

***Trypanosoma brucei* SepSecS KO:  
infección y respuesta al estrés  
oxidativo**

***Erika Krul***

***Tesina de grado***

***Tutor: Marcelo Comini***

***Co-tutor: Gustavo Salinas***

***Licenciatura en Biología***

***Facultad de Ciencias***

***Universidad de la República***

# Esquema del trabajo

<b>1. Introducción .....</b>	<b>4</b>
1.1. Tripanosomátidos. Generalidades.....	4
1.2. Etapas del ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i> .....	5
1.3. Tripanosomiasis africana humana.....	7
1.4. Características ultraestructurales y bioquímicas distintivas de Tripanosomátidos...9	
1.5. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por <i>T. brucei</i> .....	12
1.6. Modelo murino de infección experimental.....	14
1.7. Selenoproteínas y Selenocisteína.....	15
1.7.1. Selenocisteína.....	15
1.7.2. Vía de incorporación de Sec.....	16
1.7.3. Vía de síntesis de Sec.....	17
1.7.4. Selenoproteínas y selenoproteomas.....	18
1.7.5. Selenoproteínas en Tripanosomátidos.....	19
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo general.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
<b>3. Antecedentes .....</b>	<b>21</b>
<b>4. Materiales y Métodos.....</b>	<b>24</b>
4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	24
4.2. Determinación de la densidad celular.....	24
4.3. Determinación de la curva de crecimiento y tasa de duplicación celular.....	26
4.4. Tratamiento de parásitos con peróxido de hidrógeno.....	26
4.5. Infección de ratones.....	27
4.6. Producción recombinante de SelTryp.....	28
4.7. Inducción de la expresión de SelTryp.....	31
4.8. Purificación de SelTryp en condiciones desnaturalizantes.....	32
4.9. Renaturalización de SelTryp.....	33
4.10. Purificación de SelTryp por cromatografía de afinidad por metales.....	34
4.11. Análisis por SDS-PAGE.....	36
4.12. Cuantificación de proteínas: determinación de proteína total en los eluatos....	36
4.13. Diafiltración de la SelTryp recombinante de <i>T. cruzi</i> .....	37
4.14. Cromatografía de exclusión molecular para SelTryp de <i>T. cruzi</i> .....	37

<b>5. Resultados y Discusión.....</b>	<b>38</b>
5.1. Curva de crecimiento y tasa de duplicación de línea SepSecS KO de <i>T. brucei</i> .....	38
5.2. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la proliferación de la línea SepSecS KO de <i>T. brucei</i> .....	39
5.3. Capacidad infectiva de <i>T. brucei</i> defectivo en síntesis de Sec.....	46
5.4. Producción de SelTryp en <i>Escherichia coli</i> cepa SH y BL21.....	50
5.5. Solubilidad de SelTryp en <i>E. coli</i> BL21 DE3 a 37°C.....	51
5.6. Comparación de la producción de SelTryp en <i>E. coli</i> BL21 DE3 a 16 y 37 °C.....	52
5.7. Purificación de SelTryp de cuerpos de inclusión y renaturalización por diálisis.....	53
5.8. Identificación del factor solubilizante de SelTryp.....	53
5.9. Purificación de SelTryp por cromatografía de afinidad por metales.....	54
5.10. Determinación de la conformación oligomérica de la forma recombinante de SelTryp de <i>T. cruzi</i> .....	55
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>59</b>
<b>7. Agradecimientos.....</b>	<b>60</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>61</b>
<b>9. Apéndices.....</b>	<b>67</b>

# 1. Introducción

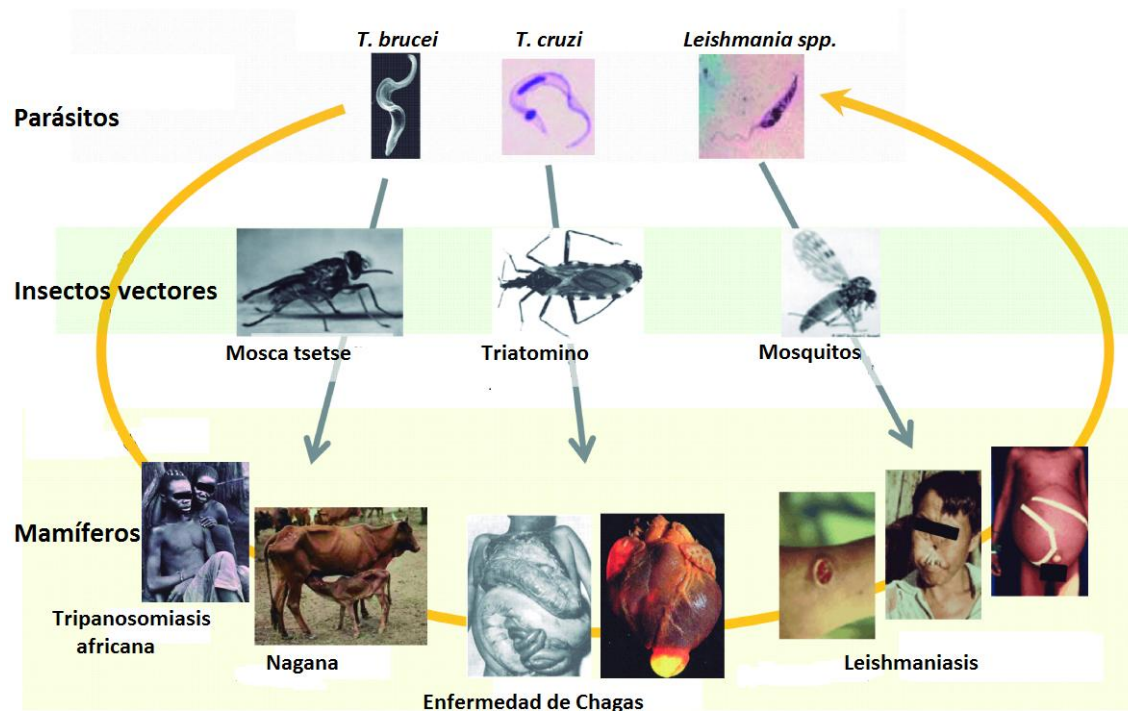
## 1.1. Tripanosomátidos. Generalidades

Los tripanosomátidos son organismos unicelulares monoflagelados pertenecientes al filo *Euglenozoa*, uno de los linajes más antiguos en la evolución de los eucariotas que divergió luego de adquirir mitocondrias. Esta familia de protozoarios incluye especies heterótrofas obligadas capaces de sobrevivir en vida libre o bien parasitando una gran diversidad de organismos vertebrados e invertebrados (Simpson *et al.* 2006).

Los miembros de esta familia de protozoarios comparten características bioquímicas y subcelulares únicas, tales como la particular organización del ADN mitocondrial, denominado kinetoplasto (Hammarton 2007), la compartimentalización de gran parte de la vía glicolítica en un organelo tipo peroxisoma, llamado glicosoma, y el metabolismo redox dependiente de tioles, basado en el ditiol de bajo peso molecular tripanotión ( $N^1, N^8$  bis-glutationil espermidina; ver sección 1.4.1.) (Manta *et al.* 2013).

Los especímenes más relevantes para la salud humana y animal pertenecen a dos géneros: *Trypanosoma* y *Leishmania*, responsables de la muerte de cerca de medio millón de personas en regiones (sub)tropicales del mundo. En países dentro de la región subsahariana del continente Africano, *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense* son los agentes causantes de la tripanosomiasis humana conocida con el nombre de “enfermedad del sueño”. En América, *T. cruzi* es responsable de la enfermedad de Chagas mientras que diferentes especies de *Leishmania* son endémicas en distintas regiones tropicales y subtropicales del mundo donde producen distintos tipos de enfermedades, algunas de ellas conocidas con el nombre de fiebre negra, espundia, úlcera oriental y Kala-Azar (Manta *et al.* 2012) Fig.1 . Las infecciones de ganado, conocida como la enfermedad de Nagana, son provocadas por *T. brucei brucei*, *T. vivax* y *T. congolense*.

Al tratarse de zoonosis, la distribución geográfica de estas enfermedades está fuertemente determinada por la que presentan sus vectores transmisores. Por ejemplo, *T. brucei* y *T. cruzi* son organismos que están principalmente confinados a África, y América y Oceanía, respectivamente (Manta *et al.* 2012).



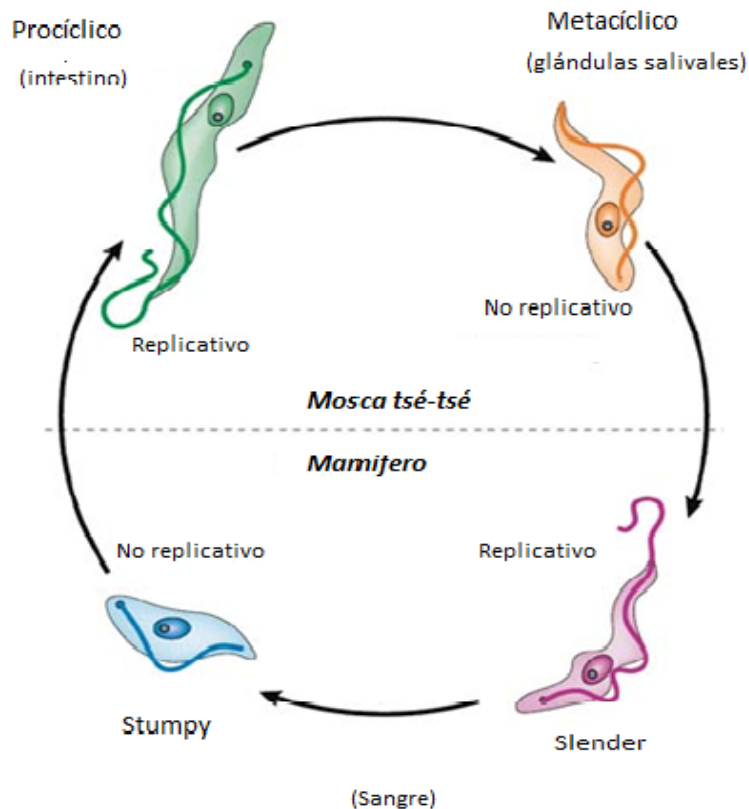
**Fig. 1. Ciclo de vida y enfermedades causadas por tripanosomátidos.** El ciclo de vida natural consiste en la transmisión por artrópodos específicos, insectos vectores. Dentro del hospedero las distintas especies de tripanosomátidos presentan tropismo por determinados tejidos, órganos o sistemas ocasionando patologías características. *T. brucei* reside en la sangre y en el líquido cerebroespinal del mamífero. *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* ocasionan la Tripanosomiasis africana, más conocida como enfermedad del sueño en humanos mientras que *T. b. brucei* provoca Nagana en el ganado. *T. cruzi* invade la dermis y mucosa, para finalmente localizarse de manera crónica en células de órganos internos como el corazón y el sistema digestivo, produciendo la enfermedad de Chagas. Distintas especies de *Leishmania* tienen tropismo por diferentes órganos o tejidos, por ejemplo *L. infantum* y *L. donovani* generan la leishmaniasis visceral; *L. major* y *L. amazonensis* ocasionan leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Las enfermedades ocasionadas por estos parásitos son fatales cuando comprometen funciones vitales y no son tratadas (Manta *et al.* 2012).

## 1.2. Etapas del ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*

Los tripanosomas parásitos del complejo “brucei” son transmitidos entre sus hospederos mamíferos por un insecto hematófago, la mosca *tsé-tsé*. Otras formas de transmisión lo son la transfusión sanguínea, el uso de instrumental médico contaminado (por ej. agujas) o la vía congénita (Matthews *et al.* 2004)

Durante su ciclo de vida digenético, el parásito atraviesa diferentes estadios que conllevan numerosos y drásticos cambios a nivel morfológico y bioquímico, todos ellos necesarios para adaptarse y sobrevivir a las condiciones que le ofrecen los distintos organismos que es capaz de colonizar (Matthews 1999).

El ciclo se inicia cuando parásitos infectivos no replicativos (estadio metacíclico), residentes en las glándulas salivales de moscas *tsé-tsé* infectadas, son introducidos mecánicamente en el hospedero mamífero a través de la picadura del insecto. Una vez en el torrente sanguíneo, el parásito se diferencia a la forma tripomastigota *long slender*, la cual constituye un estadio replicativo infectivo. Durante el transcurso de la infección parte de la población *long slender* se transforma al estadio no replicativo sanguíneo denominado *short stumpy*. Esta diferenciación se ha visto que está mediada por factores autócrinos del parásito y del sistema de defensa del hospedador (Comini *et al.* 2011). Durante la infección suele co-existir una población pleomórfica de *T. brucei* constituida por formas, mayoritariamente, *long slender* y *short stumpy*, esta última alcanzando una densidad máxima de manera posterior a cada nuevo pico de parasitemia (ver sección 1.4.2.) (Vickerman 1985). Además del arresto en el ciclo celular, la transición de *long slender* a *short stumpy* se acompaña de cambios morfológicos (por ej. inicio de la maduración de la mitocondria) y bioquímicos (por ej. re-activación de la expresión de citocromos y enzimas del ciclo de ácidos tricarbóxicos) que le confieren al estadio *short stumpy* capacidad para sobrevivir en el aparato digestivo del insecto hasta que en este ambiente tenga lugar su diferenciación a la forma procíclica o epimastigota, la cual es replicativa pero no infectiva para mamíferos (Comini *et al.* 2011). Parásitos de la forma procíclica proliferan en el intestino del vector y migrarán luego hacia las glándulas salivales donde se diferenciarán a tripomastigotas metacíclicos, los cuales no se dividen y son altamente infectivos para mamíferos. El ciclo se cierra cuando el vector se alimenta en un hospedero mamífero inoculando la forma infectiva de *T. brucei* (Barry & McCulloch 2001), ver Fig. 2.



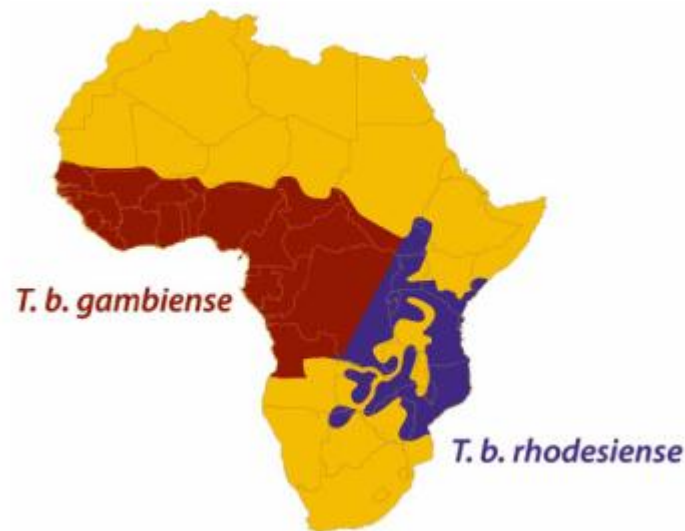
**Fig. 2. Esquema condensado del ciclo de vida de *T. brucei*.** En la parte superior se muestran las etapas que suceden dentro del insecto vector, la mosca *tsé-tsé*, y en la parte inferior aquellas que ocurren dentro de huésped mamífero (Lee *et al.* 2007).

### 1.3. Tripanosomiasis Africana Humana

La enfermedad causada por *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* presenta dos etapas, una aguda y otra tipo crónica. Luego de la infección, los parásitos proliferan en el sitio de ingreso conduciendo a la formación de una úlcera y a la inflamación de los nódulos linfáticos adyacentes, manifestaciones que remiten luego de 3-4 semanas. A continuación, los parásitos alojados en ganglios linfáticos invaden el torrente sanguíneo, iniciándose así la etapa hemolinfática (fase aguda) de la enfermedad. Generalmente la enfermedad no es diagnosticada en esta etapa ya que los signos y síntomas son inespecíficos (por ej. cefalea y fiebre). En la segunda fase de la enfermedad, etapa neurológica o crónica, los parásitos atraviesan la barrera hematoencefálica (Comini *et al.* 2011). Dependiendo de la subespecie, la invasión del sistema nervioso central puede ocurrir desde algunas semanas o hasta incluso meses a años posteriores a la infección con *T. b. rhodesiense* o *T. b. gambiense*, respectivamente, y en algunos casos es acompañada de una marcada inmunosupresión. La progresiva afectación del sistema nervioso conlleva a migraña severa, desórdenes del sueño y del

comportamiento y parálisis. El desenlace durante esta etapa de la enfermedad es fatal en caso de no administrarse tratamiento (Barret *et al.* 2003).

Tal como se mencionó anteriormente, parásitos pertenecientes al complejo “brucei” son transmitidos a los seres humanos y animales por la mosca *tsé-tsé*, un insecto perteneciente al género *Glossina* (orden *Diptera*). El vector reside casi de manera exclusiva en 36 países de una región comprendida entre el sur del Sahara y el norte del desierto de Kalahari, lo cual explica la discreta distribución geográfica de estas enfermedades (ver Fig. 3) (Jacobs *et al.* 2011). Por otro lado, *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* son endémicos de la región occidental y oriental del continente africano, respectivamente, debido a que las subespecies de *Glossina* involucradas en su transmisión están confinadas a dichas regiones (DNDi 2013).



**Fig. 3. Distribución geográfica de las subespecies de *T. brucei* causantes de tripanosomiasis humana.** La enfermedad del sueño es endémica en países de la región tropical y central de África. La distribución de *T. b. gambiense* se muestra en rojo y la de *T. b. rhodesiense* en azul (Lopes *et al.* 2010).

Se estima que la población en riesgo asciende a alrededor de 60 millones (Organización Mundial de la Salud 2012). Según datos actuales de la OMS, como consecuencia de continuos esfuerzos de vigilancia, diagnóstico y tratamiento, el número de nuevos casos reportados en 2009 ha sido menor a 10.000 (9.878) por primera vez en 50 años; esta tendencia se repitió en 2010 con 7.139 nuevos casos. El número estimado de casos actuales totales es 300.000, produciéndose 48.000 decesos por año (Cavalli & Bolognesi 2009).



#### 1.4. Características ultraestructurales y bioquímicas distintivas de tripanosomátidos

Los tripanosomátidos presentan numerosas características que los distinguen de otros grupos de eucariotas, entre ellas la presencia de: i) una única mitocondria por célula, ii) el empaquetamiento del ADN mitocondrial en una estructura discoide altamente condensada (kinetoplasto), iii) la edición completa del ARN mitocondrial, iv) la transcripción policistónica de todos los genes codificantes con *trans-splicing* de los ARN mensajeros, v) la compartimentalización de gran parte de la vía glicolítica en organelos evolutivamente relacionados a los peroxisomas, los glicosomas, vi) el metabolismo redox dependiente de tioles y vii) el mecanismo de evasión del sistema humoral del hospedero mediante recambio frecuente de las glicoproteínas de superficie (Podlipaev 2001). En la Fig. 4 se indican los organelos y estructuras subcelulares más destacadas en *T. brucei*. Algunas de las características estructurales y funcionales más importantes se describen a continuación.

La morfología es vermiforme, propiedad adquirida por la disposición particular de un grupo de microtúbulos del citoesqueleto, los microtúbulos subpeliculares (Ilgoutz & McConville 2001), los cuales están firmemente unidos a la superficie interna de la membrana celular y se distribuyen en todo el cuerpo celular exceptuando el bolsillo flagelar (Nakayasu *et al.* 2009).

El flagelo presenta el típico arreglo de 9 pares de microtúbulos periféricos y 2 microtúbulos centrales, donde el axonema se ancla a la membrana celular por una estructura fibrilar denominada barra paraflagelar (Portman & Gull 2010). Esta estructura está formada por una compleja matriz de filamentos que es característica de y esencial para la supervivencia de los tripanosomátidos. La membrana flagelar, el bolsillo flagelar y la membrana pelicular son morfológicamente, químicamente y funcionalmente diferentes y tienen diversas funciones biológicas, sin embargo están conectadas físicamente y forman parte de la membrana plasmática (Landfear & Ignatushchenko 2001). El flagelo de los tripanosomátidos es fundamental en la movilidad celular, así como también en la interacción parásito-hospedero, morfogénesis celular, división celular y evasión de la respuesta inmune (Ralston *et al.* 2009).

