como templado para la PCR el plásmido pET19b (ver Fig. 23 – Anexo) conteniendo el gen de la TbTrys (Comini y col.) utilizando un programa con una extensión de 150 segundos. La reacción se corrió en un gel de agarosa 1% (ver Fig. 19 A), obteniéndose una única banda con un tamaño aproximado de 1,9 Kpb, el cual se corresponde con el esperado para la secuencia de *tb-tryS* (1,88 Kpb)

A continuación se digirió el gen de la TbTryS (imagen no mostrada) y el plásmido pHD1700 (ver Fig. 19 B) con la enzima de restricción BamHI. En el gel se pueden observar dos de las isoformas posibles para un plásmido: circular relajado, con una migración más retardada – quedando por encima de los 10 Kpb - y superenrollado – con una migración por debajo de los 5 kpb (carril 1, Fig. 19 B). Al analizar el plásmido tratado con BamHI (carril 2, Fig. 19 B), se observa una única isoforma con una migración de aproximadamente 5 kpb (señalada con una flecha negra), que estaría correspondiendo a la forma linear del pHD1700, indicando que la digestión funcionó de manera correcta.

Luego de digerir la secuencia del gen amplificado y el plásmido pHD1700 con BamHI, se procedió a la ligación de ambos y a la transformación del producto de ligación en diferentes cepas de *E. coli* (DH5- $\alpha$ , JM107, GM2163, TOP10). En la única cepa de *E. coli* donde fue posible obtener colonias luego de la selección con ampicilina fue en *E. coli* DH5- $\alpha$  quimiocompetente. A continuación, se seleccionaron de esa placa 30 colonias para realizar un *screening* por PCR.

Debido a que el clonado BamHI/BamHI no fue direccional, fue necesario controlar en dichas colonias por un lado la presencia del inserto (para descartar aquellas colonias que pudieran tener el vector religado sin el inserto, y por lo tanto presentarán resistencia a ampicilina) y la orientación del mismo (para descartar aquellas colonias con el inserto clonado en la dirección contraria, que no permitirán la expresión de una proteína funcional). El *screening* de las colonias bacterianas se realizó por PCR utilizando los pares de *primers* (A) Fo1TbbTs + Re4TbbTs (para controlar la presencia del gen de la TbTryS) (B) p2T7-if + Re5TbbTs (para controlar presencia y orientación del gen de la TbTryS) (ver Tabla 2). El programa utilizado constó de una extensión por 90 segundos. Si bien el par de *primers* B sería suficiente para controlar la presencia y orientación correcta del gen de la TbTryS, se incluyó el par de primers A para mayor certeza de los resultados.

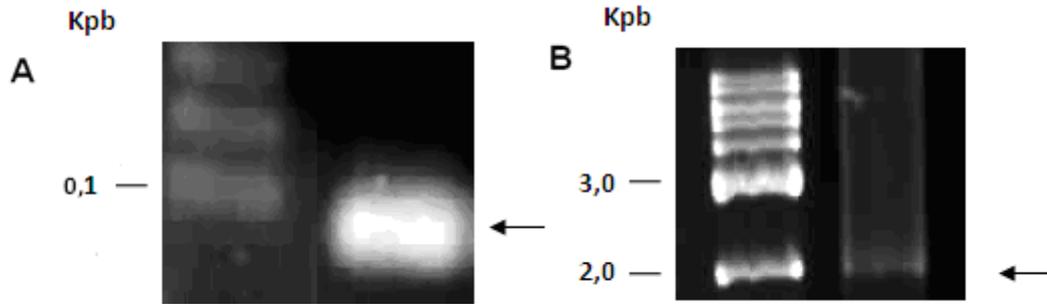


**Figura 19. Primera estrategia de clonado para la generación del vector de sobreexpresión de la TbTryS.** Geles de agarosa 1% p/v teñidos con BrEt donde se visualiza **(A)** Amplificación de la secuencia del gen de la TbTryS por PCR (1,9 Kpb) a partir del vector pET19b-TbTryS **(B)** vector pHD1700 sin digerir (carril 1) y digerido con BamHI (carril 2) . **(C)** *Screening* para detectar la presencia (carril 2, banda 810 pb) y orientación correcta (carril 1, banda 750 pb) del gen de la TbTryS en un plásmido aislado de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con la reacción de ligación pHD1700+tbtrys.

En la Fig. 19 C se muestra el resultado correspondiente a una de las 30 colonias analizadas. En la misma se observan dos bandas del tamaño esperado (aproximadamente 700 y 800 pb- señaladas con flechas negras) producto de la amplificación con los pares de *primers* (A) y (B). Esto llevaría a pensar que se está ante un resultado doble positivo, es decir, el gen de la TbTryS clonado en la orientación correcta dentro del pHD1700. Sin embargo, no fue posible la recuperación del ADN plasmídico a partir de aquellas colonias que dieron un resultado doble positivo.

La segunda estrategia para la construcción de la línea sobreexpresante de la TbTryS, se basó en el clonado direccional HindIII/BamHI del gen dentro del vector pHD1700. Dado que la secuencia de la TbTryS presenta un sitio interno de corte para HindIII cerca del extremo C-terminal (ver Fig. 25 - Anexo), fue necesario realizar la mutagénesis sitio dirigida de esta secuencia mediante el método de megaprimer (40). Este método utiliza tres *primers* diferentes para realizar dos ciclos de PCR, donde el producto de la primera reacción es utilizado como *primer* (llamado *megaprimer*) en la segunda reacción de PCR con el tercer *primer*.

Para llevar a cabo la mutagénesis por el método del *megaprimer*, se diseñó el *primer* Fo TbTryS HindIII-del2 (ver Tabla 2) conteniendo una mutación silenciosa que suprime el sitio de reconocimiento de la enzima HindIII. Este, junto con el *primer* ReTbbTrysBamHI fueron utilizados en la primera ronda de PCR con un tiempo de extensión de 60 segundos, para generar el *megaprimer* (ver Fig. 20 A). En esta reacción se empleó la enzima Pwo, la cual presenta actividad 3'-5' de control de lectura para asegurar el correcto agregado de la mutación deseada y la ausencia de otras inespecíficas que pudieran tener lugar durante los



**Figura 20. Segunda estrategia de clonado para la generación de un vector de sobreexpresión de la TbTryS.** Geles de agarosa 1% p/v teñidos con BrEt donde se visualiza **(A)** Amplificación por PCR de un fragmento de la secuencia del gen de la TbTryS (megaprimer - 80 pb) a partir del vector pET19b-TbTryS, **(B)** Amplificación por PCR de la secuencia del gen de la TbTryS (1,9 Kpb) a partir del vector pET19b-TbTryS, utilizando como primer sentido el fragmento obtenido en A que permite mutar el sitio HindIII interno de la *tb-trys*.

ciclos de PCR. En el gel se observa una única banda de un peso aproximado de 80 pb (señalada con flecha negra), que corresponde con el *megaprimer*. Este fue purificado directamente de la reacción, siendo luego utilizado como *primer* reverso en una segunda PCR junto con el *primer* FoTbTrysHindIII. El programa de PCR utilizado fue el ya descrito en la sección materiales y métodos con un tiempo de extensión de 150 segundos.

En la Fig. 20 B, se observa como se logró amplificar un fragmento que se encuentra cercano a los 2 Kpb, correspondiendo al tamaño esperado para el gen de la TbTryS (1,9 Kpb). Este producto purificado y el plásmido pHD1700 fueron digeridos con las enzimas HindIII y BamHI y luego ligados entre sí con T4 ADN ligasa. Con esta reacción se transformaron diferentes cepas de *E. coli* (ya utilizadas en la primera estrategia) no siendo posible obtener colonias que presentaran la construcción plasmídica – resistentes a ampicilina-. Resulta difícil encontrar una explicación a la imposibilidad de ligar el gen *tb-trys* en el plásmido pHD1700 mediante métodos clásicos de biología molecular. Eventualmente podría deberse a 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'. En un futuro se probarán nuevas condiciones de ligación.