El bolsillo flagelar es el único sitio donde tiene lugar la endocitosis y secreción de moléculas en tripanosomátidos. Dicho proceso es imprescindible para eliminar complejos de glicoproteínas e inmunoglobulinas de la superficie celular, lo cual contribuye a la evasión de la respuesta inmune del hospedero y a la persistencia de la infección (Lopes *et al.* 2010). Estudios recientes con mutantes de *T. brucei* deficientes

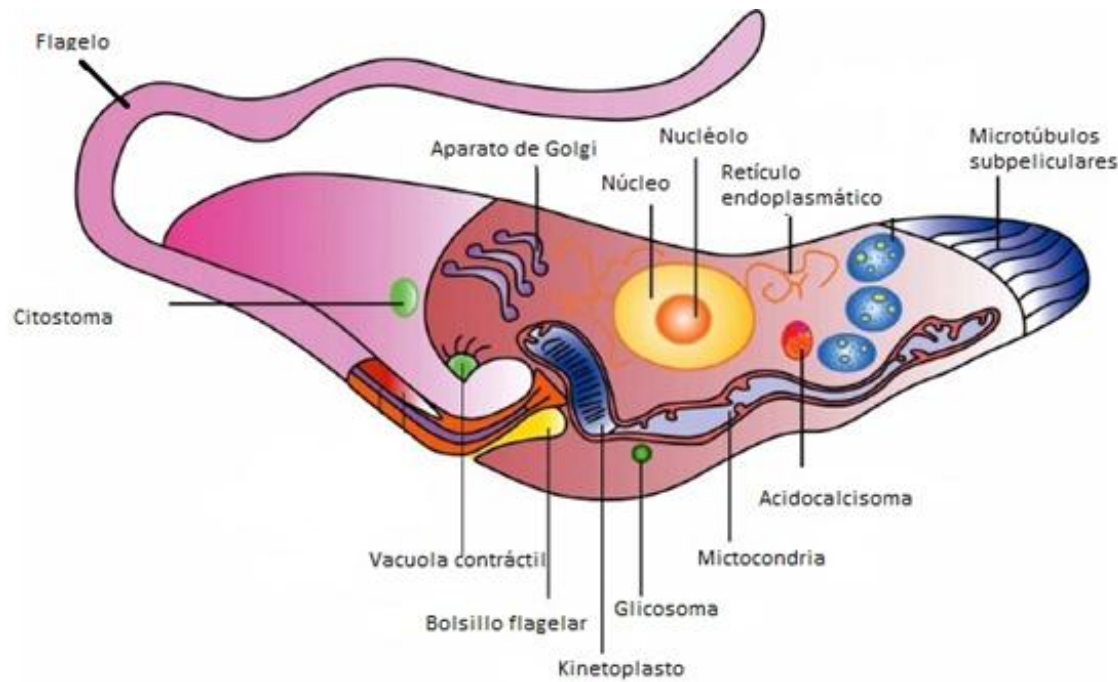
en movimiento flagelar corroboraron la importancia de la motilidad para la endocitosis y la sobrevivencia del parásito en el huésped mamífero (Engstler 2007).

Los acidocalcisomas son organelos ricos en calcio y polifosfato, descritos en tripanosomátidos pero también presentes en otros organismos (Docampo *et al.* 1995). Diversas funciones han sido atribuidas a estos organelos, pero las más importantes están relacionadas a la regulación de la presión osmótica intracelular y el almacenamiento de cationes (Vercesi *et al.* 1994).

Los glicosomas son estructuras circulares con una densa matriz proteica rodeada por una única capa de fosfolípidos (Michels *et al.* 2005), donde tiene lugar la glicólisis (conversión de glucosa a piruvato con producción de ATP), siendo importante recalcar que esta compartimentalización asegura una alta eficiencia metabólica y constituye la principal vía de obtención de energía en la forma infectiva del organismo (Vickerman 1994). Además en los glicosomas se produce la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos, síntesis de lípidos y biosíntesis de pirimidinas (Michels *et al.* 2000).

Los tripanosomátidos presentan una única mitocondria ramificada debajo de los microtúbulos subpeliculares y dilatada en las regiones en que el kinetoplasto está presente (Brun & Krassner 1976). El volumen y la actividad metabólica mitocondrial varían de acuerdo a la fase del ciclo de vida en la cual se encuentra el parásito y por lo tanto a la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo la mitocondria de *T. brucei* alcanza su máximo volumen y funcionalidad en la forma procíclica, la cual depende de manera exclusiva del catabolismo mitocondrial de aminoácidos (fundamentalmente prolina) para la producción de ATP; lo contrario ocurre en el estadio infectivo *long slender*, el cual al habitar un medio rico en glucosa (como lo son la sangre y el tejido intersticial) generará ATP a partir del catabolismo de glúcidos llevado a cabo en los glicosomas y prescindirá totalmente de dos procesos energéticos que ocurren exclusivamente en la mitocondria: la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs. Esta marcada reducción de la capacidad funcional de la mitocondria se acompaña de una disminución importante en la estructura y tamaño de este organelo (Soares & De Souza 1988).

El ADN mitocondrial o kinetoplasto se halla altamente condensado formando una estructura en forma de disco (De Souza 2008). El kinetoplasto se diferencia del ADN nuclear en que el primero está compuesto de moléculas circulares, topológicamente relajadas e interconectadas formando una única red. Hay dos tipos de moléculas circulares: los maxicírculos y los minicírculos (Liu *et al.* 2005). Los maxicírculos se componen de 20 a 40 Kpb, están presentes en unas pocas docenas y son análogos al ADN mitocondrial de los eucariotas superiores, codificando los ARNr y subunidades de la cadena respiratoria. Los minicírculos, más numerosos y que van de 0,5 a 10 Kbp, codifican ARNg (ARN guía) que modifican los transcriptos de los maxicírculos durante el proceso de edición del ARN (Lukes *et al.* 2005).



**Figura 4. Representación esquemática de la morfología y ultraestructura de *T. brucei*.** En la imagen se señalan los organelos y estructuras subcelulares más destacadas (Imagen modificada de De Souza 2008).

El sistema redox dependiente de tioles de estos organismos se compone del cofactor redox de bajo peso molecular denominado tripanotión ( $N^1$ ,  $N^8$  bis-glutationil espermidina), de la enzima que lo mantiene en su forma reducida, la tripanotión reductasa, y de una batería de oxidoreductasas (triparredoxina, glutarredoxinas y tiorredoxinas) que median la transferencia de electrones desde tripanotión a diversos blancos moleculares (Manta *et al.* 2013). A diferencia de la mayoría de los eucariotas, los tripanosomátidos carecen de glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa lo cual explica la extrema dependencia de su metabolismo redox en la dupla tripanotión/trippanotión reductasa (Krauth-Siegel & Comini 2008). El tripanotión está formado por dos moléculas de glutatión (GSH) unidas covalentemente a una molécula de espermidina y reemplaza al GSH en la mayoría de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro de la célula. El dihidrotripanotión  $[T(SH)_2]$  es más reactivo que el GSH, una propiedad que se puede explicar por su naturaleza ditiólica y porque a pH fisiológico sus cisteínas se encuentran en su forma desprotonada o de tiolato, la cual es más reactiva para intervenir en reacciones de intercambio tiol-disulfuro (Moutiez *et al.* 1994). Su naturaleza ditiólica favorece además la formación de puentes disulfuro intramoleculares luego de reacciones de oxidación por uno o dos electrones, previniendo la formación de radicales sulfinilo ( $RSO\dot{O}^*$ ), una especie capaz de propagar la oxidación a otras moléculas (Manta *et al.* 2013). Los niveles de tripanotión varían a lo largo del ciclo de vida del parásito, habiéndose reportado entre 0,1 y 0,34 mM para *T. brucei* (Krauth-Siegel & Comini 2008). El tripanotión participa de manera directa o indirecta en diversas funciones celulares, tales como: el mantenimiento de la homeostasis redox que en parte involucra los sistemas de defensa contra oxidantes, la

síntesis de precursores de ADN catalizado por la ribonucleótido reductasa, la detoxificación de xenobióticos y metales pesados y la regulación de los niveles de poliaminas (revisado en Krauth-Siegel & Comini 2008; Comini *et al.* 2011; Manta *et al.* 2013).

Con respecto a la edición del ARN mitocondrial, los tripanosomátidos emplean dos mecanismos. El primero de ellos es exclusivo de dichos organismos e involucra la inserción y delección precisa de residuos de uridina, principalmente en la región codificante de los ARNm de los maxicírculos para producir marcos abiertos de lectura (Blum *et al.* 1990). Este sistema esta mediado por la superposición de los ARNg que indican los sitios a editar mediante corte y ligación enzimáticos (Blum *et al.* 1990). El segundo mecanismo de edición deriva de otra característica específica del genoma mitocondrial de estos organismos: ausencia de genes de ARNt e importación de ARNt mitocondriales del citosol (Lopes *et al.* 2010). Por lo que este sistema de edición consta de la modificación de C34 a U34 en el anticodón de los ARNt importados, permitiendo que los codones stop UGA sean leídos como triptófano (Lukes *et al.* 2005).

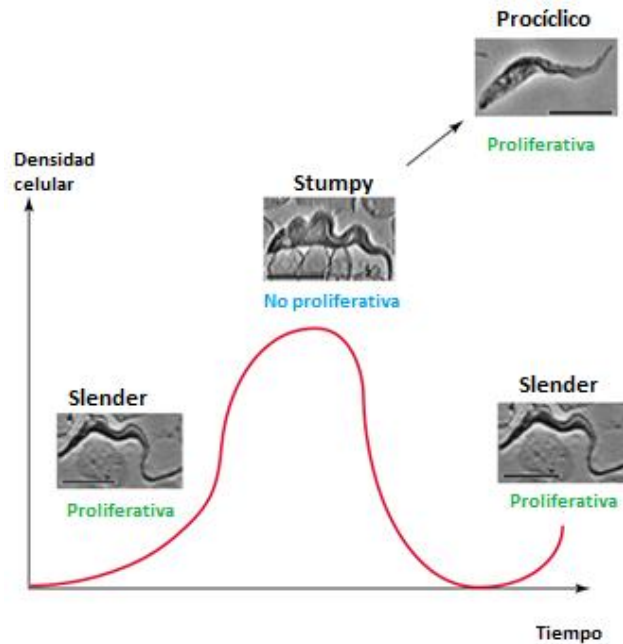
Los tripanosomátidos transcriben policistricamente los genes nucleares que codifican para proteínas que no están necesariamente relacionadas en función (Martinez-Calvillo *et al.* 2010). Para la maduración de los pre-ARNm utilizan cis y trans-*splicing* que ocurre en el *spliceosome*, un complejo supramolecular de ribonucleoproteínas (Figueroa *et al.* 2003). El cis-*splicing* (eliminación de intrones) ha sido observado en *T. brucei* pero es poco frecuente. El trans-*splicing* consta de dos pasos de trans-esterificación con la formación de una estructura en forma de Y (Liang *et al.* 2003).

### **1.5. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *T. brucei***

Los tripanosomátidos escapan de las defensas del hospedero gracias a dos mecanismos principales: variación antigénica y actividad inmunosupresora, además algunas especies han desarrollado resistencia hacia un factor tripanolítico presente en el plasma de mamíferos (Lecordier *et al.* 2005).

Debido a que todos los estadios de *T. brucei* son extracelulares, la principal forma de evasión del sistema inmune del hospedero consiste en la variación antigénica de sus glicoproteínas de superficie (VSG del inglés *variable surface glycoprotein*). La superficie del parásito está cubierta por una capa densa de homodímeros de VSG unidos a la membrana, que impide la lisis celular y que, si bien estas glicoproteínas son altamente inmunogénicas, presentan una alta tasa de recambio (fenómeno conocido con el nombre de variación antigénica), lo cual impide al hospedador montar una respuesta

inmune exitosa (Vincendeau & Bouteille 2005). *T. brucei* posee alrededor de 1.000 genes y pseudogenes que codifican VSGs, lo cual representa un 10% del genoma, de los cuales solamente uno es transcrito por vez. El mecanismo de evasión consiste en continuos cambios al azar del gen de VSG que está siendo transcrito, permitiendo al parásito mantener un estado crónico de infección que puede durar años. A su vez, la variación espontánea de las VSG es lo que da lugar a las típicas ondas de parasitemia que se explican en la Fig. 5 (Lecordier *et al.* 2005).

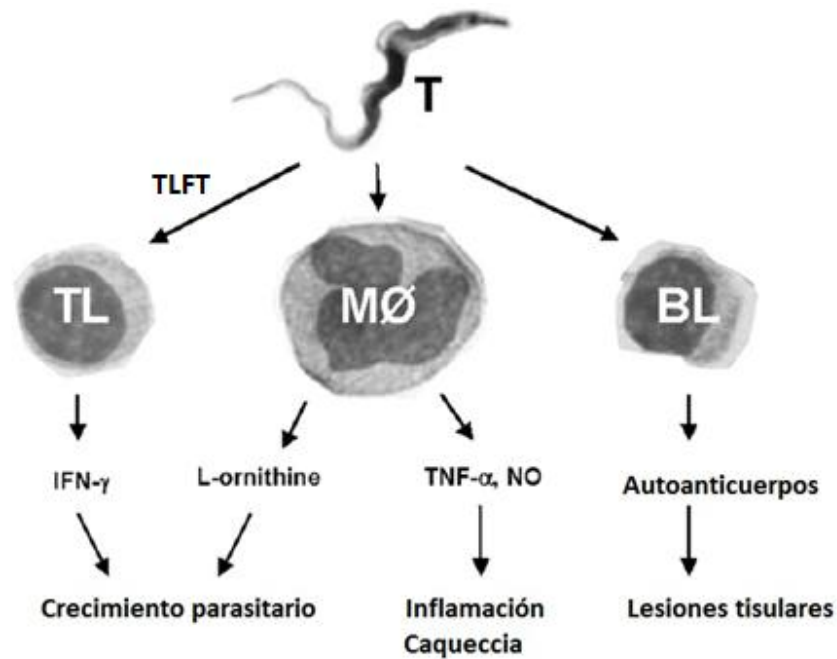


**Fig. 5. Ondas de parasitemia y estados de diferenciación más relevantes en el ciclo de vida de *T. brucei*.** Al inicio de la infección, los parásitos se reproducen bajo la forma *long slender*. A medida que la parasitemia aumenta se induce el pasaje a la forma *short stumpy*, la cual no es proliferativa pero capaz de infectar al insecto vector y diferenciarse en su interior a la forma replicativa procíclica. El sistema inmunitario del hospedero logra eliminar gran parte de los parásitos (descenso en la curva de parasitemia) pero paralelamente se generan clones con nuevas variantes de VSGs que no son reconocidas por las inmunoglobulinas del hospedero, lo cual le permite al patógeno proliferar y producir una nueva onda de parasitemia (Matthews *et al.* 2004).

Como se muestra en la Fig. 6, las VSG tienen diversos efectos en otros elementos inmunitarios tales como la inducción de la síntesis de autoanticuerpos por mimetismo molecular con los tejidos del hospedero (los cuales ocasionan lesiones tisulares), la persistencia en la producción de citoquinas, particularmente del factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  (Tachado & Schofield 1994).

Además existen otros componentes estructurales y factores secretados por los tripanosomas que afectan la producción de importantes moléculas del sistema inmune del hospedero, como ser el TLTF (*T lymphocyte triggering factor*) que estimula la

producción de interferon (IFN)- $\gamma$  por las células T, el cual actúa como factor de crecimiento para los parásitos (Olsson *et al.* 1991).



**Fig.6. Activación de células del sistema inmune mediada por tripanosomas.** Linfocitos tipo T (TL) y B (BL) junto con macrófagos (MØ) son activados por los tripanosomas (T), lo cual induce la producción de distintas moléculas con potencial de ocasionar efectos nocivos en los tejidos del hospedero y/o favorecer el crecimiento parasitario (TLFT: *T lymphocyte triggering factor*; IFN- $\gamma$ : interferon tipo  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , L-ornithine: L-ornitina, NO: óxido nítrico) (Vincendeau & Bouteille 2005).

## 1.6. Modelo murino de infección experimental

Las poblaciones de parásitos utilizadas para la experimentación son líneas adaptadas al laboratorio, las que tras sucesivos pasajes en roedores de experimentación han perdido o reducido la capacidad de diferenciarse a la forma *short stumpy*. Debido a su homogeneidad morfológica, dichas poblaciones han sido denominadas *monomórficas*. Debido a esto la infección producida en ratones de experimentación es equivalente a una infección aguda. Es decir, la densidad de parásitos en sangre aumenta de manera descontrolada hasta ocasionar la muerte del animal sin que se observen, al menos en infecciones llevadas a cabo con parásitos de cepa silvestre, las típicas ondas de parasitemia que ocurren en las infecciones naturales (Matthews *et al.* 2004). Una ventaja fundamental de la utilización de líneas monomórficas es la estabilidad antigénica, que permite estudiar los mecanismos moleculares de la expresión de antígenos de superficie (Barry & McCulloch 2001). Por otro lado este modelo de infección agudo permite realizar valoraciones y estudios rápidos de funcionalidad de genes y eficacia terapéutica.

Limitaciones éticas y prácticas en la investigación de las tripanosomiasis en condiciones naturales han llevado al desarrollo de diferentes modelos animales. En ese sentido, el modelo murino se convirtió en una poderosa herramienta de estudio debido a la diversidad de fenotipos disponibles (cepas transgénicas y KO), la existencia de variadas estrategias de estudio y el vasto conocimiento de la fisiología de estos animales (Antoine-Moussiaux *et al.* 2008).

En primer lugar, los ratones criados en laboratorio han permitido estudiar las variaciones naturales en la susceptibilidad y patogenicidad de las tripanosomiasis. Esto posibilitó la confección de un ranking de supervivencia de las diferentes cepas de ratones, demostrándose que esta depende del acervo genético de hospedero y la subespecie/cepa de parásito, así como de la interacción entre ambos. La existencia de cepas susceptibles y resistentes posibilitó el estudio de la herencia y los mecanismos de resistencia empleados por el hospedero (Antoine-Moussiaux *et al.* 2008).

La posibilidad de generar ratones *knock-out* (KO) constituye otra de las mayores ventajas que ofrece el modelo murino. Por ejemplo, el empleo de animales transgénicos ha resultado muy útil para investigar la susceptibilidad a la tripanosomiasis, debido a que la neutralización por anticuerpos de factores inmunitarios, técnica aplicada previamente, no es completamente eficiente. En otros casos, ha sido posible complementar estudios terapéuticos realizados sobre ratones KO (Antoine-Moussiaux *et al.* 2008).

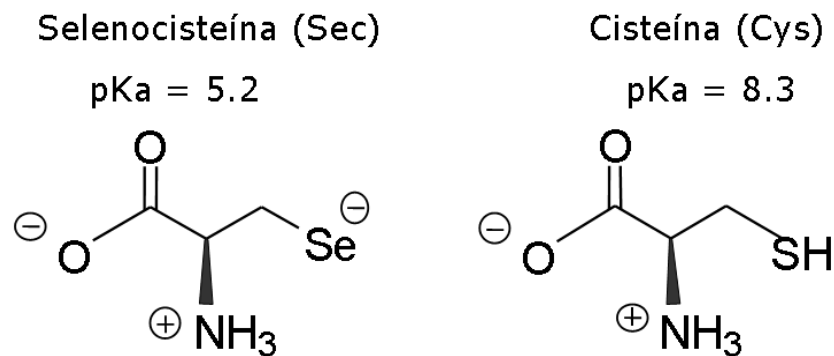
## **1.7. SELENOPROTEÍNAS y SELENOCISTEÍNA**

### **1.7.1. SELENOCISTEÍNA**

El selenio (Se) es un elemento traza esencial en la dieta y está presente en las proteínas en forma de selenocisteína (Sec, en código de tres letras; U, en código de una letra). Sec es un análogo de la cisteína (Cys), que contiene selenio en lugar de azufre (Cone *et al.* 1976).(Fig. 6.)