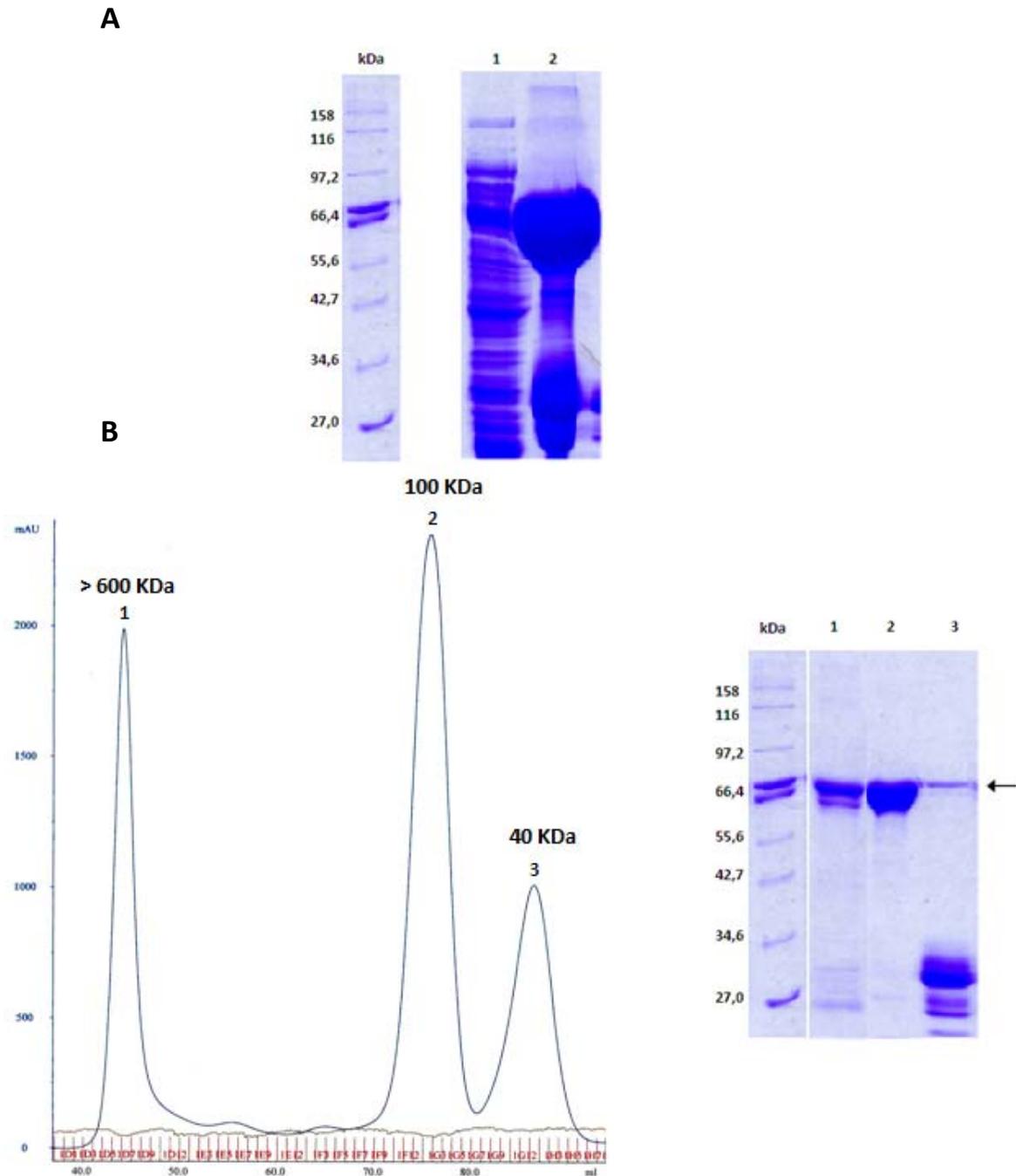
## 8 - Expresión de la TryS de *T. brucei*

Para la determinación de algunos parámetros cinéticos de la TbTryS, en primera instancia, se expresó y purificó la enzima recombinante a partir de *E. coli* (construcción hecha por Comini y col.).

El primer paso para la purificación de la TbTryS consistió en el pasaje del material soluble del cultivo bacteriano por una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. Tanto una alícuota del cultivo previo al agregado de IPTG (sin inducir) como la muestra soluble y post-inducción purificada se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12% (ver Fig. 21 A). En el mismo se observa como, luego de la purificación se obtiene una muestra enriquecida en una banda de un peso molecular cercano a los 70 KDa, valor aproximado al teórico para la TbTryS recombinante (74 KDa).

Luego del pasaje de la muestra por la IMAC, se realizó un segundo paso de purificación de la enzima por cromatografía de filtración en gel con el objetivo de alcanzar una pureza mayor al 90% que posibilite la determinación confiable de algunos parámetros cinéticos de la misma. Durante la cromatografía de exclusión molecular (ver Fig. 21 B izq.), se observaron tres picos con distintos volúmenes de retención y conteniendo una cantidad considerable de proteína. El primer pico se detectó aproximadamente a los 45 mL, correspondiendo con el volumen muerto de la columna. Esta/s proteína/s presentan un peso molecular por encima de los 600 KDa, y no fueron capaces de ser retenidas por la matriz de la columna. El segundo pico se encuentra aproximadamente a los 78 mL, correspondiendo a una proteína de aproximadamente 100 KDa según lo calculado a partir de la curva de calibración. El tercer pico se encuentra a los 90 mL, correspondiendo con proteínas de aproximadamente 40 KDa.

Los picos obtenidos a partir de la cromatografía de filtración en gel, fueron analizados por gel SDS-PAGE al 12% (ver Fig. 21 B der.). A partir del mismo se pudo determinar que el pico 1, estaría correspondiendo a oligómeros de alto peso molecular que forma la TbTryS, ya que se visualiza principalmente una única banda cercana a los 70 KDa (carril 1, Fig. 21B der). Tal como se confirmó mediante ensayos enzimáticos, estos multímeros carecen de actividad tripanotión sintetasa (datos no mostrados). El pico 2, de mayor área bajo la curva, estaría correspondiendo a la proteína recombinante en estado monomérico, ya que se obtuvo esencialmente una única banda del peso molecular esperado. Luego de los ensayos enzimáticos, se comprobó que la misma era la TbTryS ya que la muestra presentaba actividad tripanotión sintetasa (datos no mostrados). Correspondiente al tercer pico, se observan varias bandas de bajo peso molecular y a su vez con una menor intensidad, la banda correspondiente a la TbTryS. Estas bandas de mayor intensidad estarían correspondiendo a contaminantes de bajo peso molecular. A partir de la información obtenida, se decidió lotear las fracciones correspondientes al pico 2, a partir de la cual se obtuvieron 5,6 mg de TryS con una actividad específica de 0,30 U/mg. Este valor se halla en el mismo orden de magnitud al reportado por Comini y col. (41).



**Figura 21. Análisis de la expresión y pureza de TbTrys (A)** SDS-PAGE 12% (1) fracción soluble de extracto total de bacterias no inducidas con IPTG, (2) fracciones de elución (3,4 y 5) obtenidas a partir de la purificación por columna de HisTrap de extracto de bacterias inducidas con 500  $\mu$ M de IPTG. **(B)** Perfil de la cromatografía de exclusión molecular de la muestra de TbTrys previamente purificada por columna de afinidad a níquel. En el cromatograma se indican los pesos moleculares estimados a partir de la curva de calibración para cada uno de los picos de elución.

## 9 - Determinación de Km aparente de la TbTryS para distintas poliaminas.

En los ensayos enzimáticos se utilizó la TbTryS recombinante purificada hasta obtener más del 90% de homogeneidad. Para determinar las Km para las distintas poliaminas, las reacciones se llevaron a cabo a concentraciones saturantes de ATP (3,1 mM, regenerado constantemente por la piruvato quinasa) y 0,8 mM de GSH dado que fue reportada una inhibición marcada de la actividad enzimática por encima de 1 mM (42). Las velocidades iniciales de la reacción fueron determinadas por triplicado a concentraciones variables de espermidina (10, 1, 0,1 y 0,01 mM), N-acetilespermidina (8,1, 0,1 y 0,01 mM) y monoglutationilespermidina (0,25, 0,1, 0,05 y 0,025 mM) de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos (sección 2.12.1).

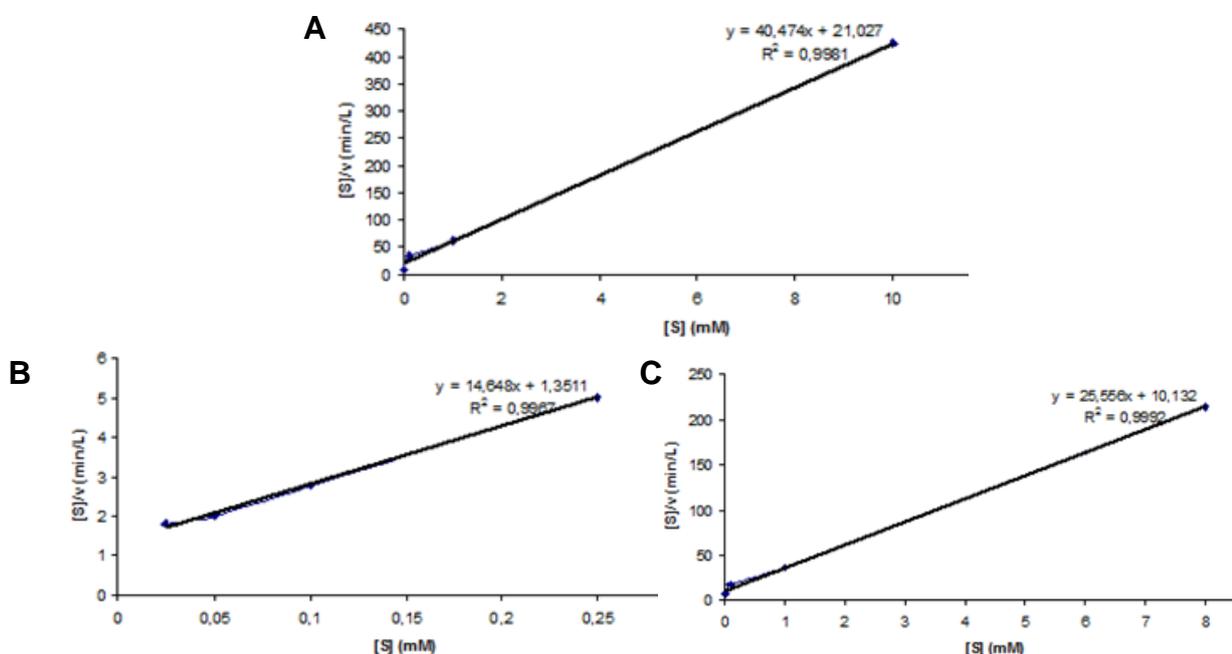
Para estimar las constantes de Michaelis (Km) aparentes para cada poliamina se ajustaron los datos de velocidad a la ecuación de Hanes. En estas curvas la pendiente representa  $1/V_{\text{máx}}$  y la abscisa  $-K_m$ , lo cual permitió determinar que la concentración de espermidina, N-acetilespermidina y monoglutationilespermidina a la cual la velocidad inicial de la reacción de la TbTryS es la mitad de la velocidad máxima en presencia de 0,8 mM de GSH y 3,1 mM de ATP es de aproximadamente 520  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  y 90  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estos resultados por un lado indican que, N<sup>8</sup>-acetilespermidina se comporta como un sustrato de la enzima análogo a espermidina. El valor de Km ligeramente menor para la primera puede deberse a que en esta familia de enzimas está favorecida la formación del enlace C-N con el grupo amino N<sup>1</sup> de la poliaminas (44, 45).

**Tabla 5. Resultados y cálculos de los ensayos de actividad enzimática de sintetasa de la TbTryS recombinante utilizando Sp, N-AcetilSp y GSp como sustratos, a concentraciones variables.** Para cada concentración, los datos de las pendientes reportados son un promedio a partir de un triplicado.  $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 340 nm. En negrita, se muestran los datos utilizados para graficar y luego calcular las Km aparentes respectivas. La temperatura de trabajo fue de aproximadamente 20°C.

	[S] (mM)	Pend (Abs/min)	pend/ $\epsilon$ (mM/min)	Actividad (U)	Actividad/V (U/ml)	A <sub>especifica</sub> (U/mg)	v (mmol/min)	[S] / v (min/L)
<b>Sp</b>	<b>10</b>	0,15	$2,35 \cdot 10^{-05}$	$2,82 \cdot 10^{-03}$	$5,60 \cdot 10^{-01}$	$2,56 \cdot 10^{-01}$	$2,35 \cdot 10^{-02}$	<b>425,53</b>
	<b>1</b>	0,1	$1,59 \cdot 10^{-05}$	$1,99 \cdot 10^{-03}$	$3,97 \cdot 10^{-01}$	$1,80 \cdot 10^{-01}$	$1,59 \cdot 10^{-02}$	<b>62,96</b>
	<b>0,1</b>	0,02	$2,86 \cdot 10^{-06}$	$3,57 \cdot 10^{-04}$	$7,15 \cdot 10^{-02}$	$3,25 \cdot 10^{-02}$	$2,86 \cdot 10^{-03}$	<b>34,96</b>
	<b>0,01</b>	0,01	$9,69 \cdot 10^{-07}$	$1,21 \cdot 10^{-04}$	$2,42 \cdot 10^{-02}$	$1,10 \cdot 10^{-02}$	$9,69 \cdot 10^{-04}$	<b>10,32</b>
<b>N-Acetil Sp</b>	<b>8</b>	0,24	$3,73 \cdot 10^{-05}$	$4,67 \cdot 10^{-03}$	$9,33 \cdot 10^{-01}$	$4,24 \cdot 10^{-01}$	$3,73 \cdot 10^{-02}$	<b>214,48</b>
	<b>1</b>	0,17	$2,76 \cdot 10^{-05}$	$3,45 \cdot 10^{-03}$	$6,91 \cdot 10^{-01}$	$3,14 \cdot 10^{-01}$	$2,76 \cdot 10^{-02}$	<b>36,18</b>
	<b>0,1</b>	0,04	$6,26 \cdot 10^{-06}$	$7,82 \cdot 10^{-04}$	$1,56 \cdot 10^{-01}$	$7,11 \cdot 10^{-02}$	$6,26 \cdot 10^{-03}$	<b>15,97</b>
	<b>0,01</b>	0,01	$1,49 \cdot 10^{-06}$	$1,87 \cdot 10^{-04}$	$3,73 \cdot 10^{-02}$	$1,70 \cdot 10^{-02}$	$1,49 \cdot 10^{-03}$	<b>6,71</b>
<b>GSp</b>	<b>0,25</b>	0,31	$4,97 \cdot 10^{-05}$	$6,21 \cdot 10^{-03}$	1,24	$5,65 \cdot 10^{-01}$	$4,97 \cdot 10^{-02}$	<b>5,03</b>
	<b>0,1</b>	0,23	$3,57 \cdot 10^{-05}$	$4,47 \cdot 10^{-03}$	$8,93 \cdot 10^{-01}$	$4,06 \cdot 10^{-01}$	$3,57 \cdot 10^{-02}$	<b>2,80</b>
	<b>0,05</b>	0,16	$2,53 \cdot 10^{-05}$	$3,16 \cdot 10^{-03}$	$6,31 \cdot 10^{-01}$	$2,87 \cdot 10^{-01}$	$2,53 \cdot 10^{-02}$	<b>1,98</b>
	<b>0,025</b>	0,09	$1,37 \cdot 10^{-05}$	$1,71 \cdot 10^{-03}$	$3,41 \cdot 10^{-01}$	$1,55 \cdot 10^{-01}$	$1,37 \cdot 10^{-02}$	<b>1,82</b>

Además, se destaca un  $K_m$  para Gsp seis veces inferior que el hallado para espermidina y  $N^8$ -acetilespermidina, indicando cierta preferencia de la enzima por este intermediario en la síntesis de tripanotión. En este sentido, el análisis estructural de cristales de una enzima relacionada, la GspS de *E. coli*, en presencia de Gsp, muestra a varios residuos de la proteína interaccionando con el tripéptido GSH (como por ejemplo un puente disulfuro con la Cys338, un puente isopeptídico con Lys607 y puentes de hidrógeno con Arg 316, Ser335, Ser337, Arg 538 y Arg 598), lo cual seguramente contribuye a incrementar la afinidad de la proteína por el ligando, y disminuye así su  $K_m$  (46).