Una diferencia importante entre Sec y Cys es el pKa: en tanto el pKa de Cys es 8,3, el de Sec es de 5,2, lo cual implica que a pH neutro el tiol de Cys está mayoritariamente en su forma neutra (protonada), en tanto el grupo selenol de Sec está cargado negativamente, como selenolato (ver Fig. 6.); además el átomo de Se tiene mayor polarizabilidad que el del S. Estas características confieren mayor nucleofilia al átomo de Se (con respecto al S) en un rango más amplio de pH, y por tanto una mayor reactividad. Las enzimas que contienen Sec en el sitio activo son, por norma,

catalíticamente más eficientes que las homólogas que contienen Cys (Stadtman 1996) y de hecho, Sec es la forma biológicamente activa del selenio (Fomenko 2012).



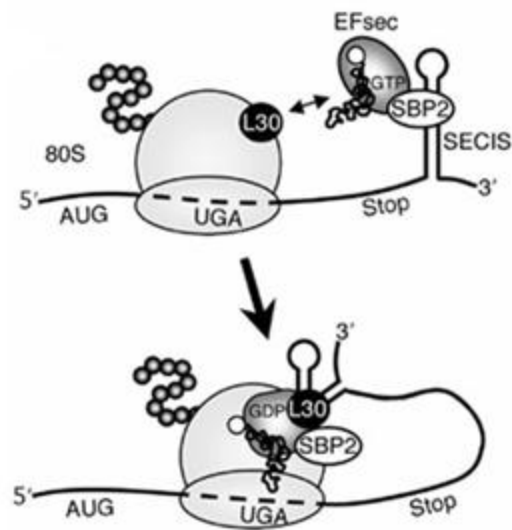
**Figura 6. Estructura química de la selenocisteína (Sec) y de la cisteína (Cys).** Debido a sus pKa a pH fisiológico la cadena lateral de la Sec está cargada negativamente, no así la de Cys. Dependiendo del contexto proteico el pKa del grupo selenol de Sec y del grupo tiol de Cys puede variar (Salinas 2010).

### 1.7.2. Vía de incorporación de Sec

Sec es codificada por un codón UGA (un codón que usualmente especifica la terminación de la síntesis de la cadena polipeptídica) reprogramado para codificar Sec por un elemento de incorporación de Sec (elemento SECIS, del inglés Sec Insertion Sequence) presente, exclusivamente en los ARNm de las selenoproteínas (Fig. 7.) (Chambers *et al.* 1986). El elemento SECIS se encuentra en la región 3' no traducida (3'UTR) de organismos eucariotas (Zinoni *et al.* 1990) y posee una estructura de "tallo-bucle" conservada y variabilidad de secuencia (Salinas 2010).

A diferencia de los aminoacil-ARNt convencionales, que son reconocidos por un factor de elongación general, denominado EF-Tu o eEF-1, que media la incorporación de los aminoacil-ARNt al ribosoma, el selenocisteinil-ARNt<sup>Sec</sup> es reconocido por un factor de elongación específico, denominado SelB o EF-Sec, el cual reconoce además de GTP y ARNt<sup>Sec</sup>, al elemento SECIS del ARNm y media la incorporación del ARNt<sup>Sec</sup> al ribosoma. En eucariotas el factor de elongación que une Sec-ARNt<sup>Sec</sup> no interacciona directamente con el elemento SECIS, sino a través de la proteína de unión a SECIS, denominada SBP2 (Caban & Copeland 2006) además, otras proteínas como la proteína ribosomal L30 participa en el proceso de descodificación (Chavatte *et al.* 2005). La Fig. 7 resume el mecanismo de incorporación de Sec en eucariotas.

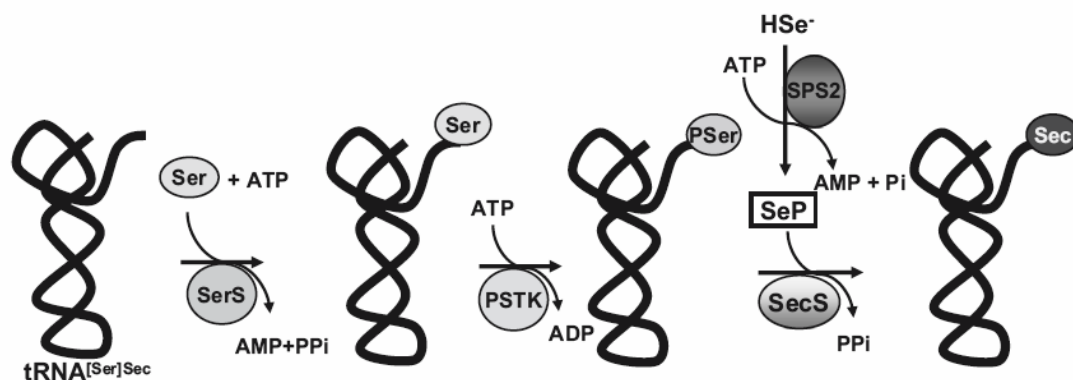




**Figura 7. Incorporación de selenocisteína a la síntesis proteica en eucariotas.** El elemento SECIS une a la proteína SBP2, que recluta al factor de elongación de Sec (EFSec) y al ARNt<sup>Sec</sup>; luego de la asociación con el ribosoma, SBP2 es desplazada del elemento SECIS por la proteína ribosomal L30. El cambio conformacional del elemento SECIS promueve la hidrólisis de GTP y la liberación del ARNt<sup>Sec</sup> al sitio A del ribosoma (Caban & Copeland 2006).

### 1.7.3. Vía de síntesis de Sec

Sec es un aminoácido insertado de forma cotraduccional y codificado por el codón stop UGA. La síntesis de Sec ocurre exclusivamente sobre su ARNt (no existe la síntesis del aminoácido libre). El ARNt<sup>Sec</sup> es previamente aminoacilado con serina, por una seril-ARNt sintetasa convencional (la misma enzima que cataliza la formación de seril-ARNt<sup>Ser</sup>) dando lugar a seril-ARNt<sup>Sec</sup> (Salinas 2010). En Eucariotas, el paso siguiente consiste en la formación de fosfoserina (Sep) por la quinasa fosfoseril-ARNt<sup>Sec</sup> (PSTK). Finalmente, la Sep-ARNt<sup>Sec</sup> es convertida en Sec-ARNt<sup>Sec</sup> por la acción de Sep-ARNt:Sec-ARNt sintetasa (SepSecS) (Schwarz & Foltz 1957). La Fig. 8. resume la síntesis de Sec sobre su ARNt (Xu *et al.* 2007). El átomo de Se proviene de selenofosfato, el cual es sintetizado por la selenofosfato sintetasa (SPS2 en eucariotas) a partir de selenuro y ATP (Salinas 2010).



**Figura 8. Biosíntesis de selenocisteína en eucariotas.** El ARNt<sup>Sec</sup> es aminoacilado por la seril-ARNt sintetasa (SerS), el residuo de serina es fosforilado por la O-fosfoferil-ARNt<sup>Sec</sup> quinasa (PSTK) para dar lugar a O-fosfoferil-ARNt<sup>Sec</sup>, que es convertido en selenocisteinil-ARNt<sup>Sec</sup> por la selenocisteína sintetasa (SecS). SecS tiene también como sustrato al selenofosfato (SeP), cuya síntesis es catalizada por la selenofosfato sintetasa (SPS2) a partir de selenuro y ATP (Leinfelder *et al.* 1990). Esquema tomado de (Xu *et al.* 2007).

#### 1.7.4. Selenoproteínas y selenoproteomas

Las proteínas que contienen selenocisteína son denominadas selenoproteínas, las cuales pertenecen a un subgrupo de tiol-oxidoreductasas (Fomenko 2012).

A su vez, las tiol-oxidoreductasas representan un grupo diverso de proteínas que tienen en común el hecho de poseer una Cys catalítica en su sitio activo. En algunos casos la Cys catalítica es sustituida por Sec. Las sustituciones Cys/Sec han sido observadas únicamente en sitios activos de varias oxidoreductasas (Fomenko *et al.* 2007) y dicho reemplazo se relaciona con las propiedades nucleofílicas del selenio, lo que hace a Sec más eficiente en relación a Cys.

La secuenciación de genomas completos, junto al desarrollo de herramientas bioinformáticas para detectar selenoproteínas permitió determinar selenoproteomas completos, y descubrir nuevas familias de selenoproteínas. Estas estrategias informáticas se basaron en i) detectar la presencia de elemento SECIS “secuencia abajo” de un codón UGA en marco, y ii) analizando las secuencias posteriores a UGA; a esta última estrategia ayudó enormemente la observación de que la mayoría de los genes de selenoproteínas poseen homólogos en los cuales Sec es reemplazado por Cys (Salinas 2010). Estos estudios revelaron que los organismos que incorporan Sec lo hacen en un número muy reducido de proteínas, y mostraron que los selenoproteomas de diferentes taxa varían tanto en el número como en el tipo de familias de selenoproteínas encontradas. A manera de ejemplo sólo una selenoproteína existe en el gusano *Caenorhabditis elegans* y 25 en el ser humano (Kryukov *et al.* 2003).

### 1.7.5. Selenoproteínas en Tripanosomátidos

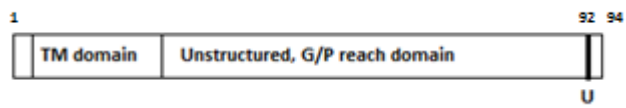
El selenoproteoma de los Tripanosomátidos consta de tres selenoproteínas: SelK, SelT y SelTryp. Las dos primeras están presentes en otros organismos eucariotas, mientras que SelTryp sería exclusiva de tripanosomátidos (Lobanov *et al.* 2006).

SelK se encuentra en eucariotas primitivos y existen diversos homólogos eucariotas con Sec y con Cys (Fomenko 2012). Es una selenoproteína pequeña, de 94 residuos aminoacídicos (Hoffman 2012), cuya estructura secundaria es laxa, lo que es poco frecuente dentro en las selenoproteínas. Contiene una única  $\alpha$  hélice transmembrana en su segmento N-terminal que la dirige a la membrana del retículo endoplasmático (RE), si bien no es claro hacia que compartimento (citosol o RE) está orientado el presunto sitio activo. El residuo Sec se encuentra cercano al extremo C-terminal dentro de un motivo CxxU (residuo 92) (Hoffman 2012), lo que sugiere funciones redox (Hatfield *et al.* 2012). Diversos ensayos sugieren múltiples roles de Sel K, tales como protección contra el estrés oxidativo en cardiomiocitos, regulación del estrés en RE y facilitación del flujo de calcio en células inmunitarias durante la activación mediada por receptor (Hoffman 2012).

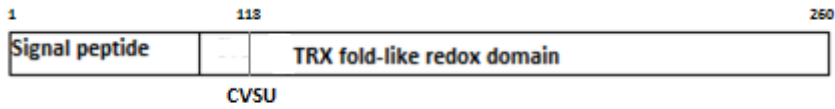
SelT presenta plegamiento similar al de las tiorredoxinas, su función es desconocida, si bien se sugiere un rol antioxidante debido a que esta proteína posee un motivo redox N-terminal del tipo CxxU o CxxC en una unidad de plegamiento tiorredoxina (Trx) y que estudios de *knockdowns* de SelT en fibroblastos de ratones resultaron en la activación de la expresión de otra proteína miembro de su subfamilia, llamada SelW (Hatfield *et al.* 2012). SelT pertenece a una subfamilia de proteínas con plegamiento tiorredoxina, denominada redoxina, que además del sitio redox antes mencionado contienen un motivo tGxFEI(V) (donde las mayúsculas corresponden a los residuos altamente conservados, las minúsculas a los residuos más frecuentemente observados en esa posición y la x se refiere a cualquier residuo) conservado en la región C-terminal. Esta familia incluye las cuatro selenoproteínas de mamíferos (SelT, SelV, SelW y SelH) y otras proteínas presentes en los tres dominios de lo viviente.

SelTryp parece ser exclusiva del linaje de los Tripanosomátidos (Lobanov *et al.* 2006). Presenta un dominio metalo- $\beta$ -lactamasa en la región N-terminal y dos dominios rodanasa (en los residuos aminoacídicos 500-585 y 621-774), Sec en el motivo CxxU en la región carboxilo-terminal, además de una posible secuencia señal N-terminal ver figura 9. Si bien su función es desconocida, la presencia del motivo redox CxxU hace presuponer una función redox para esta selenoproteína (Lobanov *et al.* 2006).

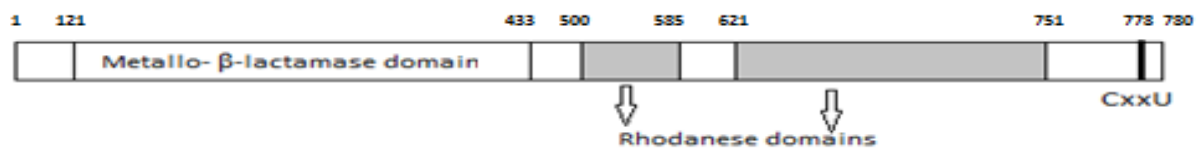
SelK:



SelT:



SelTryp:



**Figura 9. Dominios estructurales de SelK, SelT y SelTryp de *T. b. brucei*.** Se indica el número de los residuos aminoacídicos así como los dominios principales y la ubicación de la selenocisteína (Hatfield *et al.* 2012 y Lobanov *et al.* 2006).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Profundizar en la caracterización biológica de la línea celular SepSecS KO de *T. brucei* y producir SelTryp de forma recombinante.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Análisis comparativo del patrón de crecimiento de las líneas celulares WT y SepSecS KO de *T. brucei*
2. Análisis comparativo de la sensibilidad/tolerancia a peróxido de hidrógeno de las líneas celulares WT y SepSecS KO de *T. brucei*
3. Evaluación de la capacidad infectiva de las líneas WT y SepSecS KO de *T. brucei* en un modelo murino de infección aguda
4. Producción de la forma recombinante de SelTryp, purificación en condiciones desnaturizantes y renaturalización

## **3. Antecedentes**

Diversas técnicas que disminuyen o anulan la expresión de genes han sido utilizadas en *T. brucei* para realizar estudios funcionales de genes, entre ellas se encuentran el reemplazo génico o *knock-out* (KO), la sobreexpresión inducida de proteínas en su forma salvaje o bien mutadas (dominantes negativos) y el silenciamiento post-transcripcional de genes por ARN de doble cadena.

El reemplazo génico por recombinación homóloga o sitio dirigida, conocida con el nombre de KO, permite abolir totalmente la expresión del gen en estudio. En esta estrategia, el reemplazo de genes se logra transfecando células con un plásmido linealizado que contenga un marcador de selección contra un antibiótico específico, flanqueado por las secuencias 5' y 3' UTR del gen blanco las cuales marcarán el sitio de inserción correspondiente a nivel cromosomal (Gueiros –Filho & Beverley 1996). Dado que los tripanosomátidos son organismos diploides (es decir contienen pares de cromosomas homólogos), un KO completo para un gen de copia única (o múltiple

copia, si las mismas se encuentran en tándem) requiere dos rondas de recombinación para reemplazar las secuencias en cuestión. Este evento puede ocurrir por segregación de cromosomas seguido de reemplazo molecular al cultivar los KO hemicigotos en cantidades crecientes del antibiótico de selección, o más comúnmente, mediante la transfección del organismo con un casete de KO que contenga un segundo marcador de selección diferente al empleado en el primer evento recombinatorio (Lorenz *et al.* 1998).

Otras técnicas genéticas empleadas para interferir con la función de proteínas incluyen el silenciamiento postranscripcional (o interferencia por ARN doble cadena) y la sobreexpresión de mutantes no funcionales de la proteína en estudio. El silenciamiento postranscripcional de genes por medio de ARN de doble cadena ha sido utilizado con éxito para el estudio funcional de genes en *T. brucei* (Ngo *et al.* 1998). En el mismo, el blanco del ARN interferente es ARN mensajero citoplasmático cuya degradación es marcada por la presencia pequeños ARN complementarios a la secuencia del transcripto y es llevada a cabo por un complejo enzimático conocido como RISC (*RNAi silencing complex*) cuyos componentes se encuentran en *T. brucei* y algunas especies de *Leishmania*, pero no en *T. cruzi* (Bass 2000). Los pequeños ARNs que sirven como cebos para que se produzca el reconocimiento de la secuencia blanco y su posterior degradación pueden ser introducidos al organismo por electroporación o bien pueden ser producidos a nivel endógeno por la acción de una ribonucleasa (DICER) que convertirá el ARN doble hebra molde en pequeños ARNs. Esta última estrategia ofrece la posibilidad de generar sistemas de ARNi inducibles y por lo tanto líneas celulares transgénicas estables. Para producir *in situ* ARN doble hebra de un fragmento del gen blanco se emplean vectores con promotores regulables (inducibles por tetraciclina) e integrados al genoma de la célula (Hammond *et al.* 2001).

La sobreexpresión de un mutante no funcional, o dominante negativo, de la proteína en estudio resulta de gran utilidad cuando el gen codificante para la misma está presente en múltiples copias, o en tándemes que incluyen otros genes, ya que la creación de un KO sería imposible o muy dificultosa (Clayton 1999), y también cuando la técnica de ARNi no está disponible (por ej. en el caso de *T. cruzi*). Esta estrategia se aplica muy bien para el estudio de funcionalidad de proteínas que forman parte de complejos y/o de aquellas que para cumplir su función deben interactuar con otra(s) proteína(s) y/o consigo misma formando oligómeros (Tovar *et al.* 1998).

El grupo de investigación del Dr. Schneider de la Universidad de Berna, Suiza, creó líneas celulares KO de PSTK y SepSecS, lo cual permitió demostrar que estas dos proteínas son requeridas individualmente para la formación de Sec-ARNt<sup>Sec</sup> en *T. brucei* procíclico, aunque dicho proceso no resultó indispensable para el crecimiento de esta forma de parásitos en condiciones de crecimiento *in vitro* (Aeby *et al.* 2009).

El mismo grupo produjo además el KO de SepSecS en la forma sanguínea de *T. brucei* con el fin de determinar si el metabolismo de selenocisteína es esencial para la viabilidad de la forma infectiva del parásito. De estos estudios concluyeron que *T. brucei* puede prescindir totalmente de la síntesis de selenocisteína, al menos en condiciones de cultivo (*in vitro*).

Por otro lado Costa y col. propusieron que la vía de síntesis de selenocisteína es relevante en la protección contra el estrés oxidativo a largo plazo (Costa *et al.* 2011). En dicho trabajo se realizaron experimentos de interferencia de ARN contra la selenofosfato sintetasa SPS2 de *T. brucei*, enzima responsable de producir monoselenofosfato, forma reducida altamente reactiva de selenio necesaria para producir Sec (Glass *et al.* 1993). En los ensayos de estrés por peróxido de hidrógeno encontraron que una reducción en los niveles de SPS2 sensibilizó contra el estrés oxidativo a parásitos mantenidos en condiciones de cultivo subóptimas (Costa *et al.* 2011). Sin embargo, hay resultados contradictorios respecto a si las selenoproteínas aportan protección contra el estrés oxidativo (Aeby *et al.* 2009). Por ejemplo Aeby y colaboradores (2009) compararon el crecimiento de las líneas WT y KO de SepSecS a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno y si bien el crecimiento de ambas líneas celulares se vio afectado de forma severa, no se registraron diferencias significativas entre ambas líneas celulares; lo que se contrapone con los resultados obtenidos por Costa y col. con el ARNi de SPS2 (2011).