A partir de las pendientes de las gráficas de absorbancia en función del tiempo y la ley de Lambert-Beer, se calcularon las velocidades iniciales, las cuales fueron promediadas para cada concentración de poliamina (Tabla 5). Los valores de  $K_m$  aparentes aquí reportados para espermidina y Gsp difieren significativamente de aquellos reportados por Oza y col. para la enzima de la misma especie. Por ejemplo, en ese trabajo se determinó un  $K_m$  de 38 y 2,4  $\mu M$  para espermidina y Gsp, respectivamente, lo cual corresponde a cifras 14 y 38 veces inferiores a las aquí descritas. Tal diferencia podría atribuirse a la eliminación de la cola de histidinas (HisTag) en la proteína recombinante producida por Oza y col y/o a la leve variación en la temperatura de trabajo (20°C vs 25°C) (43). Sin embargo, prácticamente no existe tal diferencia si se comparan los valores de  $K_m$  para espermidina y Gsp reportados aquí (520 y 90  $\mu M$ , respectivamente) con aquellos publicados para la TryS de *T. cruzi* (625 y 66  $\mu M$ , respectivamente) (47).



**Figura 22. Gráficas de Hanes para la obtención de los valores de las  $K_m$  de la TbTryS recombinante con (A) espermidina (B) N-acetilespermidina y (C) monoglutationilespermidina como sustratos. En cada gráfica se reporta la ecuación de la recta  $S/v = K_m/v_{max} + S/v_{max}$ , a partir de la cual se calcularon los valores de las  $K_m$ ,  $V_{máx}$ , y los coeficientes de regresión lineal ( $R^2$ )**

## Discusión y Conclusiones

Los tripanosomátidos poseen un metabolismo redox único basado en el tripanotión así como en la enzima responsable de su síntesis, la tripanotión sintetasa. El tripanotión es el tior central que distribuye electrones para la síntesis de precursores del ADN, la detoxificación de hidroperóxidos, y otras rutas tripanotión-dependientes. Este ditiol se crea por la unión secuencial covalente de dos moléculas de GSH a los grupos NH<sub>2</sub> terminales de la espermidina, proceso que consume un total de dos moléculas de ATP. La TryS, en comparación con otros componentes del sistema del tripanotión, no presenta ningún parentesco con proteínas de vertebrados. Es una proteína única que, aparte de algunos motivos reminiscentes de unión para el ATP, no presenta ninguna similitud de secuencia significativa con las proteínas de mamífero conocidas hasta la fecha (33, 50). Por otro lado, la enzima cumple un rol biológico esencial, abastecer al tripanosoma de su principal cofactor redox de bajo peso molecular, el tripanotión. De esta manera es que la TryS se convierte en un blanco atractivo para el diseño de drogas antitripanosomátidas.

Se pudo observar que tanto la TryS como la TR son proteínas expresadas de manera constitutiva en la forma infectiva de *T. brucei* crecida en modo axénico. Estos datos estarían indicando la importancia de estas enzimas para la supervivencia del parásito, ya que las mismas estarían siendo requeridas durante las distintas fases de crecimiento. Mientras que los niveles de TR permanecen relativamente constantes a lo largo de las diferentes etapas de un cultivo celular (exponencial, estacionaria, muerte celular), esto mismo no sucede con la TryS, ya que sus niveles disminuyen cuando los parásitos detienen su proliferación (fase estacionaria), y disminuyen aún más durante la fase de muerte celular.

Se determinó que la TryS es una proteína relativamente abundante en el parásito (concentración intracelular 1-3  $\mu$ M) que posee una localización predominantemente citosólica con una distribución granular. Dado que no se observó una distribución homogénea de la proteína dentro del parásito y que se utilizó el volumen celular total para los cálculos de concentración, la concentración real de la proteína podría ser ligeramente diferente a la aquí reportada. Tanto la concentración intracelular de la proteína como su perfil de expresión concuerdan con la importancia de la enzima y su producto, el tripanotión, para la vida del parásito.

La distribución no homogénea de la TryS dentro del citosol del parásito, podría deberse a que la proteína se ubica en algún compartimiento específico o bien un artefacto de la técnica. Para lo primero, se deberían realizar nuevamente las inmunofluorescencias de los parásitos, esta vez utilizando nuevos marcadores de organelos del parásito y ver si alguno logra co-localizar con la señal de la TryS. Asimismo, se observó una localización paraflagelar de la TryS, novedosa para este tipo de enzimas. Hasta la fecha, no hay experimentos que demuestren qué tipo de funciones podría estar cumpliendo la enzima allí, pero tal vez sea debido a que el bolsillo flagelar es una zona de gran intercambio del parásito con el medio

extracelular, por lo que la presencia de tripanotión allí podría llegar a ser muy valiosa como primer barrera de defensa del parásito. Tampoco ha sido reportada, hasta la fecha, una localización flagelar de otras enzimas involucradas en su biosíntesis (como por ej. GshA, GshB).

A través del sistema de interferencia del ARN, quedó demostrada nuevamente la esencialidad de la TryS para la sobrevivencia de los parásitos (33, 48) y esta vez, se pudo establecer que niveles menores a 200 nM comprometen la proliferación y supervivencia de los parásitos bajo condiciones de cultivo óptimas (*in vitro*). La recuperación del cultivo luego del séptimo día debido al escape del silenciamiento de ARNi, con la consecuente recuperación en la expresión de la proteína, no hace más que confirmar la indispensabilidad de la enzima para el parásito (33,48). Por otro lado, esto demuestra que el parásito no cuenta con mecanismos capaces de compensar de manera eficiente la falta de tripanotión.

Para la forma recombinante de TbTryS la  $K_m$  aparente para la espermidina como sustrato es de 0,520 mM, mientras que para el monoglutationilespermidina y N-acetilespermidina es de 0,090 y 0,397 mM. Estos valores se correlacionan bastante bien con los reportados para la TcTryS (0,625 mM y 0,066 mM para Sp y Gsp respectivamente) (28) y son indicativos de una preferencia de la enzima por emplear Gsp como sustrato. Esta diferencia en la  $K_m$  para las distintas poliaminas es importante desde un punto de vista biológico ya que le aseguraría al parásito una producción eficiente de  $T(SH)_2$  una vez formado Gsp. La sustitución en el grupo amino terminal de la espermidina por un grupo acetilo o glutatión, estaría quitando una carga positiva de la molécula, haciendo que su carga neta total sea más negativa que antes. A su vez la adición de una molécula de glutatión, estaría aportando una carga negativa a través de su grupo carboxilo terminal y un grupo sulfhidrilo capaz de establecer puentes de hidrógeno. Los valores  $K_{cat}/K_m$  calculados para la enzima con Sp y Gsp como sustratos son de  $0,2 \times 10^2$  y  $4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  respectivamente, si bien estos valores difieren significativamente de los reportados para el caso de la CfTryS ( $1,7 \times 10^3$  y  $18 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para Sp y Gsp respectivamente) (28), en ambos casos la eficiencia catalítica de la enzima con Gsp es 10 veces superior con respecto a Sp. La sustitución en el grupo amino terminal de la espermidina por un grupo acetilo o glutatión, estaría quitando una carga positiva de la molécula, haciendo que su carga neta total sea más negativa que antes. A su vez la adición de una molécula de glutatión, estaría aportando una carga negativa a través de su grupo carboxilo terminal y un grupo sulfhidrilo capaz de establecer puentes de hidrógeno. Esto podría estar influyendo en la manera en cómo interacciona y acomoda la enzima a sus sustratos, explicando así la mayor eficiencia catalítica que presentan la TryS cuando Gsp es su sustrato. Sería muy valioso poseer la estructura tridimensional de la enzima, para poder estudiar con más detalle los tipos de interacciones que establece con sus sustratos para poder comprenderlas mejor y tratar de diseñar drogas que se unan de manera eficiente a la enzima, con el fin de inhibir sus funciones para lograr un efecto tripanocida.

Ya que quedaron comprobados los efectos del silenciamiento de la TryS sobre los parásitos, hubiese sido un aporte relevante estudiar qué nuevas propiedades podría conferirle a la célula su sobreexpresión, como por ejemplo resistencia frente a estrés oxidativo, cambios en la tasa de proliferación, infectividad y/o supervivencia. En la primera estrategia de clonado en un vector de expresión para *T. brucei*, se obtuvieron colonias doble positivas, lo que estaría indicando tanto la presencia del gen de la TbTryS como su correcta orientación dentro del vector de expresión. Sin embargo, no fue posible recuperar plásmido a partir de estas colonias, planteándose dos posibles explicaciones: los amplicones obtenidos fueron falsos positivos producto de alguna amplificación inespecífica a partir del ADN de *E. coli* o la recuperación de ese plásmido tiene un rendimiento tan bajo que no fue posible cuantificarlo o detectarlo en el gel de agarosa teñido con intercalante de ADN, pero si detectarlo por PCR. Para descartar la primera hipótesis, sería conveniente secuenciar dichos productos, y confirmar su identidad. En la segunda estrategia, si bien a través de la mutagénesis sitio dirigida por el método del *megaprimer* fue posible mutar el sitio HindIII interno presente en el gen de la TbTryS, este no fue posible de clonar en el vector de expresión correspondiente. Si bien se confirmó que el sitio HindIII fue correctamente mutado (no se observaron fragmentos de pequeño tamaño en un gel de agarosa 1,5% donde se corrió el gen de la TbTryS digerido con HindIII – datos no mostrados), se concluye que la ausencia de colonias con la construcción pHD1700-TbTryS podría ser debido a una dificultad que presenta este, y otros genes de la familia, como GspS, para ser clonados dado en parte a su gran tamaño. De todas maneras, sería conveniente probar nuevas relaciones vector-inserto y optimizar las condiciones de ligación para favorecer la inserción de la TryS en el vector de expresión para *T. brucei*.

A través de ensayos de complementación metabólica otros investigadores verificaron la existencia de transportadores para el GSH (39). Los datos experimentales aquí mostrados revelan que GSH agregado al medio extracelular no es capaz de revertir el fenotipo de parásitos con un bajo contenido de la TryS, y por lo tanto de tripanotión. De esta manera se puede llegar a pensar que, aquellas enzimas que utilizan tripanotión, deben presentar un sitio activo muy específico, que permite acomodar bien a éste pero no al glutatión, explicando así por qué el GSH no es capaz de reemplazar sus funciones. Un ejemplo de enzima con especificidad por tripanotión y no GSH es la triparredoxina. Estudios cristalográficos de la proteína recombinante CfTXN demostraron que tanto la forma como la carga alrededor de su sitio activo permiten una interacción específica con el tripanotión. T(SH)<sub>2</sub> permanece en la superficie de la proteína, donde la segunda amina de la espermidina queda accesible al solvente pudiendo establecer así interacción de tipo electrostática con el Trp39 de la proteína. Por otro lado, ciertos residuos ácidos crean un parche cargado negativamente en la superficie de la proteína que atrae y termina uniendo a la molécula de tripanotión, la cual se encuentra cargada positivamente. Por último, las interacciones de Van der Waals son un componente importante en la unión del sustrato, donde la espermidina y la cisteína del tripanotión interaccionan con diferentes residuos de la TXN (por ej.: Trp39, Pro41, Ile109, etc) (49). En suma a esto, se encuentra el hecho de que los parásitos carecen

de glutatión reductasa (GR) (5,25), por lo tanto, por más que se suplemente con GSH, si no existe un sistema de regeneración de la forma reducida, la situación se vuelve insostenible.

Aparentemente, no estarían existiendo transportadores para tripanotión, ya que los parásitos carentes de TryS – y por lo tanto de T(SH)<sub>2</sub> – cultivados en medio suplementado con este ditiol no fueron capaces de revertir su deteriorado fenotipo. Es razonable pensar que no existan transportadores específicos para el tripanotión, ya que los tripanosomátidos son los únicos organismos conocidos hasta la fecha que utilizan este ditiol, por lo tanto serían incapaces de obtenerlo a partir del medio extracelular. Sin embargo, con estos resultados también se descarta la carencia de especificidad del transportador de GSH por T(SH)<sub>2</sub>. Un resultado positivo hubiese abierto la posibilidad para el desarrollo de drogas análogas a T(SH)<sub>2</sub> o pro-drogas asociadas a este que permitan un ataque selectivo de los tripanosomas por sobre las células del hospedero.

Por otro lado, fue posible determinar que la viabilidad de los parásitos, como era de esperar, se ve comprometida con el agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio. Los efectos observados son tanto dosis como tiempo dependientes, es decir, se observa una mayor tasa de muerte celular cuanto mayor es la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se administra y cuanto mayor el tiempo de exposición de los parásitos al mismo.

La exposición de los parásitos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la expresión de TryS y TR, la cual creemos, le asegura al parásito una mayor producción de T(SH)<sub>2</sub> y regeneración de su forma reducida para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo.

Se observó una sobreexpresión importante, entre 3-4 veces, de la TR luego de las 18 horas de exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Asimismo, se observó un efecto dosis dependiente en la inducción de la expresión, aumentando los niveles de TR cuanto mayor fue la concentración de peróxido a la que se expusieron los parásitos.

Por otro lado, los niveles de TryS aumentaron significativamente, entre 1-2 veces, únicamente luego de las 6 horas, sin observarse efectos dosis dependientes. Esto podría deberse a que, los sistemas que censan el estrés oxidativo y son capaces de inducir la expresión de TryS se activan con concentraciones bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que la sobreexpresión de dicha enzima podría resultar fundamental para la sobrevivencia de los parásitos incluso con concentraciones pequeñas del agente oxidante. Dado que la TryS es una proteína abundante en el parásito, y tal vez no sea la etapa limitante en la reacción de síntesis del ditiol. Probablemente luego de tiempos prolongados de exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no sea esencial seguir produciendo nuevo tripanotión, sino tratar de reducir el ya sintetizado para su reciclado; entrando en juego aquí la TR y explicando por qué los niveles de esta enzima si aumentan significativamente.

En general, es de destacar que frente a concentraciones bajas de oxidante, el parásito activaría en primer lugar la expresión de TryS, seguramente para asegurar un aumento en el pool de T(SH)<sub>2</sub>, para en una segunda fase sumar a esto el incremento en la capacidad

reductora o de regeneración del ditiol a través de la TR. Para confirmar este posible aumento de tripanotión, se deberán determinar los tioles de bajo peso molecular en extractos de parásitos desafiados con  $H_2O_2$  y compararlos frente a parásitos sin tratamiento.

En conclusión, fue posible determinar que la TryS de *T. brucei*, enzima esencial y abundante en el parásito, se expresa de forma constitutiva a lo largo de su ciclo de vida, presentando una localización citosólica, con una distribución predominantemente granular. Dicha enzima presenta una mayor preferencia por Gsp como sustrato que por Sp, asegurándole así al parásito una producción eficiente de  $T(SH)_2$  una vez que el Gsp es formado. Frente a un estrés oxidativo, los parásitos producirían dos tipos de mecanismos complementarios: en primer lugar elevar la expresión de TryS (y por consiguiente, seguramente  $T(SH)_2$ ) y en segunda instancia aumentar los niveles de TR, para asegurar la reducción de  $T(SH)_2$ .

## *Agradecimientos*

En primer lugar, agradecer a mis tutores Marcelo y Andrea por brindarme la oportunidad de realizar mi pasantía de grado junto a ellos. Por todo el conocimiento que me transmitieron, así como la paciencia, dedicación, motivación, confianza y desafío diarios.

A mis compañeros de laboratorio, Bruno y Cecilia, a los que más tarde se unirían Mariana y Luciana. Por hacer del día a día en el laboratorio una grata experiencia, estando siempre presentes dando una mano o consejo cuando los experimentos no salían.

A mis amigos, la familia que uno elige, que mantengo desde la escuela y liceo y los que he ido haciendo a lo largo de la carrera. Por acompañarme siempre, tanto en las buenas con sonrisas, como en las malas con buenos consejos y cariño constante.

Por último, pero no menos importante, a toda mi familia. Por ser el sostén y ánimo diario para seguir adelante, creyendo en “la primera científica de la familia”. Y muy especialmente a mi madre y hermana por estar siempre presentes, compartiendo y apoyándome en todas y cada una de las etapas de mi vida. Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes.