En el presente trabajo se llevaron a cabo estudios de proliferación celular, estrés oxidativo e infectividad en un modelo murino de tripanosomiasis africana con la forma sanguínea de *T. brucei* línea celular WT y SepSecS KO. Los ensayos *in vivo* constituyen un aporte original de este trabajo y fueron realizados con el fin de determinar si el metabolismo de Sec cumple algún rol importante en la forma aguda del proceso infeccioso por *T. brucei*. Teniendo en cuenta que la función de la mayoría de las selenoproteínas tiene un componente redox (por ej. actúan como oxidorreductasas que previenen o reparan el daño oxidativo de diversos componentes celulares y regulan el estado redox de proteínas), que la generación de especies reactivas del oxígeno (oxidantes) forma parte de uno de los mecanismos de defensa innata que implementa el huésped mamífero frente a la infección (Gutteridge & Halliwell 2000) y los resultados obtenidos por de Costa y col. en sus estudios *in vitro*, se espera que al infectar ratones con la línea celular KO en SepSecS, esta no sea capaz de producir la enfermedad, o al menos la misma se desarrolle de forma atenuada.

Por otro lado, se trabajó en la optimización de la expresión y purificación de SelTryp de *T. cruzi* con el fin de lograr producir proteína en cantidad y calidad suficiente para posibilitar su futura caracterización bioquímica y la producción de anticuerpos específicos.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares utilizadas corresponden a la forma sanguínea de *T. brucei brucei* cepa Lister 427 línea celular 449 en su versión WT y doble KO de SepSecS.

Los cultivos se realizaron en medio HMI-9 completo suplementado con 10 % (v/v) suero fetal bovino, con antibióticos (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

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

Antibióticos	
Penicilina/Estreptomina	0,01 µg/mL
Fleomicina	0,2 µg/mL

### 4.2. Determinación de la densidad celular

Las células fueron contabilizadas por medio de cámara de *Neubauer* y por citometría de flujo, según el caso.

Para determinar la densidad celular con la cámara de *Neubauer*, 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 % (p/v) 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  $[(n1/4 + n2/4)/2]$  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.

La citometría de flujo evalúa las propiedades de refracción y dispersión lumínica, así como la fluorescencia propia o de algún marcador que posea una célula o partícula conforme esta pasa a través de un rayo de luz; puede ser utilizada para evaluar la densidad celular de numerosas muestras de forma rápida y eficiente. El agregado de perlas cuantificadas a la muestra en estudio permite determinar el volumen analizado y de esta forma poder estimar un valor de densidad celular absoluta (células/mL).

Para determinar la densidad celular por medio de esta técnica se empleó un citómetro Cyan-ADP de la firma Beckman Coulter, disponible en la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon). En una primera instancia y con asistencia de personal técnico de dicha unidad se estableció un protocolo de adquisición donde distintos parámetros (por ej. voltaje, ganancia, velocidad de adquisición) fueron ajustados empleando como muestras de calibración una suspensión de parásitos y perlas fluorescentes conjugadas a FITC (isotiocianato de fluoresceína). Las muestras a ser analizadas fueron procesadas como sigue: los cultivos celulares se homogeneizaron sacudiendo la botella de cultivo brevemente o por pipeteo repetido en los pocillos de las placas de cultivo. A continuación se tomó una alícuota de 250 µL de la suspensión celular y se agregaron 5 µL de una solución de perlas fluorescentes (*CountBright™ Absolute Counting Beads*, Molecular Probes-Invitrogen) conteniendo 0,46 x 10<sup>5</sup> perlas/50 µL de solución. Junto con las células el citómetro cuenta un número de perlas predeterminado (alrededor de 500 a 1000) que se fija según el rango de densidad celular del cultivo. A partir del número de perlas se calcula el volumen de la muestra analizada, y con este dato más el número de células contadas en la misma se puede obtener el valor de densidad celular (ver ecuación 1).

$$\text{Densidad de parásitos (células/mL)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células} \cdot 1.84 \times 10^4 \text{ perlas/mL}}{\text{n}^{\circ} \text{ perlas}}$$

**Ecuación 1.** Fórmula empleada para el recuento de parásitos por citometría de flujo.

Para distinguir las células muertas se agregó yoduro de propidio (IP) a una concentración final de 200 µg/mL. Este colorante presenta una baja permeabilidad y gran afinidad por intercalarse a los ácidos nucleicos, posibilitando el marcado de células que perdieron la integridad de su membrana plasmática, como es el caso de células no viables.

Durante las adquisiciones los fluoróforos (FITC e IP) fueron excitados con línea de láser de 488 nm, mientras que las células fueron distinguidas de acuerdo a su tamaño por dispersión frontal de la luz.

### 4.3. Determinación de la curva de crecimiento y tasa de duplicación

Para realizar la determinación de la curva de crecimiento de las dos líneas celulares se realizaron cultivos en 10 mL de medio HMI-9 completo suplementado con 10% (v/v) suero fetal bovino y antibióticos e incubando en forma aeróbica a 37°C en estufa gaseada con 5% de CO<sub>2</sub>. La densidad celular inicial fue de 1 x 10<sup>4</sup> células/mL. Cada 24 horas y hasta no detectar parásitos vivos en ambos cultivos se realizaron recuentos celulares por duplicado utilizando la cámara de *Neubauer*.

Para calcular el tiempo de duplicación de cada línea se utilizó la siguiente ecuación:

$$D_2 = D_1 e^{-k \times (t_2 - t_1)}$$

D<sub>2</sub>: número de células al tiempo 2

D<sub>1</sub>: número de células al tiempo 1

k= velocidad de crecimiento específica

t<sub>2</sub> – t<sub>1</sub>: intervalo de tiempo

Despejando se obtiene el valor de k de acuerdo a la siguiente fórmula:  $k = - \ln (D_2/D_1) / t_2 - t_1$

Luego con k se puede calcular el tiempo de duplicación (T<sub>d</sub>) de acuerdo a:  $T_d = \ln 2 / k$

### 4.4. Tratamiento de parásitos con peróxido de hidrógeno

Con la finalidad de analizar el efecto del agente oxidante peróxido de hidrógeno sobre la proliferación de las líneas celulares WT y SepSecS KO de *T. brucei*, parásitos de ambas líneas celulares provenientes de cultivos en fase de crecimiento exponencial fueron centrifugados a 2.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y diluidos con medio de cultivo HMI-9 fresco de forma de obtener las densidades celulares deseadas (1 x 10<sup>4</sup>, 5 x 10<sup>4</sup>, 1 x 10<sup>5</sup> y 5 x 10<sup>5</sup> parásitos/mL). A una placa de cultivo de 24 pocillos se transfirió 1 mL por pocillo de cada una de estas suspensiones celulares y luego se agregaron los volúmenes correspondientes de solución *stock* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 101 mM para lograr distintas concentraciones finales del oxidante, de 10-500 μM. Las placas se incubaron a 37°C en estufa gaseada con 5% de CO<sub>2</sub> y se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar la densidad y viabilidad celular.

Se realizaron dos tipos de ensayos para determinar la sensibilidad de *T. brucei* WT y SepSec KO frente a estrés oxidativo generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

A) cultivos de ambas líneas celulares iniciados a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/mL fueron tratados con 10, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 24 horas. En ambos casos se incluyó un cultivo control no tratado. La densidad celular se determinó a las 7 y 24 horas de iniciado el experimento.

B) cultivos de ambas líneas celulares a diferentes densidades celulares ( $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  parásitos/mL) fueron tratados con 50 o 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 15 horas. En ambos casos se incluyó un cultivo control no tratado. La densidad celular se determinó a las 2, 4, 7 y 15 horas de iniciado el experimento.

#### 4.5. Infección de ratones

Un total de 24 ratones hembras de la cepa BALB/cJ de entre 6-8 semanas de edad fueron usados en los ensayos. La cría y experimentación con los ratones se realizó bajo condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*) en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del IPMon. Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales ventiladas con presión negativa (Sealsafe rack, Tecniplast, Milano, Italy), en ambiente controlado a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  con 40-60% de humedad relativa en un ciclo de luz / oscuridad de 14 hr/10 hr respectivamente. La comida y el agua fueron administradas *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales han sido aprobados por el Comité de Cuidado Animal del IPMon y respetaron las normas nacionales (Ley Nacional nro. 18.611) e internacionales (FELASA) en relación a los protocolos de trabajo con animales de laboratorio.

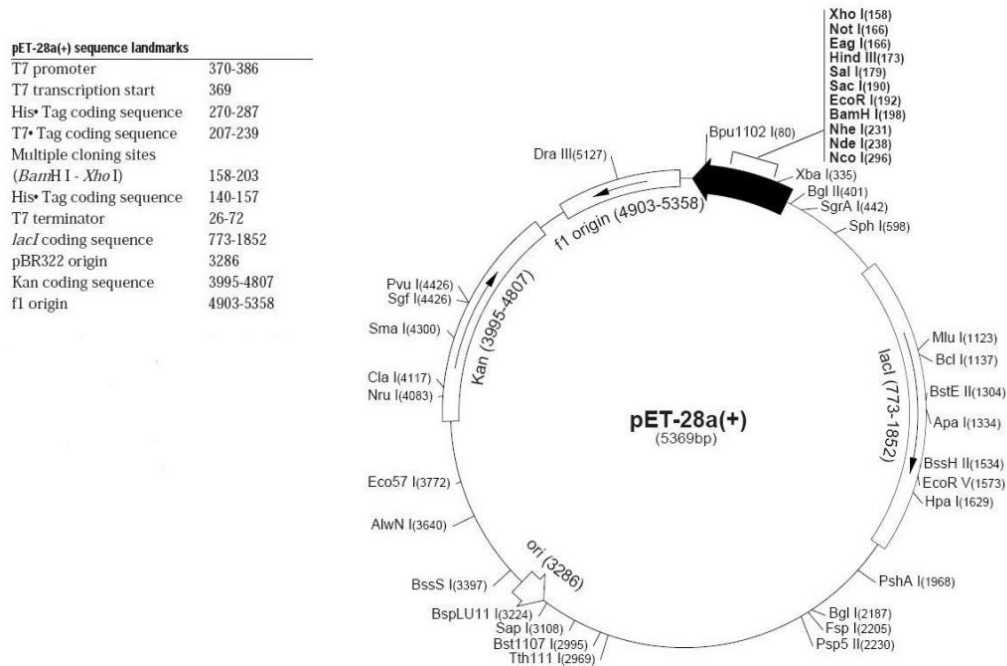
Los ratones fueron infectados mediante una única inyección intraperitoneal de  $1 \times 10^4$  parásitos infectivos suspendidos en 0,3 mL de medio fresco HMI-9. Los grupos experimentales fueron los siguientes: animales infectados con la cepa WT de *T. brucei*, y animales infectados con la cepa KO. Para el primer y segundo experimento de infección se empleó un n de 7 y 5 animales, respectivamente, por grupo de estudio (WT y KO). El estado de salud y supervivencia de los animales fue monitoreado diariamente en busca de signos de dolor o malestar. Los niveles de parasitemia de los ratones fueron determinados regularmente en muestras de sangre extraídas del seno submandibular. Entre 5-30  $\mu\text{L}$  de sangre fueron colectados en un tubo estéril conteniendo 1  $\mu\text{L}$  del anticoagulante compuesto de ácido tetra-acético tri-potasio etilen-diamida (K3 EDTA). Luego de enérgica homogeneización, una alícuota fue diluida 1:20 en una solución hipotónica (BD Pham Lyse) para lisar los eritrocitos, incubada por dos minutos a temperatura ambiente y diluida nuevamente en PBS-1% (p/v) glucosa si la densidad de parásitos superaba  $10^6$  células/mL. Los parásitos fueron contabilizados en un microscopio invertido usando cámara de *Neubauer*. Los ratones presentando un estado de salud deteriorado y/o una parasitemia en sangre  $\geq 10^8$  células/mL fueron sacrificados por razones de ética.

Los datos de supervivencia para ambos grupos en estudio fueron sometidos a análisis estadístico empleando el test de *log rank* (Bewick *et al.* 2004).

#### **4.6. Producción recombinante de SelTryp**

Se disponía del plásmido pET28a(+) conteniendo la secuencia codificante de SelTryp de *T. cruzi* cepa CL-Brener (plásmido pFI01, provisto por el laboratorio de la Cátedra de Inmunología; Instituto de Higiene de la UdelaR) en posición C-terminal a una cola de poli-histidina, el cual fue utilizado para la producción de Seltryp recombinante. Para la misma se transformaron con pFI01 células *Escherichia coli* BL21 DE3 y Shuffle mediante choque térmico. Se agregaron 3 µL de plásmido pFI01 a una alícuota de 100 µL de *E. coli* BL21 DE3 y Shuffle competentes, previamente descongeladas en hielo; la mezcla se mantuvo en hielo por 30 minutos. Luego se incubó la mezcla en baño de agua a 42 °C durante dos minutos. A continuación se agregó una alícuota de 900 µL de medio SOC (el cual contiene 20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 3,6 g/L glucosa 0,5 g/L NaCl, 0,186 g/L KCL, 0,96 g/L MgCl<sub>2</sub>, pH 7) y se las incubó por una hora a 37 °C. Finalmente, 100 µL de cada reacción de transformación fueron distribuidos con ansa en placas de LB agar conteniendo 30 µg/mL kanamicina e incubadas durante un día en estufa a 37°C las *E. coli* BL21 DE3 y a 30°C las *E. coli* Shuffle.

## Sistema de expresión pET



**Figura 10. Estructura del plásmido pET28a(+), utilizado para expresar *T. cruzi* SelTryp.** Se muestran los sitios de corte para distintas enzimas de restricción, el sitio de clonado múltiple (barra negra), el sitio de duplicación (f1 origin) y el gen que le confiere resistencia al antibiótico kanamicina (kan).

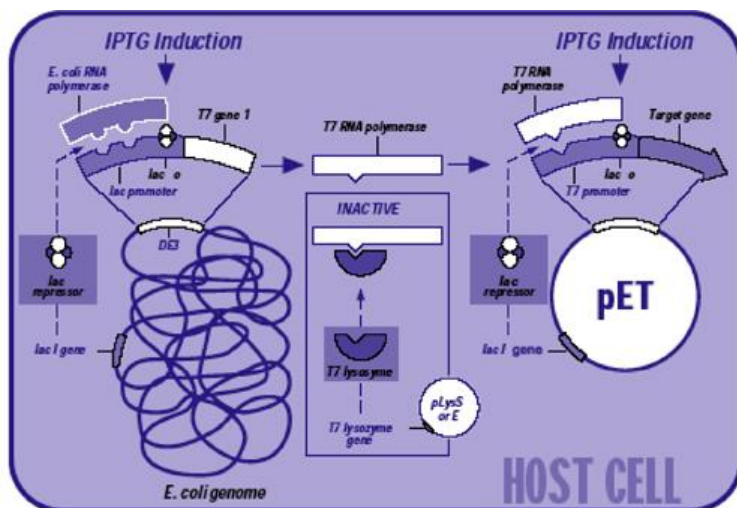
El sistema de expresión pET (Fig. 10.) está diseñado con el fin de producir grandes cantidades de proteína recombinante dentro de la célula anfitriona. Fue desarrollado en 1986 por W. F. Studier y B. A. Moffatt, quienes crearon inicialmente un sistema de expresión de polimerasas de ARN sumamente selectivo para la polimerasa del bacteriófago T7. Es extensamente utilizado por ser de fácil manipulación y porque permite un alto nivel de producción de proteína recombinante. Se basa en la transformación con plásmidos pET recombinantes de huéspedes de expresión, generalmente cepas de *E. coli* que contienen una copia cromosómica de la ARN polimerasa de T7 bajo control del operón lacUV45. En condiciones normales, el operón lacUV45 se encuentra inhibido por el represor lac, el cual puede ser desplazado por una molécula de isopropil tiogalactósido (IPTG), un análogo no hidrolizable de la lactosa.

Tanto la expresión del gen de la ARN polimerasa de T7 como la del gen recombinante se encuentran controladas por el operón lacUV45, por lo que el IPTG es necesario para activar la transcripción de los dos genes (Fig. 11). La presencia de la ARN polimerasa de T7 es necesaria para la expresión de la secuencia exógena ya que su promotor no es reconocido por las ARN polimerasas de la célula anfitriona. Al igual que muchos sistemas de expresión, el pET ofrece la opción de agregar secuencias de fusión a la proteína recombinante que generalmente se utilizan para la purificación de la misma.

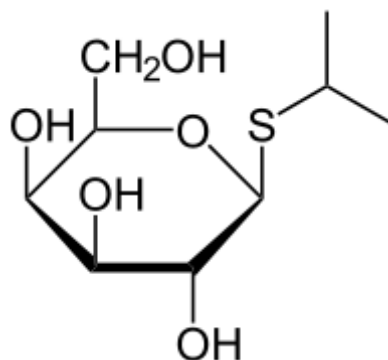
Algunas cepas de *E. coli*, como BL21 (*F*- *ompT hsdSB*(rB-, mB-) *gal dcm* (DE3) presentan una copia cromosómica de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, bajo el control de un derivado del promotor lac: lacUV45. lacUV45 tiene mutaciones puntuales que aumentan la estabilidad del promotor, haciéndolo menos sensible a la represión por catabolito y exclusivamente controlado por el represor lac (*lacI*), lo cual permite la inducción por IPTG aún en presencia de glucosa. La adición de IPTG libera la represión ocasionada por *lacI*, de forma en que se expresa la polimerasa T7, la que transcribe el gen de interés, cuya expresión es también desreprimida por IPTG, tal como se mencionó antes.

La cepa Shuffle [*F'* *lac*, *pro*, *lacI*<sup>Q</sup> /  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1*  $\Delta$ (*phoA*)PvuII *phoR ahpC\** *galE* (or U) *galK*  $\lambda$ att::pNEB3-r1-cDsbC (*Spec*<sup>R</sup>, *lacI*<sup>Q</sup>)  $\Delta$ *trxB rpsL150*(Str<sup>R</sup>)  $\Delta$ *gor*  $\Delta$ (*malF*)3] es óptima para la producción, en el citoplasma, de proteínas que presentan enlaces disulfuros, ya que tiene deletados los genes que codifican a la tiorredoxina reductasa y a la glutatión reductasa. Ambas enzimas abastecen con poder reductor a los sistemas redox dependientes de tioles de la célula, los cuales contribuyen a mantener reducidos a los residuos de cisteína expuestos en la superficie de las proteínas. Por lo tanto la ausencia de ambas enzimas genera un ambiente redox intracelular más oxidativo que favorece la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma. Además dicha cepa expresa constitutivamente en el citoplasma a la DsbC (*disulfide bond isomerase*), una enzima que cataliza intercambios tiol-disulfuro de manera específica, favoreciendo así la formación de enlaces disulfuros correctos.

Seltryp presenta 18 Cys en *T. cruzi*, muchas de las cuales podrían estar formando enlaces disulfuros, por lo que se consideró apropiada la expresión de su forma recombinante en la cepa Shuffle de manera tal de aumentar las probabilidades que tenga lugar su correcto plegamiento. Se ha observado además que la DsbC puede actuar como una chaperona que asiste en el plegamiento de proteínas mediante mecanismos redox-independientes.



**Figura 11. Esquema del sistema de inducción de la expresión de proteínas recombinantes en los vectores de expresión de la serie pET.** La presencia de IPTG en una célula anfitriona induce la síntesis de ARN polimerasa de T7 al liberar la represión de la ARN-pol de *E. coli*; la T7 ARN-pol posee alta afinidad por su promotor en el plásmido pET generando gran cantidad de transcritos de la secuencia recombinante (Schrendina *et al.* 2010).