## Referencias

- 1 - Krauth-Siegel, L., Comini, M. 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*.
- 2 - Fairlamb, A., Cerami, A. 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the *Kinetoplastida*. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:695-729.
- 3 - Barret, M., Burchmore, R., Stich, A., Lazzari, J., Frasch, A., Cazzulo, J., Krishna, S. 2003. The trypanosomiasis. *The Lancet.* 362:1469-1480.
- 4 - De Souza, W. 1999. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(1):17-36.
- 5 - Gruszynski AE, DeMaster A, Hooper NM, Bangs JD. 2003. Surface coat remodeling during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Mol.* 278(27):24665-24672.
- 6 - De Souza, W. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104(1):89-100.
- 7 - Matthews, K. 2005. The developmentl cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Science.* 118(2): 283- 290.
- 8 - Vonlaufen, N., Kanzok, S., Wek, R., Sullivan Jr, W. 2008. Stress response in protozoan parasites. *Cell. Microbiol.* 10(12):2387-2399
- 9 - D' Silva, C., Daunes, S. 2002. The therapeutic potential of inhibitors of the trypanothione cycle. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 11(2):217-231.
- 10 - Irigoín, F., Cibils, L., Comini, M., Wilkinson, S., Flohé, L., Radi, R. 2008. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Rad. Biol. & Med.* 45:733-742.
- 11 - Imlay, J. 2003. Pathway of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:395-418.
- 12 - Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl. Microbiol.* 3:3-8.
- 13 - Fairlamb, A., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B., Cerami, A. 1985. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science.* 227:1485-1487.
- 14 - Oza, S., Shaw, M., Wyllie, S., Fairlamb, A. 2005. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139:107-116.

- 15 – Comini MA, Krauth-Siegel RL, Flohé L. 2007. Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *Biochem J.* 402(1):43-49.
- 16 - Castro, H., Tomás, A. 2008. Peroxidases of trypanosomatids. *Antiox. Redox Signaling.* 10(9):1-14.
- 17 – Avrahami D, Tzfati Y, Shlomai J. 1995. A single-stranded DNA binding protein binds the origin of replication of the duplex kinetoplast DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(23):10511-10515.
- 18 – Filser M, Comini MA, Molina-Navarro MM, Dirdjaja N, Herrero E, Krauth-Siegel RL. 2008. Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of *Trypanosoma brucei* monothiol glutaredoxin-1. *Biol Chem.* 389(1):21-32.
- 19 - Piñeyro MD, Parodi-Talice A, Portela M, Arias DG, Guerrero SA, Robello C. 2011. Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* Tryparedoxin 1. *J Proteomics.*
- 20 - Piacenza, L., Zago, M.P., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Basombrio, M.A., Radi, R. 2009. Enzymes of the antioxidante network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int. J. Parasitol.* 39:1455-1464.
- 21 - Schlecker T, Schmidt A, Dirdjaja N, Voncken F, Clayton C, Krauth-Siegel RL. 2005. Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 280(15):14385-14394.
- 22 - Wilkinson SR, Meyer DJ, Taylor MC, Bromley EV, Miles MA, Kelly JM. 2002. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J. Biol. Chem.* 277(19):17062-17071.
- 23- Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, Kelly JM. 2002. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(21):13453-13458.
- 24 - Steenkamp, D. 2002. Thiol Metabolism of trypanosomatids as potencial drug targets. *IUBMB.* 53:243-248.
- 25 – Fairlamb, A., Cerami, A. 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the *Kinetoplastida*. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:695-729
- 26 - Vickers TJ, Fairlamb AH. 2004. Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. *J. Biol. Chem.* 279(26):27246-27256.

- 27 – Taylor MC, Kaur H, Blessington B, Kelly JM, Wilkinson SR. 2008. Validation of spermidine synthase as a drug target in African trypanosomes. *Biochem J.* 409(2):563-9.
- 28 - Comini, M., Menge, U., Wissing, J., Flohé, L. 2004. Trypanothione synthesis in *Crithidia* revisited. *J. Biol. Chem.* 280(8):6850-6860.
- 29 - Fyfe, P., Oza, S., Fairlamb, A., Hunter, W. 2008. *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *J. Biol.Chem.* 283(25): 17672-17680.
- 30 - Balaña-Fouce, R., Reguera, R. 2007. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids? *Trends Parasitol.* 23(8): 348-351.
- 31 - Ullu, E., Tschudi, C., Chakraborty, T. 2004. RNA interference in protozoan parasites. *Cell. Microbiol.* 6(6):509-519.
- 32 - Ullu, E., Djikeng, A., Shi, H., Tschudi. C. 2002. RNA interference: advances and questions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 357:65-70.
- 33 - Comini, M., Guerrero, S., Haile, S., Mange, U., Lünsdorf, H., Flohé, L. 2004. Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radical Biol. & Med.* 36(10):1289-1302.
- 34 - Comini, M., Dirdjaja, N., Kaschel, M., Krauth-Siegel, L. 2009. Preparative enzymatic synthesis of trypanothione and trypanothione analogues. *IJP* 39:1059-1062.
- 35 - Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1):76-85.
- 36 – Ellman, GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82(1):70-77.
- 37 – Hunter KJ, Le Quesne SA, Fairlamb AH. 1994. Identification and biosynthesis of N<sup>1</sup>,N<sup>9</sup>-bis(glutathionyl)aminopropylcadaverine (homotrypanothione) in *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 226(3):1019-27.
- 38 - Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, Misset O. 1984. Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* 98(4):1178-1184.
- 39 - Huynh TT, Huynh VT, Harmon MA, Phillips MA. 2003. Gene knockdown of gamma-glutamylcysteine synthetase by RNAi in the parasitic protozoa *Trypanosoma brucei* demonstrates that it is an essential enzyme. *J. Biol. Chem.* 278(41):39794-39800.

- 40 – Tyagi R, Lai R, Duggleby RG. 2004. A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BMC Biotechnol.* 4:2.
- 41 - Comini, M., Menge, U., Flohé, L. 2003. Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol. Chem.* 384:653-656.
- 42 - Wyllie, S., Oza, S., Patterson, S., Spinks, D., Thompson, S., Fairlamb, A. 2009. Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. *Mol. Microbiol.*
- 43 - Oza SL, Ariyanayagam MR, Aitcheson N, Fairlamb AH. 2003. Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 131(1):25-33.
- 44 - Fairlamb, A., Henderson, G. Cerami, A. 1986. The biosynthesis of trypanothione and N<sup>1</sup>-glutathionylspermidine in *Crithidia fasciculata*. *Mol. and Biochem. Parasitology.* 21:247-257.
- 45 - Bailey S, Smith K, Fairlamb AH, Hunter WN. 1993. Substrate interactions between trypanothione reductase and N<sup>1</sup>-glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution. *Eur J Biochem.* 213(1):67-75.
- 46 - Pai CH, Chiang BY, Ko TP, Chou CC, Chong CM, Yen FJ, Chen S, Coward JK, Wang AH, Lin CH. 2006. Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase. *EMBO J.* 25(24):5970-82.
- 47 - Oza, S., Tetaud, E., Ariyanayagam, M., Warnon, S., Fairlamb, A. 2002. A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 277(39): 35853-35861.
- 48 - Ariyanayagam, M., Oza, S., Guther, M., Fairlamb, A. 2005. Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. *Biochem J.* 391:425-432
- 49 - Alphey MS, Leonard GA, Gourley DG, Tetaud E, Fairlamb AH, Hunter WN. 1999. The high resolution crystal structure of recombinant *Crithidia fasciculata* trypanothione reductase. *J Biol Chem.* 274(36):25613-25622.
- 50 - Fairlamb, A. 2003. Target discovery and validation with special reference to trypanothione. *Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues.* Section III
- 51 - Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam M., Fairlamb A., Krauth-Siegel L., Clayton, C. 2000. Trypanosome lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol. Microbiol.* 35(3):542-552.
- 52 - Krauth-Siegel, L., Enders, B., Henderson, G., Fairlamb, A., Schirmer, R. 1987. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 164:123-128.

- 53 - Fairlamb, A, 2003. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trend in Parasitol.* 19(11): 488-494.
- 54 - Krauth-Siegel, L., Bauer, H., Schirmer, H. 2005. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in Trypanosomes and malaria-causing Plasmodia. *Angew. Chem. Int.* 44:690-715.
- 55 - Field, M., Allen, C., Dhir, V., Goulding, D., Hall, B., Morgan, G., Veazey, P., Engstler, M. 2003. New approaches to the microscopic imaging of *Trypanosoma brucei*. *Microsc. Microanal.* 10:621-636.
- 56 - Kwon, D., Lin C., Chen, S., Cowards, J. 1997. Dissection of glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Escherichia coli* into autonomously folding and functional synthetase and amidase domains. *J. Biochem. Chem.* 272(77): 1-8
- 57 - Motyka, S., Englund, P. 2004. RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Curr. Opin Microbiol.* 7:362-368.
- 58 - Tschudi, C., Djikeng, A., Shi, H., Ullu, E. 2003. In vivo analysis of the RNA interference mechanism in *Trypanosoma brucei*. *Methods.* 30:304-312.
- 59- Tataud, E., Manai, F., Barret, M., Nadeau, K., Walsh, C., Fairlamb, A. 1996. Cloning and characterization of two enzymes responsible for trypanothione biosynthesis in *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* 273(31): 19383-19390.
- 60- Smith, K., Nadeau, K., Bradley, M., Walsh, C., Fairlamb, A. 1992. Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. *Prot. Science.* 1:874-883.
- 61- Chiang, B., Chen, T., Pai, C., Chi-Chi, C., Chen, H., Ko, T., Hsu, W., Chang, C., Wu, W., Wang, A., Lin, C. 2010. Protein S-thiolation by glutathionylspermidine (Gsp) the role of *Escherichia coli* Gsp synthetase/amidase in redox regulation. *J. Biol. Chem.* 285(33):25345-25353.
- 62- Oza, S., Ariyanayagam M., Fairlamb, A. 2002. Characterization of recombinant glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Crithidia fasciculata*. *Biochem. J.* 364:679-686

# Anexo

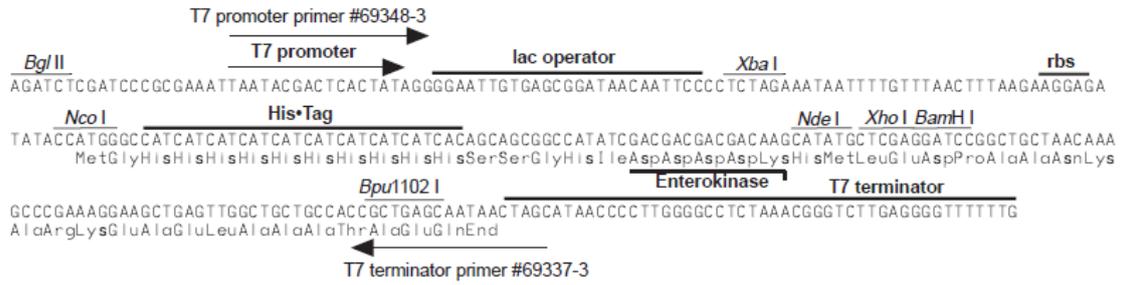


Figura 23. Región de clonado/expresión del vector pET19b.

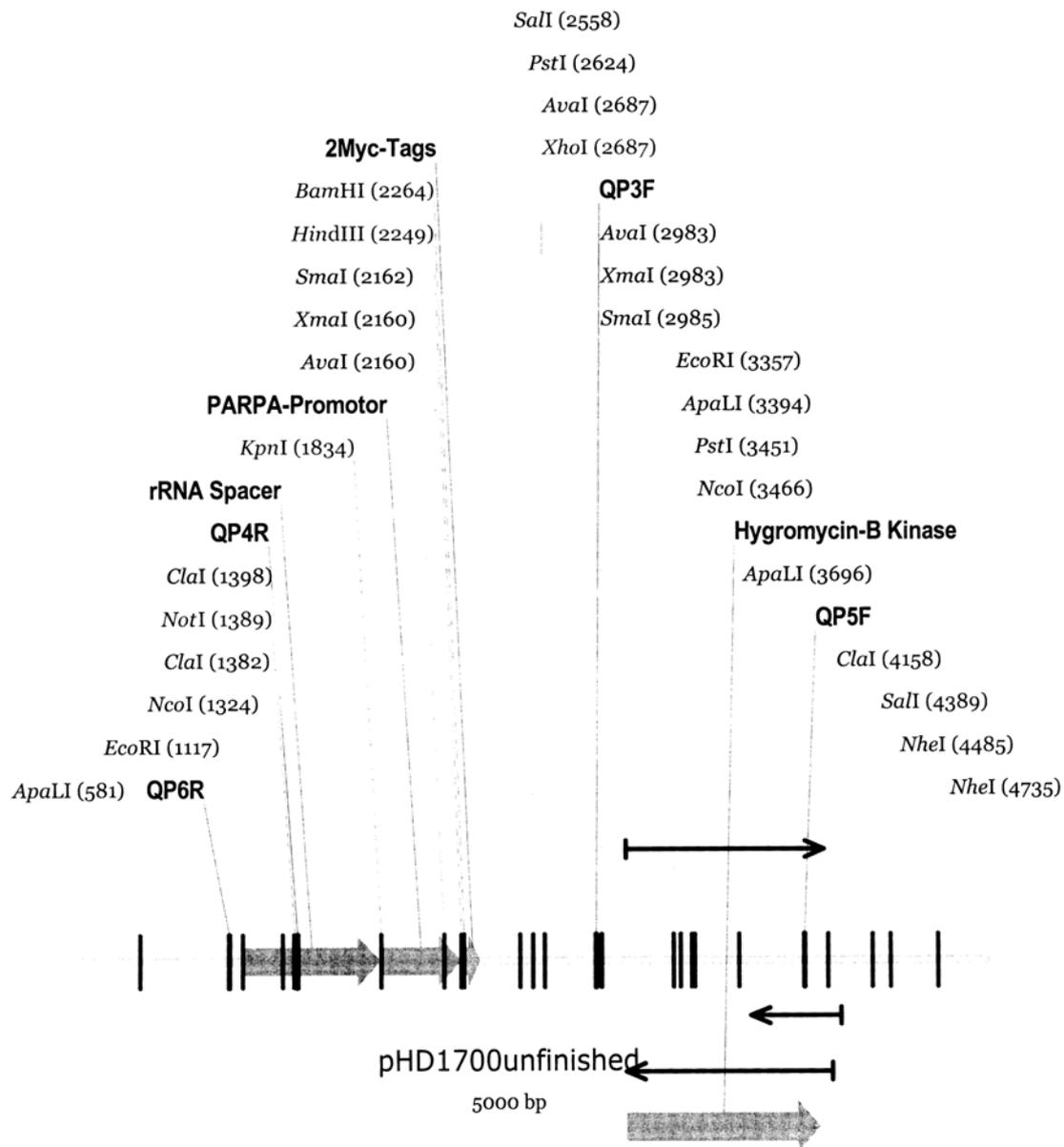


Figura 24. Esquema del sitio de clonado/expresión del plásmido pHD1700

```

+1
1  ATGACGAAGT CGGCACTTGC AGACACTAAA GAAGAACCTC ACGTTCCTT
   TACTGCTTCA GCCGTGAACG TCTGTGATTT CTTCTTGGAG TGCAAGGGAA
+1
51  TGGTGAGATT CAGGGCTACA CCCCTTGTGG CGTACCTGCT TACAGCAACG
   ACCACTCTAA GTCCCGATGT GGGGAACACC GCATGGACGA ATGTCGTTGC
+1
101 GACATGATGG CTTTTTTTCG GGAGAGCGCA GTATTGACGG GAATCTTTTC
   CTGTACTACC GAAAAAAGC CCTCTCGCGT CATAACTGCC CTTAGAAAAG
+1
151 TGCGGTTTCA AATACCAATG TGTAGAATTT GCTCGTCGTT GGTATATATGA
   ACGCCAAAGT TTATGGTTAC ACATCTTAAA CGAGCAGCAA CCAATATACT
+1
201 GGCCAAAGGG CTTGTTCTTC CAGACGTAA TTGGGCTGCT CACATATTTG
   CCGGTTTCCC GAACAAGAAG GTCTGCAATT AACCCGACGA GTGTATAAAC
+1
251 ATCTAACAGA GGTTCATGAC GCAAGCACTG CAACCCCGT CCCGTGCGTT
   TAGATTGTCT CCAAGTACTG CGTTCGTGAC GTTGGGGGCA GGGCACGCAA
+1
301 AAAGTTTCCA ACGGAACAGC AGCGAAGCCC GTGGCAGATT CGTTGCTGAT
   TTTCAAAGGT TGCCTTGTCG TCGCTTCGGG CACCGTCTAA GCAACGACTA
                                     NcoI
                                     ~~~~~~
+1
351 TTACGCCGTT AATGAGGATG CGCCATGGGG ACATGTTGCG GTTATTACAG
   AATGCGGCAA TTA CTCTAC GCGGTACCC TGTACAACGC CAATAATGTC
+1
401 AGGTGGGTGA CAAATGGGTG CGCATTGCGG ACCAAAACCA TCGGTTTCAT
   TCCACCCACT GTTTACCCAC GCGTAACGCC TGGTTTTGGT AGCCAAAGTA
+1
451 AAGTGAAGG GGACCTACTC GGCAGAGTTG TTGCTGAAGC ACGAAGGAGG
   TTCACCTTCC CCTGGATGAG CCGTCTCAAC AACGACTTCG TGCTTCTTCC
+1
501 TGTGTGGACT GTTGAGGATC ATGCAGCAGA GGAATCTTT GTTCCTCTGG
   ACACACCTGA CAACTCCTAG TACGTCTCTT CCCTTAGAAA CAAGGAGACC
+1
551 GGTGGGTTAC ATTCCCTAGT AGGCCAAACC GTAATCCTAA GGAGCCATTG
   CCACCCAATG TAAGGGATCA TCCGGTTTGG CATTAGGATT CCTCGGTAAC
+1
601 GTGTTGCATG AGTCACTTTA CTTTAAACAA CCAGAGAAGC CTTTCCTTCG
   CACAACGTAC TCAGTGAAT GAAATTTGTT GGTCTCTTCG GAAAGGAAGC
+1
651 TCGCGTTGTT TTA CTCTCCAG AGAATCGAAA GACTGACTGG CTGGACTTGA
   AGCGCAACAA AAGTGAGGTC TCTTAGCTTT CTGACTGACC GACCTGAAC