**Figura 12. Estructura del IPTG:** Isopropyl β- D- 1-Tiogalactopiranosido: análogo no hidrolizable de la lactosa. Es un inductor artificial del operón lac, el cual es utilizado en los laboratorios porque, a diferencia de la allolactosa, inductor natural del operón, el IPTG no puede ser hidrolizado por la célula anfitriona, por lo cual su concentración no cambia a lo largo del experimento. El IPTG se une al represor lac y lo libera del operón lac, permitiendo así la transcripción de los genes del operón.

#### 4.7. Inducción de la expresión de SelTryp

Se realizó un precultivo con cada cepa de *E. coli* transformada con pFI01, incubándolas toda la noche en un agitador orbital a 37°C las *E. coli* BL21 DE3 y a 30°C las *E. coli* Shuffle con agitación (200 rpm) en 10 mL de caldo LB con kanamicina (LB Kan) a una concentración final de 30 µg/mL.

En primera instancia, se llevó a cabo la inducción de la expresión de SelTryp en estas dos cepas de *E. coli* con el objetivo de comparar cuál de ellas rinde mayores niveles de proteína recombinante.

Para la producción de la proteína se realizaron cultivos de 400 mL de LB-kan en matraces de 2 L con deflectores. Se inocularon con 4 mL del precultivo de 12 horas de las cepas transformadas y luego se incubaron a 37°C las *E. coli* BL21 y a 30°C las *E. coli* Shuffle con agitación (200 rpm). Se monitoreó la densidad celular a través de la densidad óptica (DO) de los cultivos a 600 nm. La inducción de la producción de la proteína recombinante se realizó a DO de entre 0,4 y 0,5 mediante el agregado de 400 µL de 100 mM IPTG (concentración final 100 µM IPTG). Los cultivos fueron incubados durante toda la noche a 16 °C en agitación (200 rpm). A continuación, los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos. Se tomaron fracciones de 1 mL de cultivo antes de la inducción y al final de la producción para analizar la presencia de la proteína recombinante por SDS-PAGE. Asimismo, se indujo la expresión de SelTryp en un cultivo de BL21 DE3 en 500 mL de LB-Kan a 37°C a DO= 1, con el fin de evaluar la solubilidad de la proteína recombinante a mayor temperatura e inducción más tardía.

El sedimento celular fue resuspendido en 10 ml de un buffer de lisis compuesto por 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 µg/mL lisozima y 2 µg/mL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, inhibidor de serin-proteasa), pH 8. La suspensión se mantuvo en hielo por 1 hora y luego se lisaron las bacterias por ultrasonido (sonicación) aplicando 50 pulsos de 1 minuto a 80 W de potencia (espaciados por pausas de 1 minuto) en un sonicador Omni-Ruptor 4000, manteniendo la muestra en hielo durante la sonicación. Luego el lisado se centrifugó a una velocidad de 20.000 rpm durante 10 minutos y 4°C en una centrifuga SIGMA. Se retuvieron el sobrenadante y pellet para analizar ambas fracciones por electroforesis.

#### **4.8. Purificación de SelTryp en condiciones desnaturizantes**

En todas las condiciones ensayadas Seltryp resultó insoluble (ver resultados), por lo que la purificación de la proteína recombinante se realizó a partir de cuerpos de inclusión y en condiciones desnaturizantes, siguiendo el protocolo descrito por Schmidt (2005).

El cultivo inducido fue centrifugado a 5.000 rpm por 20 min. El pellet conteniendo las bacterias fue resuspendido con 50 mL del buffer 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µg/mL lisozima, 20 µg/mL DNAsa, pH 8. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente (RT) agitando con barra magnética; luego se centrifugó a 20.000 rpm por 20 minutos a 4°C. El pellet fue resuspendido en 50 mL de buffer lisis: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1,8 % v/v IGEPAL (octil-fenoxipolietoxietanol, un detergente no iónico), pH 8 y se



realizó una sonicación fuerte a 150 WATTS durante 20 minutos, con pulsos de 0,8 segundos en un sonicador Omni-Ruptor 4000, manteniendo la muestra en hielo durante la sonicación. Los cuerpos de inclusión fueron colectados por centrifugación a 20.000 rpm por 20 minutos a 4°C reteniendo el pellet. Luego se realizaron dos lavados con agua y se resuspendió el pellet en 40 ml de agua destilada y se realizó una sonicación suave durante 15 min a 90 WATTS con pulsos de 0,3 segundos de duración, manteniendo la muestra en hielo.

Luego se efectuó una última centrifugación a 20.000 rpm por 15 min a 4°C y los cuerpos de inclusión aislados fueron solubilizados en 10 mL del buffer conteniendo 8 M urea como agente caotrópico, 10 mM mercaptoetanol y 20 mM glutatión reducido (GSH). La solución se conservó toda la noche en heladera a 8°C. Los reductores se incluyen para prevenir la formación de enlaces disulfuros. Posteriormente, a esta solución se agregó por goteo 17 mL del buffer: 0,025 M Tris base (pH 9), 6 mM glutatión oxidado (GSSG) y 0,5 M Arg; resultando en una solución que contiene menor concentración de urea y con el par redox GSH/GSSG (que facilitaría la ruptura y generación de enlaces disulfuros) y que contiene arginina para facilitar la solvatación de la proteína recombinante.

La solución resultante contiene entonces:

Urea	3 M
Mercaptoetanol	3,7 mM
Glutatión reducido (GR)	7,4 mM
Glutatión oxidado (GO)	3,7 Mm
TRIS	15,75 mM
Arginina	0,31 M
pH 8	

Se conservó dicha solución en la heladera a 4 °C con agitación durante 12 horas y luego se diluyó al tercio con buffer 0,1 M Tris base pH 8.

#### **4.9. Renaturalización de SelTryp**

En primer lugar se intentó renaturalizar SelTryp por medio de diálisis a 4°C. Para ello se utilizaron 20 cm de membrana de diálisis de poro de 10 kDa (SelTryp tiene un peso molecular aproximado de 93 kDa), para 40 ml de la solución de proteína. El buffer de diálisis fue 20 mM Tris base pH 8 conteniendo 300 mM NaCl.

Inicialmente se dializó contra 4 L del buffer y a las 24 horas fueron cambiados por otros 4 L, de esta forma se realizaron 2 diluciones 1/100, quedando finalmente 1/10.000.

Durante la diálisis SelTryp precipitó (ver resultados) por lo que se sometió a la solución de SelTryp en 1M urea, 0,1 M Arg, 1,23 mM Mercaptoetanol, 2,47 mM GR, 1,23 mM GO a cambio de buffer en resinas de gel filtración Sephadex G25 (columna PD10; General Electric) removiendo separadamente la urea (dejando Arg) o arginina (dejando urea).

Inicialmente se pre-equilibra la columna PD-10 con 6 mL de buffer de elución: 1 M urea, 70 mM Tris, 10 mM imidazol, pH 8 , en el caso de quitar la Arg; y 0,1 M arginina, 70 mM Tris, 10 mM imidazol, pH 8 en caso de quitar la urea.

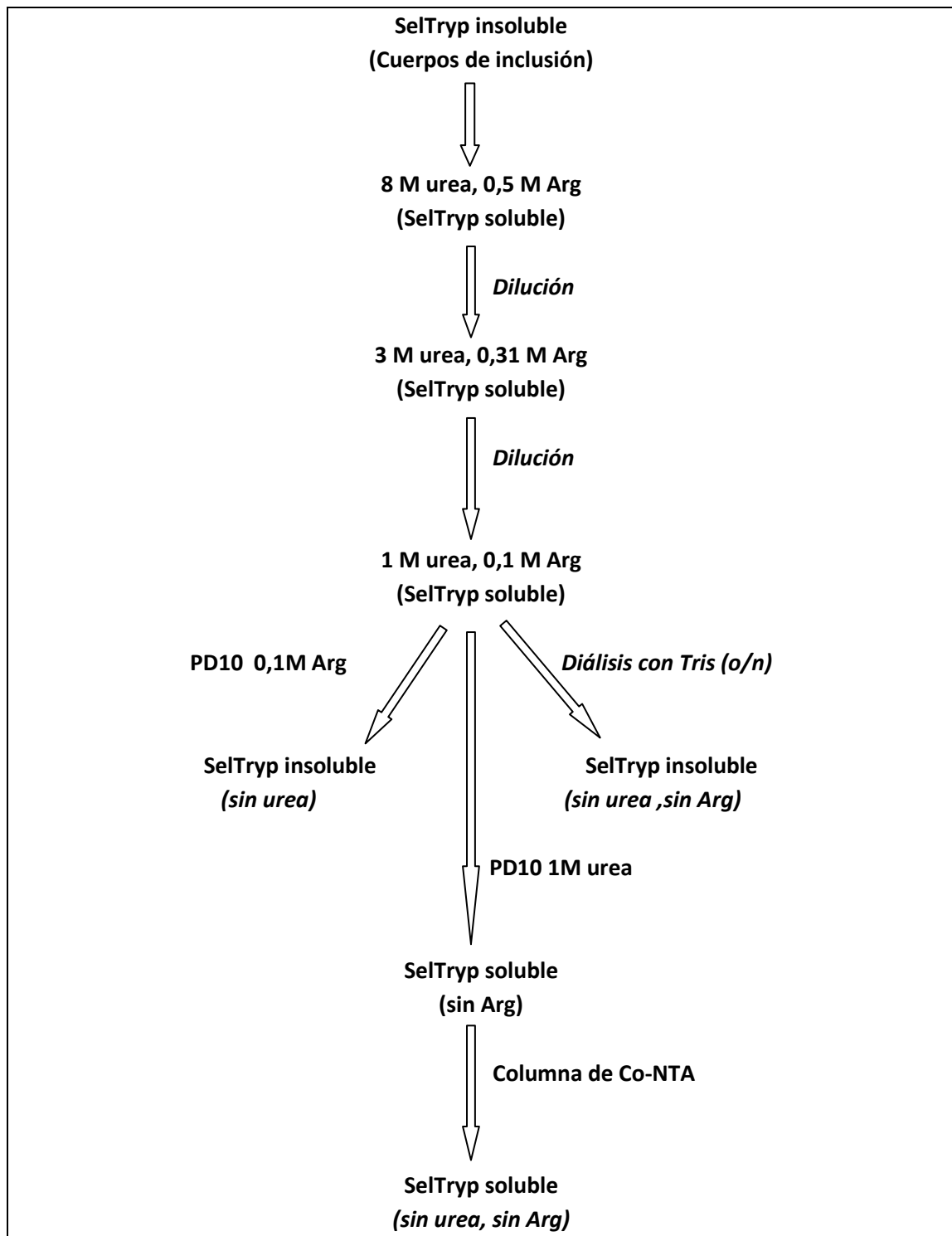
Luego se carga la columna con 2,5 mL de la solución de SelTryp con 1 M urea y 0,1 M arginina, y se pasan 5 mL del buffer de elución (1 M urea, 70 mM Tris, 10 mM imidazol, pH 8 en el caso de quitar la arginina, y 0,1 M arginina, 70 mM Tris, 10 mM imidazol, pH 8 en caso de quitar la urea) recogiendo los eluatos en fracciones de 0,5 mL.

#### **4.10. Purificación de SelTryp por cromatografía de afinidad por metales**

Debido a que la urea fue identificada como el componente que mantiene a SelTryp soluble y a que la arginina interfiere con la subsecuente purificación por cromatografía de metales, para la purificación y enriquecimiento de la muestra, se gel filtró SelTryp por medio de columna PD10 previo a utilizar columna de cobalto-NTA.

Se pasan 3 x 2,5 mL de la solución de SelTryp en urea 1 M, 0,1 M Arg, 1,23 mM Mercaptoetanol, 2,47 mM GR, 1,23 mM GO por la columna PD10 y cada aplicación se eluye con 4 mL de buffer de elución (1 M urea, 70 mM Tris, 10 mM imidazol, pH 8), descartando los primeros 0,5 mL y conservando los eluatos siguientes (2,5 mL). Este buffer con el que se eluye de la PD10 (para remover la arginina) es el buffer utilizado, en el siguiente paso, para la purificación por metales y por ello contiene una concentración baja de imidazol.

Para la purificación de SelTryp se utilizó una columna comercial de afinidad de cobalto-ácido nitrilo acético agarosa (Co-NTA, Invitrogen) que posee un grupo quelante tetradentado que ocupa cuatro de los seis sitios de la esfera de coordinación de un catión de cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ). Los sitios de coordinación libres pueden ser ocupados por grupos amina presentes en el imidazol o la histidina. Esto permite que la matriz una fuertemente péptidos conteniendo residuos de histidina consecutivos. A diferencia de lo que ocurre con otros sistemas de afinidad, la interacción de la matriz de Co-NTA no depende de su conformación tridimensional, por lo que puede ser utilizada tanto en condiciones nativas como desnaturizantes (Shchedrina *et al.* 2010).



**Fig.13. Esquema de las sucesivas etapas de purificación de SelTryp a partir de los cuerpos de inclusión.**

Las soluciones buffer utilizadas tanto para lavar la matriz como para la elución de la muestra poseen imidazol. Esta molécula es estructuralmente muy similar a la histidina, por lo que compite con la misma por los sitios de unión al cobalto. Cuanto mayor sea la concentración de imidazol en el buffer, mayor porcentaje de proteínas serán eluidas de la matriz.

El empaquetado de la columna se realizó según lo estipula el fabricante, colocando 1 mL de resina y luego agua. Se pasó la totalidad del volumen de SelTryp obtenido de la PD10 (12 mL). Posteriormente se lavó con 10 mL de buffer Urea 1 M (urea 1 M, Tris 70 mM, imidazol 10 mM, pH 8) y se pasaron 20 mL del buffer de elución: Tris 20 mM, imidazol 200 mM, pH 8; recogiendo nueve fracciones de 0,8 mL (E1 a E9).

#### **4.11. Análisis por SDS-PAGE**

Las electroforesis en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS (dodecil sulfato sódico) fueron realizadas siguiendo el protocolo convencional utilizando un gel concentrador de acrilamida al 5 % p/v y uno de resolución de 8-10 % p/v. Las muestras se trataron con un volumen igual de tampón de muestra [Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, glicerol 10 % (v/v), SDS 2 % (p/v), azul de bromofenol 0,001 % (p/v)] y se corrieron siempre reducidas. Para ello se agregó DTT a una concentración final en la muestra de 0,05 M. Previo a la electroforesis, las muestras se hirvieron durante 5 minutos en un baño de agua. Las electroforesis se realizaron en una cuba Bio-Rad Mini Protean III, a un amperaje constante de 40 mA, en buffer Tris-glicina [Tris 0,3 % (p/v), glicina 1,44 % (p/v), SDS 0,1 % (p/v)]. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 por inmersión en una solución del colorante [0,1% (p/v) en solución fijadora: metanol 40 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v)] durante una hora y se destiñeron con solución de ácido acético 10 % (v/v) durante toda la noche.

#### **4.12. Cuantificación de proteínas: determinación de proteína total en los eluatos**

Para determinar la concentración de proteína total en las fracciones de elución se siguió el método de Bradford, el cual utiliza colorante Coomassie Blue G-250 como reactivo. La técnica se basa en el cambio de longitud de onda del máximo de absorción de Coomassie Blue G-250 libre (465 nm) al unirse a proteínas (595 nm).

Como estándar se utilizó una solución de seroalbúmina bovina (BSA) con la que se realizó una curva de calibración. Las medidas se realizaron por duplicado, en microplacas de poliestireno de 96 pocillos. La solución de reacción contenía 250 µL de reactivo de Bradford [0,1 mg/mL Coomassie Blue, 5 % (v/v) etanol, 8,5 % (m/v) ácido fosfórico] y 5 µL de solución de proteína. La reacción se dejó transcurrir durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se midió la absorción a 620 nm en un lector de microplacas Fluo Star Optima de la marca BMG.

Como blanco se utilizó el buffer de elución de la columna de Co-NTA.

#### **4.13. Ultrafiltración de la SelTryp recombinante de *T. cruzi***

La muestra de SelTryp eluída de la columna de Co-NTA fue sometida a un cambio de buffer y concentración previo a la cromatografía de filtración en gel. Para ello 5,5 mL de muestra conteniendo 250 mg proteína/mL en 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl y 200 mM imidazol fue transferida a un tubo Amicon con filtro de 30 kDa de *cut-off* y diafiltrada por centrifugación a 8.000 *g* a 4°C durante el tiempo necesario para concentrar la muestra hasta un volumen de 500 µL. Luego se agregaron 4,5 mL de 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl y se repitió la centrifugación el tiempo requerido para que la muestra llegara a 500 µL, repitiendo la operación dos veces más. Con este procedimiento se consigue de manera simultánea disminuir la concentración de imidazol hasta al menos 0,2 mM y concentrar unas diez veces a la proteína.

#### **4.14. Cromatografía de exclusión molecular para SelTryp de *T. cruzi***

La cromatografía de exclusión molecular se realizó empleando una columna Superdex G-200 10/300 (GE Healthcare) conectada a un equipo de FPLC (Fast Purification Liquid Chromatography) modelo AKTA (GE-Healthcare). Luego de lavar la columna con dos volúmenes de columna de agua (aprox. 50 mL), esta se equilibró con 2 volúmenes de buffer 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl a un flujo de 0,7 mL/min. A continuación se inyectó 500 µL de la muestra de SelTryp (3,06 mg/mL) y se procedió a la elución con el buffer mencionado anteriormente, colectando automáticamente fracciones de 250 µL.

El peso molecular aproximado de las especies presentes en los principales picos de elución de esta cromatografía fue extrapolado a partir de una curva de calibración (log peso molecular *versus* volumen de retención) realizada en dicha columna con estándares de peso molecular conocidos (ver sección 5.10.)

Cada uno de los picos de elución fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 10 %) y en presencia o ausencia de agente reductor (DTT 10 mM).

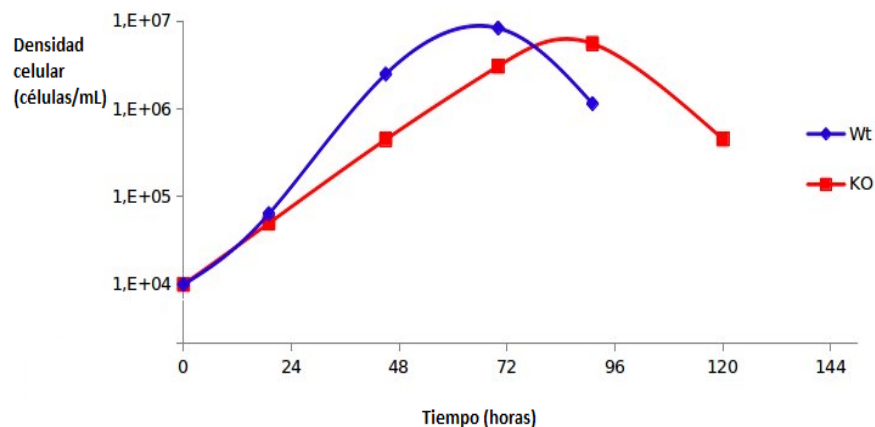
## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Determinación de la curva de crecimiento y tasa de duplicación de línea SepSecS KO de *T. brucei*

Para determinar la curva de crecimiento de la forma sanguínea de *T. brucei* línea celular KO SepSecS y su línea progenitora original (WT; cepa Lister 427 línea celular 449) como control, los parásitos se cultivaron en modo continuo bajo las condiciones ya mencionadas partiendo de una densidad celular de  $1 \times 10^4$  parásitos/mL y efectuando recuentos cada 24hs.

El análisis de la curva de crecimiento de la cepa WT muestra un patrón de crecimiento típico (Fig. 14). En las primeras 48 horas se observa un crecimiento exponencial con un tiempo de duplicación de 6 horas.

Entre las 48 y 72 horas se produce un enlentecimiento en el crecimiento del cultivo, correspondiendo con el ingreso en 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 se debe 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 luego de las 72 horas, y corresponde a la fase de muerte celular, en donde la densidad celular del cultivo desciende abruptamente hasta que la totalidad de los parásitos muere.