```

```

                                     EcoRI
                                     ~~~~~
+1
701  CAAACGAAGC CGAAGCGGAA TTCTACAAA CATTGGTAA GGAGGCGACT
     GTTTGCTTCG GCTTCGCCTT AAGATGTTTT GTAAACCATT CCTCCGCTGA
-----
XhoI
~~~~~
AvaI
~~~~~
+1
751  CGAGGAGGGG TGTACGAATC ATGTTACTAT TTGATGAACA GGGAGTTGTA
     GCTCCTCCCC ACATGCTTAG TACAATGATA AACTACTTGT CCCTCAACAT
-----
                                     XhoI
                                     ~~~~~
                                     AvaI
                                     ~~~~~
+1
801  CCTTAACTGC GTCCGTTACG GTACGCAGCT GCATTCATTC TTTCTCGAGG
     GGAATTGACG CAGGCAATGC CATGCGTCGA CGTAAGTAAG AAAGAGCTCC
-----
+1
851  CAACAAAGCA GGTGCTTGAG AGCGACGATA AGTTACGTCG ATTTTCGCATC
     GTTGTTCGT  CCACGAATC  TCGCTGCTAT  TCAATGCAGC  TAAAGCGTAG
-----
+1
901  CCAGAAGAGT ATTGGCCTCG CATCCGGCAC TCATGGAAAA CTCAGCCCCA
     GGTCTTCTCA TAACCGGAGC GTAGGCCGTG AGTACCTTTT GAGTCGGGGT
-----
                                     EcoRI
                                     ~~~~~
+1
951  TGCCATCACG GGGCGGTTTG ACTTTGTTTT TGATGAAAAC ACTCAAGAAT
     ACGGTAGTGC CCCGCCAAAC TGAAACAAAA ACTACTTTTG TGAGTTCTTA
-----
EcoRI
~~~~~
Sall
~~~~~
+1
1001 TCAAGTGCTT TGAATACAAT GCGGACAGCG CGTCGACACT TCTGGAATGT
     AGTTCACGAA ACTTATGTTA CGCCTGTCGC GCAGCTGTGA AGACCTTACA
-----
+1
1051 GCTGTAATCC AAGAGAAGTG GGCAAATCC GTTGGGTTAG ACGACAATGC
     CGACATTAGG TTCTCTTCAC CCGTTTGAGG CAACCCAATC TGCTGTTACG
     ←
-1
-----
+1
1101 TACAAGAAGC AGCGGGAAAT TCATGCCCCA AACACTCGTT CGGGCGTGGG
     ATGTTCTTCG TCGCCCTTTA AGTACGGGGT TTGTGAGCAA GCCCGCACCC
-1
-----
+1
1151 AAATGACGGG GTTGAAGGGG CGTGTGCATT TTCTTGTGGA CGACGACGGG
     TTTACTGCCC CAACTTCCCC GCACACGTAA AAGAACACCT GCTGCTGCCC
-1
-----
                                     XhoI
                                     ~~~~~
                                     AvaI
                                     ~~~~~
+1
1201 GAGGAACGTT AFACTGCTTT GTATGTGATG GAGAAGGCTC GAGAGGCTGG
     CTCCTTGCAA TATGACGAAA CATACTACTC CTCTTCCGAG CTCTCCGACC
-----

```

```

+1
1251 TATTGACGCG AAATTGTGCG TCATGTTTGA CGAGTTCAT TTCGATGAAA
ATAACTGCGC TTAAACACGC AGTACAAACT GCTCAAGGTA AAGCTACTTT
-1
+1
1301 AGGGAGCAGT TGTGGATTCG GACGGCATTG CGGCGACGGC TGTGTGGAAG
TCCCTCGTCA ACACCTAAGC CTGCCGTAAG GCCGCTGCCG ACACACCTTC
-1
+1
1351 ACGTGGATGT GGGAGACGGC GATCTCTGAT CATCAAGCTG CACGAGAGCA
TGCACCTACA CCCTCTGCCG CTAGAGACTA GTAGTTCGAC GTGCTCTCGT
-1
+1
1401 GCGTGGCGCG GAGTGAAGC CCACGCCAAA GGATAAGGTT CGCCTGTGTG
CGCACCGCGC CTCACCTTCG GGTGCGGTTT CCTATTCCAA GCGGACACAC
-1
+1
1451 ATATCTTCTT CGGAAATAAC TGGGACGTAC GTGTCTTTGA GCCTATGTGG
TATAAGAAGA GCCTTTATTT ACCCTGCATG CACAGAAACT CGGATACACC
-1
+1
1501 AAATCATTC CCAGCAACAA AGCAATATTG CCCATTATTT ATAACAATCA
TTGAGTAAG GGTCGTTGTT TCGTTATAAC GGGTAATAAA TATTGTTAGT
-1
+1
1551 CCCCACCAC CCCGCCATAC TTCCCACAAG TTATGAACTC ACTGATGAGC
GGGGCTGGTG GGGCGGTATG AAGGGCGTTC AATACTTGAG TGACTACTCG
-1
+1
1601 TTCGCCGCAC CGGCTATGCA AAGAAGCCCA TCGTTGGCCG TGTAGGAAGG
AAGCGGCGTG GCCGATACGT TTCTTCGGGT AGCAACCGGC ACATCCTTCC
+1
1651 AATGTGACCG TCACTGAACC TGACGGCAA A GTTCTAGCTG AGTCTGATGG
TTACACTGGC AGTGACTTGG ACTGCCGTTT CAAGATCGAC TCAGACTACC
+1
1701 CAACTTCAGT AACCGTGATA TGGTGTATCA ACAACTTTTC CGCATACCAA
GTTGAAGTCA TTGGCACTAT ACCACATAGT TGTTGAAAAG GCGTATGGTT
Aval
~~~~~
+1
1751 AGCGAGGCGA TTA CTACGCA ATTCTCGGGG GCTGGATGCT CGGTGACACC
TCGCTCCGCT AATGATGCGT TAAGAGCCCC CGACCTACGA GCCACTGTGG
HindIII
~~~~~
+1
1801 TACAGTGGTA CAGGTGTACG TGAGGACAAA AAGCTTACCA CTGGGCTCGA
ATGTCACCAT GTCCACATGC ACTCCTGTTT TTCGAATGGT GACCCGAGCT
+1
1851 ATCTCCGTTT GGTCCCGTAC GTATTCAAAT GTAG
TAGAGGCAAA CCAGGGCATG CATAAGTTTA CATC

```

**Figura 25. Secuencia nucleotídica del gen de la TbTrys** (código de acceso Tb927.2.4370) obtenida de la base de datos TryTripDB<sup>®</sup> (<http://tritrypdb.org/>). En línea ondulada se marcan los diferentes sitios de restricción presentes en el gen