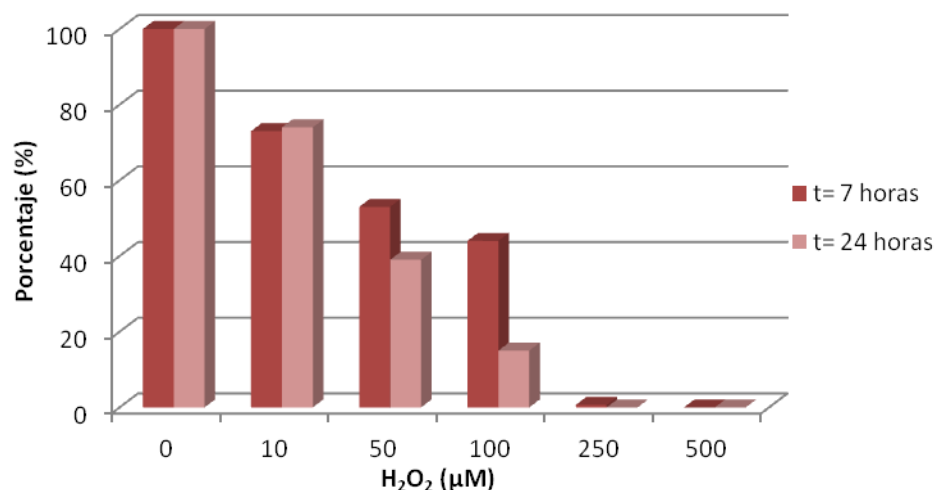


**Fig. 14. Curva de crecimiento de la línea WT y KO SepSecS de *T. brucei*.** Puede observarse el desfase entre ambas, ya que el KO tarda más tiempo en alcanzar la densidad celular máxima (aproximadamente a las 96 horas de iniciado el cultivo, mientras que el WT lo hace alrededor de las 72 horas).

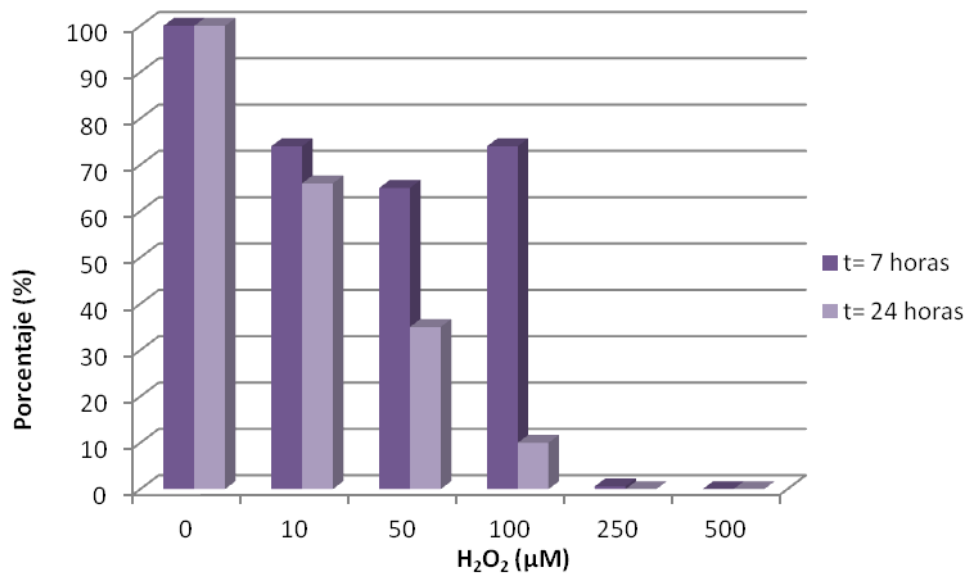
Al comparar las curvas de crecimiento de los parásitos WT y los KO, puede observarse que las mismas están desfasadas. La línea celular KO presenta una tasa de duplicación en la fase exponencial más lenta respecto a la línea WT (6 horas en el WT contra 8 horas en el KO). Esto se traduce en un retardo en alcanzar la fase estacionaria. Por otro lado, la densidad máxima alcanzada por la cepa KO ( $5,5 \times 10^6$  células/mL) es levemente menor a la de la línea WT ( $8,3 \times 10^6$  células/mL). La causa de la menor tasa de proliferación que exhibe la línea KO SepSecS no fue investigada y bien podría plantearse que, al menos en parte, podría deberse a la capacidad disminuida de estas células de contrarrestar estrés oxidativo endógeno. De ser así, los experimentos de desafío con peróxido de hidrógeno deberían poner en evidencia una tolerancia reducida de estos parásitos al oxidante.

## 5.2. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la línea celular SepSecS KO de *T. brucei*

Con la finalidad de analizar el efecto del agente oxidante peróxido de hidrógeno sobre la proliferación de las líneas celulares WT y SepSecS KO de *T. brucei*, cultivos de dichas líneas celulares en fase de crecimiento exponencial con densidad celular  $1 \times 10^5$  células/mL fueron sometidos a concentraciones crecientes de  $H_2O_2$  (0, 10, 50, 100, 250 y 500  $\mu M$ ) durante 24 horas, controlándose mediante citometría de flujo la densidad celular a las 7 y 24 horas de iniciado el tratamiento. A continuación se presentan los resultados para cada línea celular como gráficos de % de células viables respecto al control no tratado en función de las diferentes concentraciones de oxidante y tiempos de exposición (7 y 24 horas).



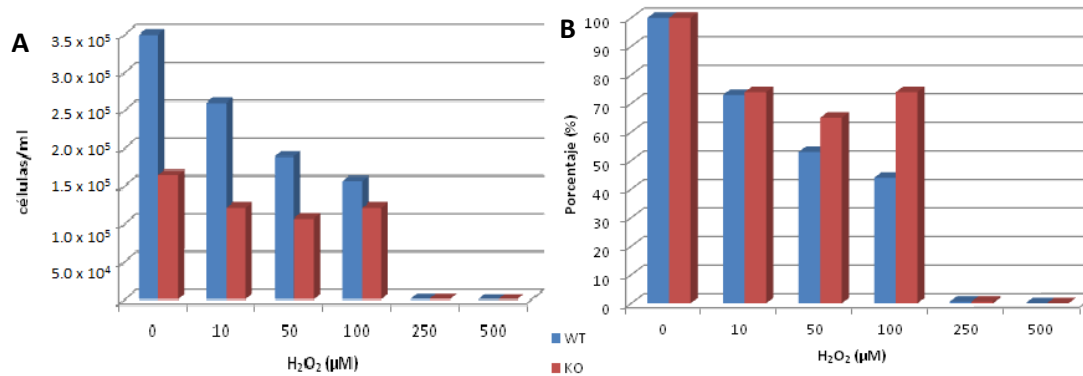
**Fig.15. Estrés por  $H_2O_2$  para la línea celular WT de *T. brucei*.** Se muestran los porcentajes de células viables observados a las 7 y 24 horas de iniciado el experimento para cada una de las concentraciones de  $H_2O_2$  y relativos a los valores obtenidos en el cultivo no tratado.



**Fig.16. Estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la línea celular SepSecS KO de T. brucei.** Se muestran los porcentajes de células viables observados a las 7 y 24 horas de iniciado el experimento para cada una de las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y relativos a los valores obtenidos en el cultivo no tratado.

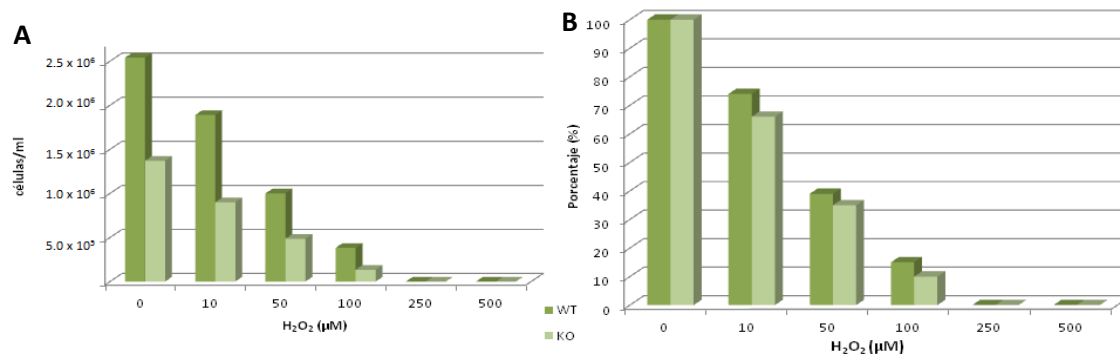
En las Fig. 17 y 18 se comparan los valores de densidad de células viables determinados para cada línea celular (WT y KO) tratada o no con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante diferentes tiempos (7 y 24 horas).

Puede observarse que el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones de 500 y 250 μM resulta ser altamente tóxico para los parásitos. En el caso de la concentración más alta, esta produjo la muerte celular de ambas líneas celulares al cabo de 7 horas de exposición, mientras que a igual tiempo de tratamiento con 250 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la densidad cayó de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL (tiempo 0) a menos de 1.250 células/mL en ambas líneas celulares), no detectándose células vivas a las 24 horas.



**Fig. 17. Estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las líneas WT y SepSecS-KO de T. brucei a las 7 horas.** Comparación del efecto anti-proliferativo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las líneas celulares WT y KO de T. brucei a las 7 horas de tratamiento con distintas concentraciones del oxidante expresado como (A) densidad celular (células viables/mL) o (B) porcentaje de células viables respecto al control no tratado.

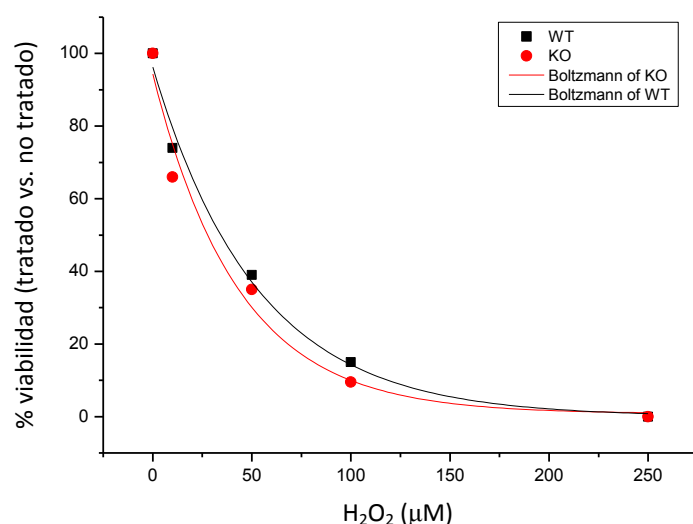




**Fig. 18. Estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las líneas WT y SepSecs-KO de *T. brucei* a las 24 horas.** Comparación del efecto anti-proliferativo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las líneas celulares WT y KO de *T. brucei* a las 24 horas de tratamiento con distintas concentraciones del oxidante expresado como **(A)** densidad celular (células viables/mL) o **(B)** porcentaje de células viables respecto al control no tratado.

Observación: en la cepa KO a 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la densidad celular aumenta a las 7 horas respecto a la observada para el tratamiento con 50 μM oxidante, lo cual se atribuye a errores de manipulación durante el recuento celular.

Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos para cultivos de la línea celular WT y KO iniciados a una densidad celular de 1x10<sup>5</sup> células/mL y tratados durante 24hs con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron empleados para calcular el EC<sub>50</sub><sup>1</sup> durante ese período de tiempo. En estas condiciones se determinaron valores de EC<sub>50</sub> de 34 μM y 27 μM para la línea celular WT y KO de *T. brucei*, respectivamente (Fig. 19). Si bien no se realizó tratamiento estadístico, estas cifras se encuentran en el mismo orden de magnitud.



**Fig. 19. Curva con el ajuste a ecuación de Boltzmann para los cálculos de EC<sub>50</sub>.** En negro y en rojo se muestran las curvas correspondientes a la cepa WT y KO respectivamente.

<sup>1</sup> EC<sub>50</sub> o concentración eficaz 50, es la concentración de compuesto que inhibe o reduce la proliferación celular o viabilidad celular en un 50% respecto del control no tratado en un tiempo determinado.

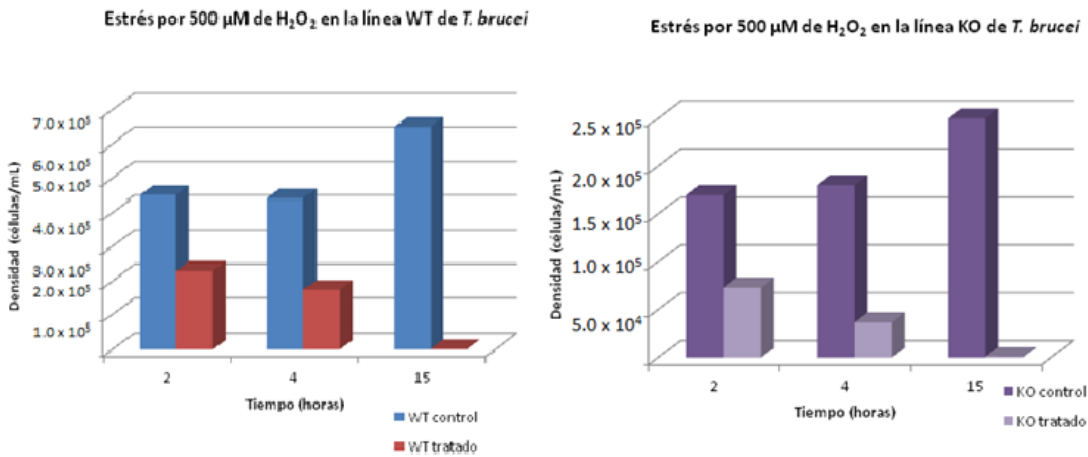
Un fenómeno que llamó la atención es el no haber obtenido un claro comportamiento dosis-respuesta para la cepa KO SepSecS tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por tiempos cortos (7 horas; Fig. 17). Este efecto deja de observarse cuando el análisis se realiza 24 horas posteriores al inicio del tratamiento con el agente oxidante (Fig. 18). En estas condiciones ambas líneas celulares muestran una sensibilidad similar frente a las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ensayadas. Estos resultados también permiten descartar que la menor tasa de proliferación que presenta la línea KO SepSecS (Fig. 14) tenga su origen en una capacidad reducida de estas células para hacer frente a estrés oxidativo endógeno.

En concordancia con lo reportado por Aeby y col. (2009), nuestros resultados muestran que la línea defectiva en la síntesis de Sec (SepSecS KO) tendría igual capacidad que la línea parental para hacer frente al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La disparidad de estos resultados respecto a los obtenidos por Costa y col. (2011) puede deberse a las diferentes aproximaciones experimentales empleadas en cada uno de estos trabajos. Por ej., Costa y col. llevaron a cabo los ensayos de estrés oxidativo sobre una línea celular con niveles bajos (ARNi inducido) y normales (ARNi no inducido) de SPS2 sometida a condiciones de crecimiento subóptimas (es decir con renovación del medio de cultivo cada 4 días, cuando las cultivos se encontraban en fase de crecimiento estacionario o bien de muerte celular), los cuales indicaron una mayor sensibilidad al oxidante cuando la biosíntesis de Sec se hallaba reprimida (ARNi inducido de SPS2). En nuestro trabajo los ensayos se realizaron en condiciones óptimas de cultivo (medio de cultivo fresco) y con células que se hallaban en fase exponencial de crecimiento.

A continuación se procedió al análisis del efecto del tratamiento por tiempos más cortos (2, 4 y 15 hs) con 50 y 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cultivos con distintas densidades de parásitos (1 x 10<sup>4</sup>, 5 x 10<sup>4</sup>, 1 x 10<sup>5</sup> y 5 x 10<sup>5</sup> parásitos/mL).

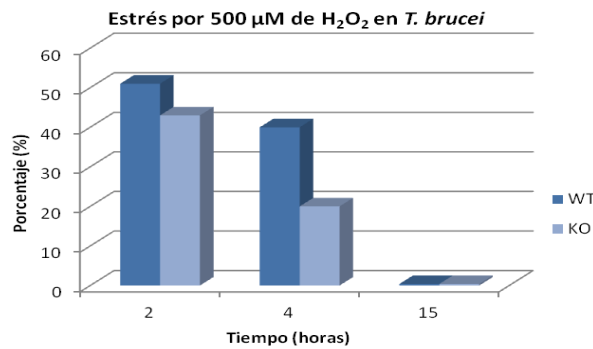
**Tabla 2. Densidades celulares (células/ mL) obtenidas luego del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM de las línea WT y KO SepSecS a diferentes tiempos.**

WT	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tiempo (horas)		
		2	4	15
5.0 x 10 <sup>5</sup>	-	4.5 x 10 <sup>5</sup>	4.4 x 10 <sup>5</sup>	6.5 x 10 <sup>5</sup>
	+	2.3 x 10 <sup>5</sup>	1.75 x 10 <sup>5</sup>	0.25 x 10 <sup>4</sup>
KO				
5.0 x 10 <sup>5</sup>	-	1.7 x 10 <sup>5</sup>	1.8 x 10 <sup>5</sup>	2.5 x 10 <sup>5</sup>
	+	7.3 x 10 <sup>4</sup>	3.7 x 10 <sup>4</sup>	<1000



**Fig.20. Densidades celulares de las líneas WT y KO SepSecS luego de 2, 4 y 15 horas de tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$ .**

En el ensayo en que se sometió a ambas líneas celulares (WT y KO) a 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , se observó una disminución progresiva del número de células viables, que fue proporcional al tiempo de exposición al agente oxidante. Por ejemplo, para la línea celular WT se observó que a las 2, 4 y 15 horas de exposición al  $\text{H}_2\text{O}_2$  la densidad de células viables descendió un 49, 60 y 99,6 %, respectivamente. Para la línea celular KO la disminución de la densidad de células viables fue de 67, 80 y 99,6 %, respectivamente (ver Fig. 20.)



**Fig. 21. Comparación del porcentaje de células viables relativas al control no tratado para las líneas celulares WT y KO SepSecS de *T. brucei* expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$  durante 2, 4 y 15 horas.**

De acuerdo a estos resultados los parásitos KO SepSecS se muestran ligeramente más sensibles al estrés oxidativo. A tiempos cortos, 2 y 4 horas, de exposición, la densidad celular de los cultivos de parásitos KO SepSecS desciende en mayor porcentaje que para la línea WT. Este comportamiento de la línea celular KO SepSecS pasó desapercibido en los experimentos realizados anteriormente, debido a que estos se iniciaban con una densidad de células menor (anterior  $1 \times 10^5$  células/mL vs. actual  $5 \times 10^5$  células/mL) y la viabilidad se determinaba al cabo de 7 hs de iniciado el

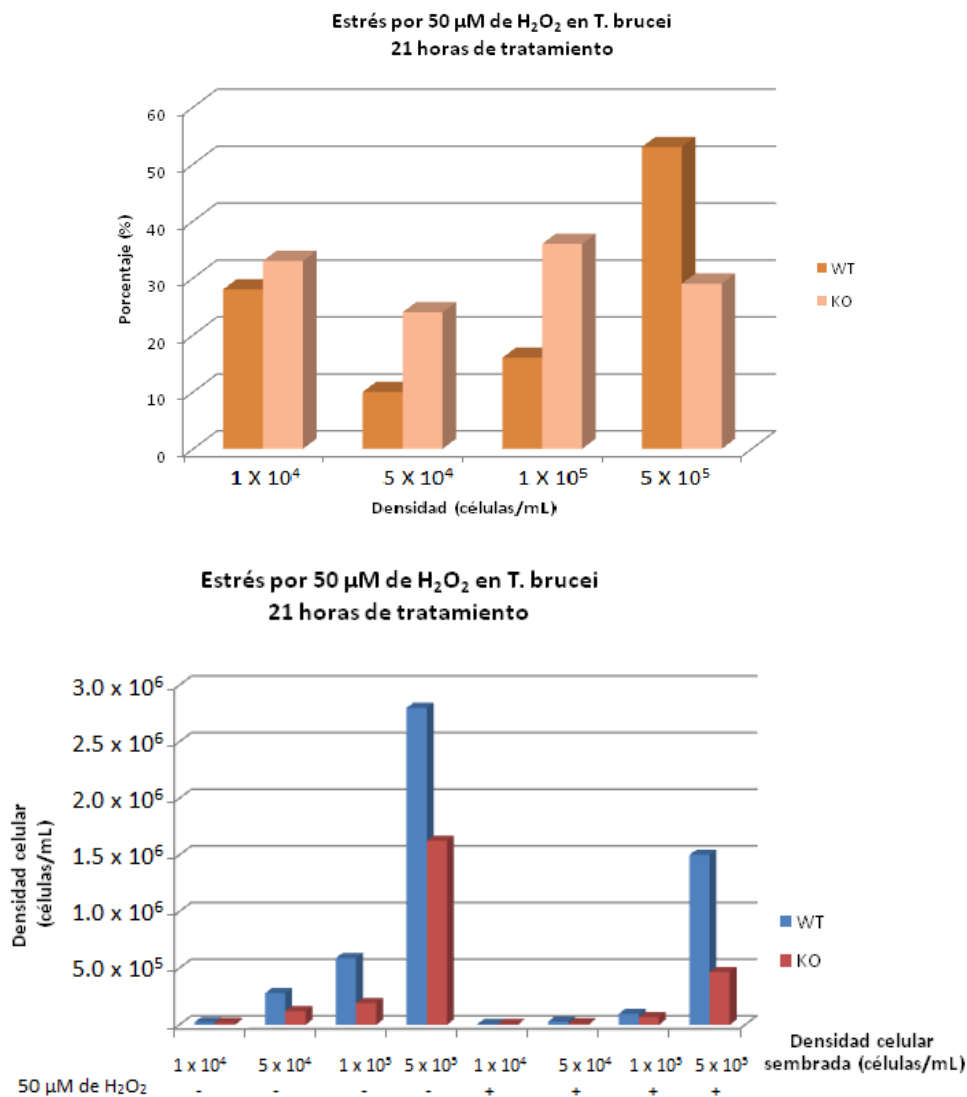
tratamiento contra tiempos más cortos empleados en este último ensayo (2 y 4 hs). En aquellas condiciones al cabo de 7 hs se observaba la muerte total de los cultivos de cepa KO y WT tratada con 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 15 y 17).

**Tabla 3. Evaluación del crecimiento de cultivos de las líneas WT y KO *Sep-SecS* sembrados a distintas densidades celulares y expuestas o no durante 21 horas a 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

	Control (cel./mL)	Promedio	Con $\text{H}_2\text{O}_2$ (cel./mL)	Promedio	KO	Control (cel./mL)	Promedio	Con $\text{H}_2\text{O}_2$ (cel./mL)	Promedio
$1 \times 10^4$	$3 \times 10^4$ $1,5 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$0,4 \times 10^4$ $0,9 \times 10^4$	$0,6 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$ $2 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$0,4 \times 10^4$ $0,75 \times 10^4$	$0,6 \times 10^4$
$5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$ $3 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$ $4 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$ $1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$2 \times 10^4$ $3,7 \times 10^4$	$3 \times 10^4$
$1 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$ $6 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$9,5 \times 10^4$ $9,7 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$ $2,2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$6 \times 10^4$ $7,7 \times 10^4$	$7 \times 10^4$
$5 \times 10^5$	$3 \times 10^6$ $2,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$ $1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	$1,75 \times 10^6$ $1,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$4,8 \times 10^5$ $4,5 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$

Si bien los resultados obtenidos corresponden a cultivos iniciados con parásitos en fase de proliferación exponencial y, excepto por el estímulo oxidante, incubados en condiciones óptimas de crecimiento, los mismos coinciden con los obtenidos por Costa y col. para una línea depletiva en síntesis de Sec sometida a condiciones subóptimas de crecimiento y estrés oxidativo (Costa *et al* 2011).

Por otro lado, se realizó un ensayo de tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en placa de cultivo de 24 pocillos conteniendo 1 ml de cultivo con densidades celulares de  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  células/mL. El recuento se realizó a las 21 horas de agregado el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los resultados se presentan en la tabla 3.



**Fig. 22. Densidades celulares, expresadas en células/mL respecto al control, resultado de un ensayo de estrés con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre diferentes densidades celulares de las líneas WT y KO en 21 horas.**

Los resultados del tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$  durante 21 horas muestran un efecto del peróxido sobre los parásitos de ambas líneas celulares que es dependiente de la densidad celular inicial del cultivo, donde a mayores densidades celulares iniciales menor efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la proliferación celular. Cuando los valores correspondientes a los cultivos tratados se relativizan respecto a los controles no tratados, se vuelve a encontrar una relación entre efecto citotóxico del  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$  y la densidad celular inicial en particular para los experimentos iniciados a densidades celulares de siembra  $\geq 1 \times 10^4$  células/mL con la cepa WT. Algo similar sucede para la cepa KO aunque la tendencia se invierte en cultivos sembrados a alta densidad ( $5 \times 10^5$  células/mL), condición en la cual se observa una sensibilidad al peróxido similar o mayor a la de cultivos iniciados a una densidad celular 5 veces inferior ( $1 \times 10^5$  células/mL). Si bien este fenómeno no fue estudiado en detalle podría especularse que cultivos sembrados a alta densidad están próximos a alcanzar la fase estacionaria de

crecimiento, condición en la cual parásitos con deficiencia en la síntesis de Sec eran más susceptibles a estrés oxidativo (Costa y col. 2009).

### 5.3. Capacidad infectiva de *T. brucei* defectivo en síntesis de Sec

Para determinar la infectividad de la cepa KO Sep-SecS de *T. brucei* se realizaron dos ensayos incluyendo un total de 24 ratones, estos fueron infectados mediante una única inyección intraperitoneal de  $1 \times 10^4$  parásitos de la forma sanguínea suspendidos en 0,3 mL de medio fresco HMI-9 completo. Los grupos experimentales fueron los siguientes: animales infectados con la cepa WT de *T. brucei*, y animales infectados con la cepa KO. El estado de salud y supervivencia de los animales fue monitoreado diariamente buscando signos de dolor o malestar y los niveles de parasitemia fueron determinados regularmente en muestras de sangre extraídas del seno submandibular.

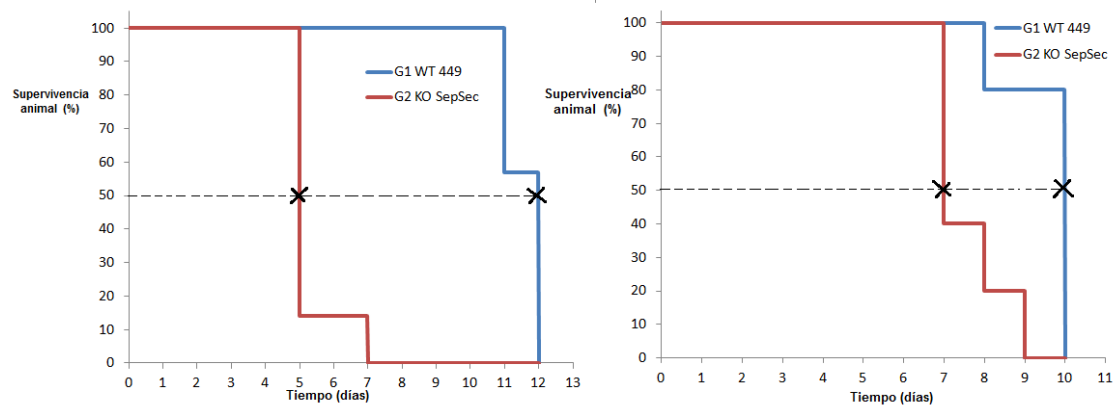
Dado que las líneas celulares de *T. brucei* empleadas en este trabajo son monomórficas, y por lo tanto incapaces de diferenciarse a la forma “*short stumpy*”, este modelo experimental permite evaluar la importancia del metabolismo de Sec durante una infección aguda.

Los datos se presentan bajo la forma de una curva de supervivencia del tipo Kaplan-Meier en la Fig. 23. El primer ensayo fue realizado con un  $n=7$  por grupo y la tasa de supervivencia media (el tiempo que tarda la población de ratones en disminuir al 50%) calculado a partir de la curva de sobrevivencia es inferior a los 5 días para los ratones infectados con la línea KO y más del doble (aproximadamente 12 días) para los ratones infectados con la línea WT. Con el fin de verificar estos resultados, es decir la mayor capacidad infectiva exhibida por parásitos KO en SepSecS, se realizó un segundo ensayo *in vivo* con un  $n=5$ . En este caso la tasa de supervivencia media fue de 7 días para la línea KO y de 10 días para los ratones infectados para la línea WT. Si bien esta vez la diferencia en la tasa de supervivencia de los animales de cada grupo fue menor, nuevamente se observa una mayor infectividad de la cepa KO respecto de la WT.

Para determinar si dichas diferencias en el perfil de supervivencia son significativas entre ambos grupos, se aplicó el test estadístico de *log rank* (Bewick *et al.* 2004). Los valores de probabilidad (p) obtenidos para el primer y segundo experimento fueron de 0,0129 y 0,023, respectivamente. Seleccionando un grado de confianza del 95%, el cual resulta adecuado para el n de animales empleado en estos experimentos, valores de  $p < 0,05$  indican que los resultados obtenidos en ambos ensayos reflejan diferencias significativas en la supervivencia de los grupos infectados con cepa KO y WT.

**Tabla 4. Supervivencia de ratones infectados con las líneas WT y KO de *T. brucei*.** Los valores están expresados como porcentaje de animales. A la izquierda se presentan los datos del primer ensayo con un n=7 por grupo, y a la derecha los de un segundo ensayo con un n=5 por grupo.

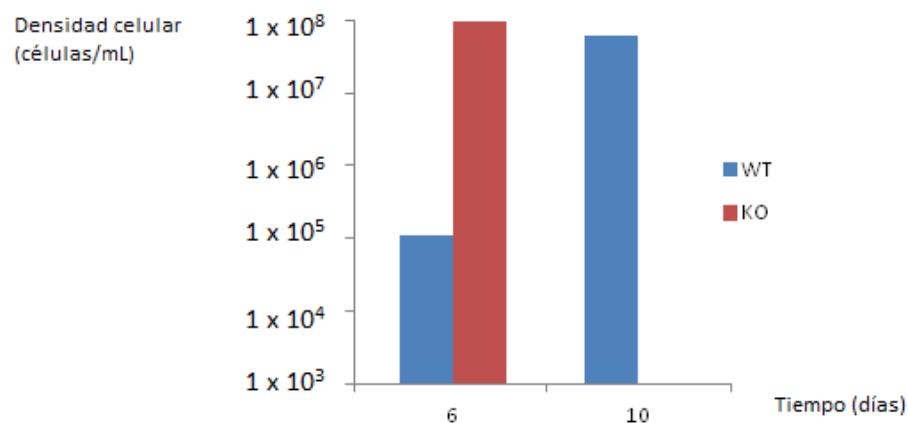
Días	G1 WT 449	G2 KO SepSec	Días	G1 WT 449	G2 KO SepSec
0	100	100	0	100	100
1	100	100	1	100	100
2	100	100	2	100	100
3	100	100	3	100	100
4	100	100	4	100	100
5	100	14	5	100	100
6	100	14	6	100	100
7	100	0	7	100	40
8	100	0	8	80	20
9	100	0	9	80	0
10	100	0	10	0	0
11	57	0			
12	0	0			



**Fig.23. Supervivencia animal.** Un total de 24 ratones hembras BALBc/J de 6-8 semanas de edad fueron infectadas intraperitonealmente con  $1 \times 10^4$  parásitos infectivos suspendidos en 0,3 mL de medio fresco HMI-9. La salud y supervivencia de los animales fue monitoreada diariamente, los datos se presentan en la forma de una curva Kaplan–Meier.

**Tabla 5. Primer ensayo de infección. Niveles de parasitemia en ratones infectados con *T. brucei* cepa WT y KO SepSecS (células/mL). ND, indica no determinado debido a deceso del animal.**

Cepa WT	Nº del ratón						
	0	2	3	20	0`	2`	20`
Días post-infección							
6	$5 \times 10^4$	0	$1,25 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	0	0	$5 \times 10^4$
10	$3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	$5,5 \times 10^5$	$9 \times 10^5$	$5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$
Cepa KO							
6	$9,8 \times 10^7$	ND	ND	ND	ND	ND	ND



**Fig.24. Parasitemia en animales correspondientes al primer ensayo de infección.** Para el grupo infectado con *T. brucei* WT los valores de parasitemia en sangre corresponden al promedio obtenido al día 6 (n=4) y 10 (n=7), mientras que se muestra el valor de parasitemia alcanzado en el único animal sobreviviente al día 6 en el grupo infectado con la cepa KO.

**Tabla 6. Segundo ensayo de infección. Niveles de parasitemia (células/ mL) en ratones infectados con *T. brucei* cepa WT y KO SepSecS. ND, indica no determinado debido a deceso del animal.**

Cepa WT	Nº del ratón				
	0	2	3	20	30
Días post-infección					
3	$3,3 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$8 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6$
5	$4,5 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	ND	ND	ND
Cepa KO					
3	$2,7 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	$9 \times 10^5$	$3,25 \times 10^5$	$2,25 \times 10^5$
5	$2,25 \times 10^5$	ND	ND	ND	ND



De acuerdo a los datos recabados, la línea KO resulta ser más infectiva y/o virulenta que la línea WT dado que en ambos ensayos se observó una menor tasa de sobrevivencia de los ratones infectados con la línea KO respecto de aquellos inoculados con la línea WT.

Estos resultados ponen claramente en evidencia que el metabolismo de Sec, y por lo tanto las selenoproteínas, no es indispensable para el establecimiento de la infección ni para la sobrevivencia del parásito durante la fase aguda de la enfermedad en este modelo experimental. En principio, este comportamiento puede no ser el esperado teniendo en cuenta los experimentos de respuesta a estrés oxidativo reportados por Costa y col. (2011) y los obtenidos en el presente trabajo que le adjudican a las líneas deplegadas en Sec una menor tolerancia a un oxidante fisiológico como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Algunas de las hipótesis que podrían explicar este fenómeno podrían ser: i) que durante la infección aguda los parásitos no están sometidos a una carga importante de estrés oxidativo, ii) que la alta tasa de proliferación *in vivo* de *T. brucei* impide la acumulación de daño oxidativo que pueda poner en peligro a la nueva progenie, iii) que el rol de las selenoproteínas de *T. brucei* no está asociado a la protección contra daño oxidativo, iv) la existencia de algún rol regulatorio de las selenoproteínas en la infección del parásito. El parásito bien podría recurrir a vías alternativas para la incorporación de Sec del medio extracelular (que vale la pena destacar es extremadamente baja, aprox. 50 ng Se/g plasma; Encinar *et al.* 2004) como ser transportadores específicos y eficientes, análogos a los empleados para incorporar cisteína (Duszenko *et al.* 1985; Duszenko *et al.* 1992) o bien mediante endocitosis y degradación de Selp humana, una proteína abundante del plasma. Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, el hecho que este aminoácido no pueda ser incorporado exógenamente al ARNt correspondiente sino sintetizado directamente sobre este descarta la posibilidad que una célula deficiente en SepSecS sea capaz de generar Sec y por lo tanto selenoproteínas, tal como lo verificó Aeby y col. (2009).

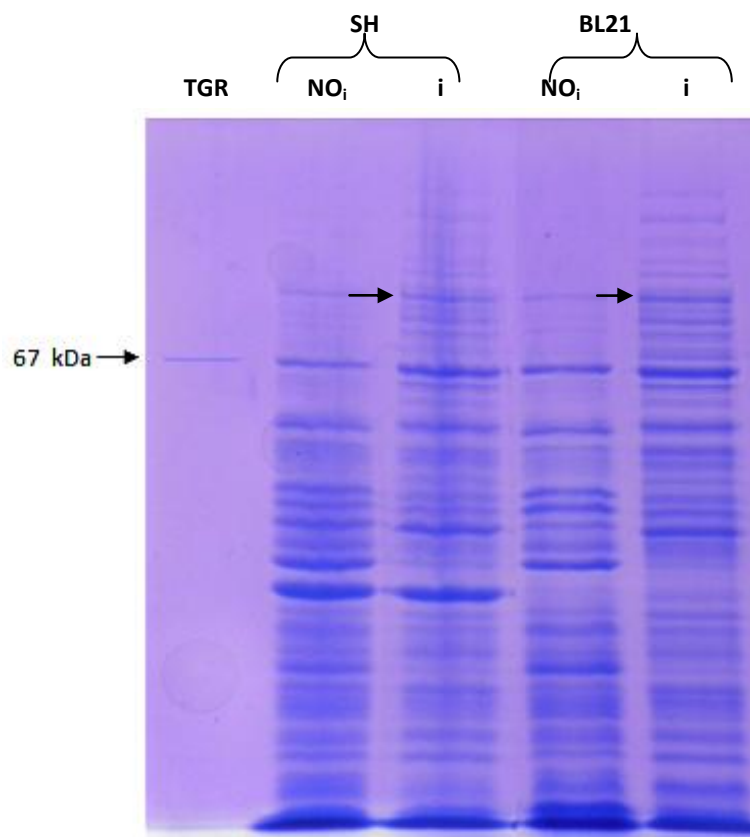
Ciertamente, lo que resulta difícil de explicar es la mayor infectividad exhibida por la cepa KO en SepSecS. Algunas especulaciones en este sentido incluyen la posibilidad que ciertas selenoproteínas del parásito cumplan un rol regulador de la proliferación celular *in vivo* (al menos *in vitro* se observó que la falta de SepSecS causó un retardo en el crecimiento celular sin afectar la densidad celular máxima alcanzada con respecto a la cepa WT) del patógeno y/o de la respuesta del hospedero a este último. En ambos casos, la pérdida de la función produciría un crecimiento descontrolado del patógeno o una respuesta deficiente por parte del hospedero que derivaría en un desarrollo más rápido de la enfermedad. Otra posibilidad es que la función de las selenoproteínas en los parásitos KO de SepSecS haya sido compensada mediante la sobreexpresión de proteínas funcionalmente relacionadas pero Cys-dependientes. Si este fuera el caso, los resultados de respuesta a estrés oxidativo obtenidos aquí y reportados por Costa y col. (2011) sugieren que esta compensación es parcial ya que la cepa KO mostró una

mayor sensibilidad al estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto de la cepa WT. Evidentemente la resolución de este interrogante requerirá de nuevos estudios que deberán incluir la elucidación de la actividad biológica de las selenoproteínas.

#### 5.4. Producción de SelTryp en *Escherichia coli* cepa SH y BL21

En primera instancia, se llevó a cabo la inducción de la expresión de *T. cruzi* SelTryp en las cepas de *E. coli* SHuffle™ y BL21 DE3 transformadas con el plásmido pFI01 y crecidas a 16°C, con el objetivo de determinar cuál de estas rinde un mejor producto en cantidad y calidad.

A pesar que ambas cepas llevaron a la producción de Seltryp en forma insoluble, se optó por la cepa BL21 DE3 ya que los niveles de expresión de la proteína recombinante fueron levemente mayor en esta última tal como puede observarse en la siguiente figura (Fig. 25).

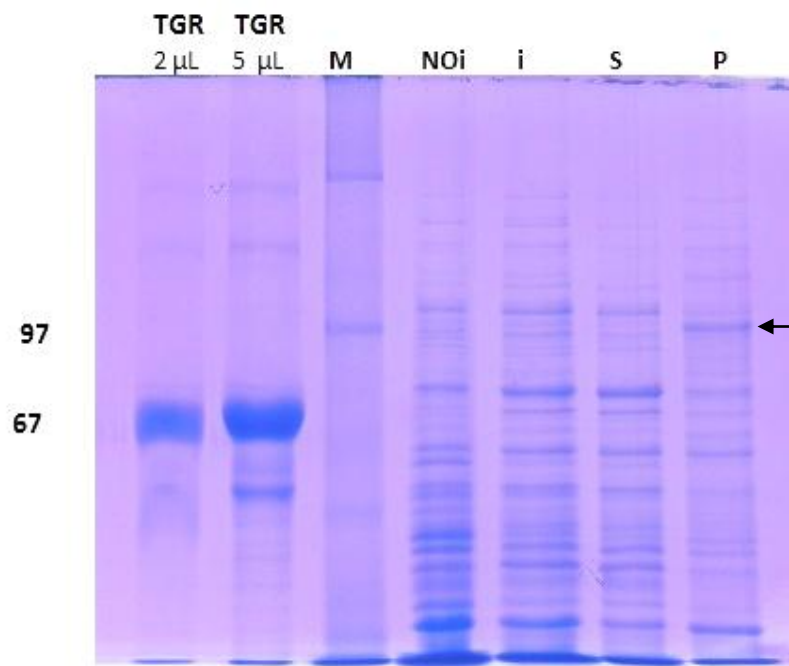


**Figura 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de las inducciones realizadas a 16 °C en las cepas de *E. coli* SHuffle™ (SH) y BL21 DE3.** TGR, proteína control de 67 kDa; NO<sub>i</sub>, extracto total de células de cultivos no inducidos; i, extracto total de células de cultivos inducidos. Las flechas indican las bandas correspondientes a SelTryp en los cultivos inducidos.

### 5.5. Solubilidad de SelTryp producida en *E. coli* BL21 DE3 a 37°C

La expresión de SelTryp se realizó a partir de un cultivo de *E. coli* BL21 DE3 en 500 mL de LB-kan a 37°C inducido a una DO = 1, con el objetivo de determinar si bajo estas condiciones era posible obtener la proteína en forma soluble.

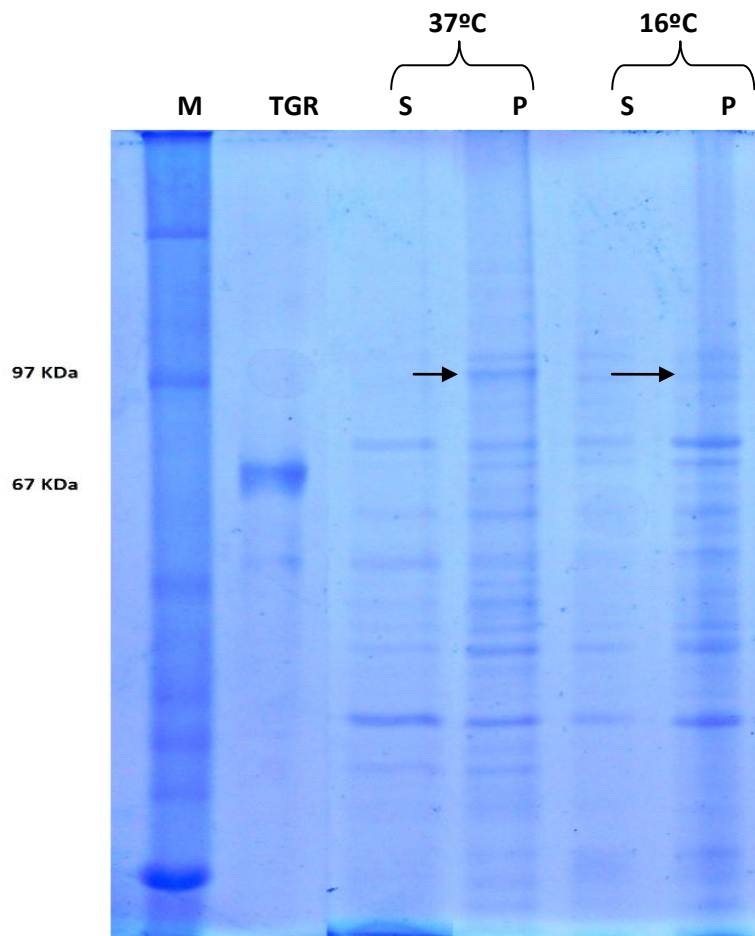
En la Fig.26. puede observarse una banda con el peso molecular correspondiente a SelTryp solo en muestras correspondientes a la fracción insoluble del cultivo inducido. La determinación de la identidad de esta banda se llevó a cabo por análisis de espectrometría de masas de péptidos trípticos de muestras extraídas del gel (determinación realizada por la Unidad de Bioquímica Analítica y Proteómica del Institut Pasteur de Montevideo). Con un grado de cobertura total de la secuencia del 31 % se pudo confirmar que esta banda corresponde a SelTryp de *T. cruzi*. (Ver apéndice 1).



**Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% de la inducción realizada en la cepa *E. coli* BL21 DE3.** TGR, proteína control de 67 kDa; M, marcador de peso molecular; NOi, extracto total de células de cultivos no inducidos; i, extracto total de células de cultivos inducidos; S, fracción soluble; P, fracción insoluble. La flecha indica la banda correspondiente a SelTryp.

## 5.6. Comparación de la producción de SelTryp en *E. coli* BL21 DE3 a 16 y 37 °C

Con el fin de investigar si la temperatura del cultivo puede ser una variable que afecte la solubilidad de la proteína, se llevó a cabo la expresión de Seltryp en cultivos de *E. coli* BL21 DE3 transformadas con el vector pFI01 crecidas a 16 °C y a 37°C luego de la inducción. Tal como se puede observar en el gel de la Fig.27, a ambas temperaturas SelTryp fue recuperada en la fracción insoluble, siendo ligeramente superior la cantidad de proteína recombinante obtenida a 37°C por lo que se selecciona esta temperatura de cultivo para futuros trabajos de expresión con fines preparativos.



**Figura 27. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% correspondiente a la inducción realizada en *E. coli* BL21 DE3 a 16°C y 37°C.** M, marcador de peso molecular; TGR, proteína control de 67 kDa; S, fracción soluble; P, fracción insoluble. Como se aprecia, la banda correspondiente a SelTryp está presente en la fracción insoluble tanto a 16°C como a 37°C, siendo mayor la cantidad de proteína recombinante obtenida en el cultivo realizado a 37°C.

## **5.7. Purificación de SelTryp de cuerpos de inclusión y renaturalización por diálisis**

Dado que SelTryp se recuperó en la fracción insoluble, se purificaron los cuerpos de inclusión por el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, y se solubilizaron las proteínas de los cuerpos de inclusión en varias etapas: inicialmente los cuerpos de inclusión se resuspendieron en 10 mL de un buffer conteniendo 8 M urea como agente caotrópico, 10 mM Mercaptoetanol y 20 mM glutatión reducido (GSH). La solución se conservó toda la noche en heladera a 8 °C en agitación. Posteriormente se diluyó con 17 mL de un buffer de la siguiente composición: 0,025 M Tris base (pH 9), 6 mM glutatión oxidado (GSSG) y 0,5 M Arg; resultando en una solución que contiene: 2 M urea, 0,31 M Arg, 3,7 mM Mercaptoetanol, 7,4 mM GSH, 3,7 Mm GSSG, 15,75 mM Tris, pH 8. Esta solución fue incubada a 4 °C con agitación durante 12 horas y luego se diluyó a 1 M urea con buffer 0,1 M Tris base pH 8, resultando en una solución conteniendo 1M urea y 0,1 M arginina.

Con el fin de remover la urea y renaturalizar a SelTryp 40 ml de la solución de SelTryp 1M urea y 0,1 M arginina fueron transferidas a una membrana de diálisis de poro de 10 kDa (SelTryp tiene un peso molecular aproximado de 93 kDa) y se procedió a la diálisis a 4 °C contra 4 L de buffer 20 mM Tris base pH 8 conteniendo 300 mM NaCl. Al cabo de 24 horas se reemplazo el medio de diálisis por otros 4 L de buffer fresco con el fin de efectuar el equivalente a una dilución 1:10.000 (o 2 diluciones 1/100) de los solutos de bajo peso molecular presentes en la muestra de proteína.

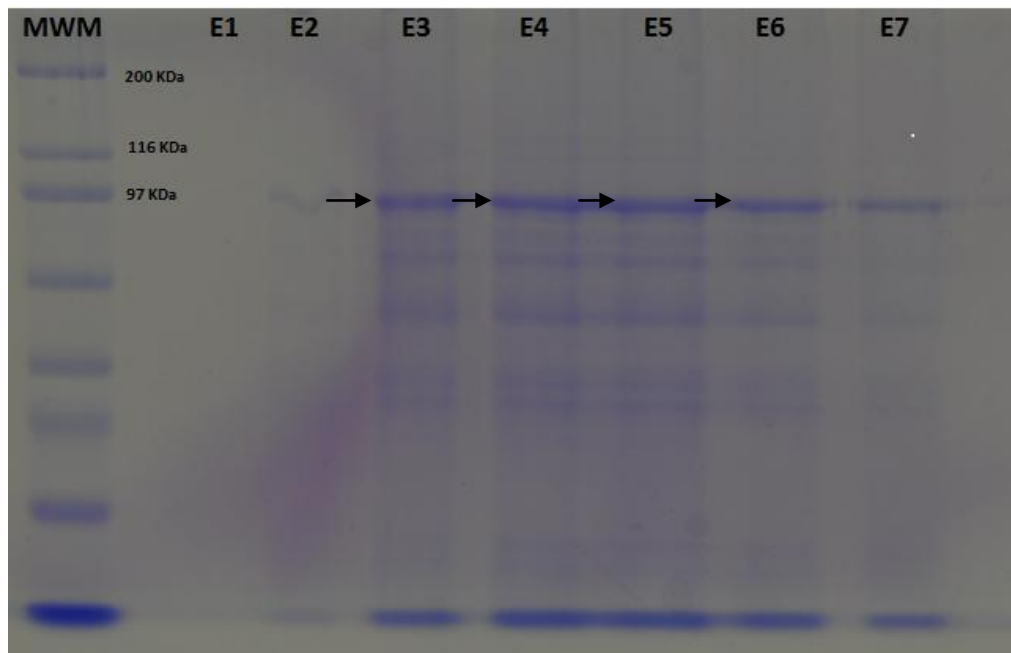
Este intento fue infructuoso ya que a las 12 horas de iniciada la diálisis, con los primeros 4 L de buffer, SelTryp se encontró completamente precipitada. Por lo tanto, los siguientes estudios persiguieron la identificación del (de los) componente(s) del buffer responsable(s) de mantener soluble a la proteína.

## **5.8. Identificación del factor solubilizante de SelTryp**

Debido a que SelTryp precipitó durante la realización de la diálisis cuya finalidad era extraer la urea y la Arg, se realizó un cambio de buffer en una matriz de Sephadex G25 (columna PD-10) que permite separar de manera rápida los componentes de bajo peso molecular de aquellos de mayor peso molecular como las proteínas que presentarán un tiempo de retención más corto ya que por su tamaño no migrarán a través de los canales de la matriz, y de esta forma establecer cuál(es) de dichos componentes es (son) el(los) responsable(s) de mantener soluble a la proteína. Se empleo como buffer de equilibrado y elución 1 M urea, 70 mM Tris, 10 mM imidazol, pH 8,0 para cuando se intentó eliminar la Arg, y 0,1 M Arg, 70 mM Tris, 10 mM imidazol, pH 8,0 cuando se intentó la urea (ver Materiales y Métodos para mayores detalles).

Macroscópicamente se aprecia que al quitar la urea por exclusión molecular la solución se vuelve turbia y opalescente, mientras que al mantener este aditivo y remover la Arg la solución permanece más transparente.

En las fracciones de elución número 3 a 6 parecería ser donde hay mayor concentración de SelTryp (Fig. 28), la cual se obtiene con relativo enriquecimiento de los cuerpos de inclusión. Estos resultados confirmaron que la urea es el componente que mantiene soluble a la proteína recombinante.



**Figura 28.** Imagen del gel de poliacrilamida en las que se corrieron las fracciones de elución (E1 a E7) obtenidas del cambio de buffer en columna PD10 donde se extrajo la Arginina y se mantuvo la Urea. Puede observarse que la mayor concentración de SelTryp se halla en los eluatos 3 al 6 (indicados con flechas). MWM, marcador de peso molecular.

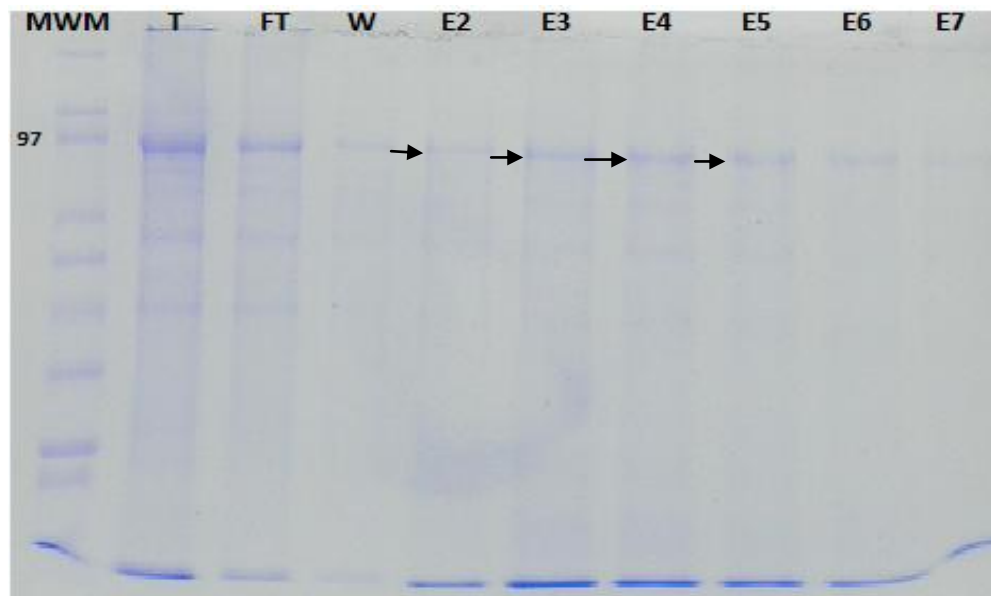
### 5.9. Purificación de SelTryp por cromatografía de afinidad por metales

Teniendo en cuenta que la diálisis resultara en la precipitación completa de SelTryp (al extraer la urea y Arg) y que la urea fuera identificada como el componente que mantiene a SelTryp soluble, se gel filtró SelTryp en una columna PD10 con el fin de remover la arginina, la cual interfiere con la subsecuente purificación por cromatografía de metales, y conservar la urea.

Se pasaron 3 x 2,5 mL de la solución de SelTryp (conteniendo 1M urea y 0,1M Arg) por columna PD10 y, paso seguido, el pool de eluatos (volumen total 12 mL) se inyectó en una columna de Co-NTA equilibrada en buffer 20 mM Tris, 200 mM Imidazol, 150 mM

NaCl, pH 8,0. La columna fue luego lavada con 1 M urea, 70mM Tris, 10mM imidazol pH 8,0 y la proteína eluída con buffer de elución 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8,0.

La purificación fue poco eficiente, ya que se constata, por medio de electroforesis, que se obtuvieron eluatos en que la proteína de interés está presente en baja concentraciones (principalmente en los eluatos 2 al 5) y una buena cantidad de SelTryp se pierde en el material no unido y el lavado (Fig. 29).



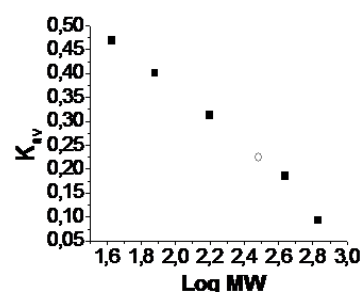
**Fig.29. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, en que se corrieron las fracciones de elución obtenidas a partir de la columna de Co-NTA (E2 a E7).** M, marcador de peso molecular; T, muestra cargada a la columna de Co-NTA; FT: material no unido por la columna; W, lavado con buffer de 1M urea. En los eluatos 2 al 5 es donde SelTryp se halla en mayor concentración y nivel de pureza (indicado con flechas)

La concentración de proteína determinada en la muestra producto de la purificación por cromatografía de afinidad por metales (eluatos E2 a E7) fue de 250 µg/mL de acuerdo al método de Bradford (ver sección 4.12.).

### **5.10. Determinación de la conformación oligomérica de la forma recombinante de SelTryp de *T. cruzi***

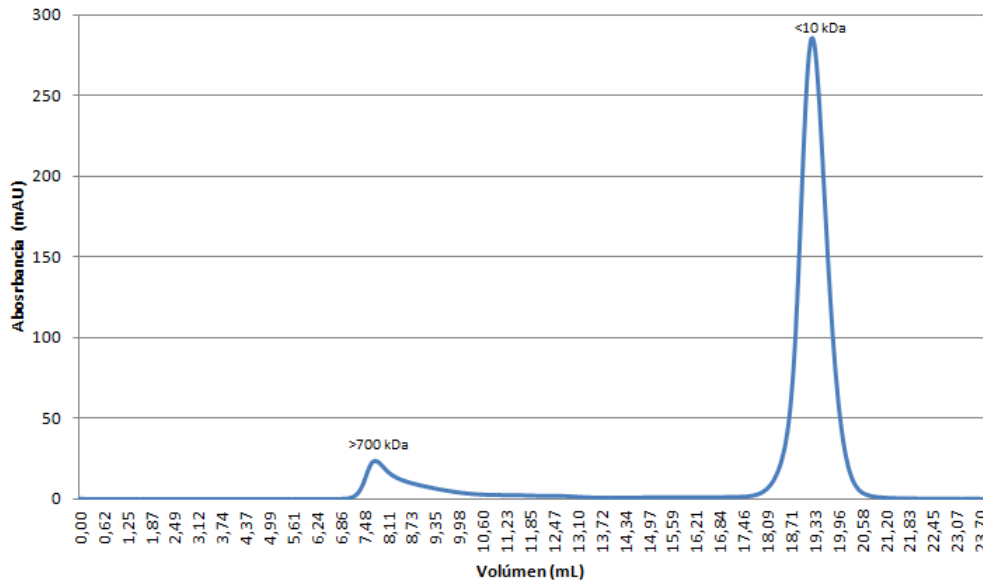
Luego del pasaje de la muestra de SelTryp por columna de Co-NTA, extraer el imidazol y concentrarla por centrifugación, se realizó un segundo paso de purificación de la proteína por cromatografía de filtración en gel para obtenerla con un grado de pureza mayor al que se disponía y a la vez extraer datos preliminares sobre su conformación

oligomérica. El perfil cromatográfico de una muestra de SelTryp separada en una columna de exclusión molecular Sephadex G-200 10/300 (ver Fig. 31) muestra la presencia de dos picos de elución principales, y tres picos muy pequeños. El primer pico se observa aproximadamente a los 7,8 mL, correspondiendo con el volumen de exclusión de la columna (aprox. 7 mL). Las especies que eluyen con tal volumen de retención corresponden a proteínas o complejos proteicos oligoméricos que presentan un peso molecular por encima de los 700 kDa y que por lo tanto su migración a través de la matriz de la columna no se vio alterada. El otro pico principal se encuentra aproximadamente a los 19,3 mL, próximo al volumen total de la columna (24 mL aprox.), correspondiendo a especies de bajo peso molecular (<10 kDa) según lo calculado a partir de la curva de calibración. Los picos más pequeños se observan a los 11,5, 12,6 y 14,9 mL, correspondiendo a proteínas con pesos moleculares aparentes de 270, 160 y 55 kDa, respectivamente.

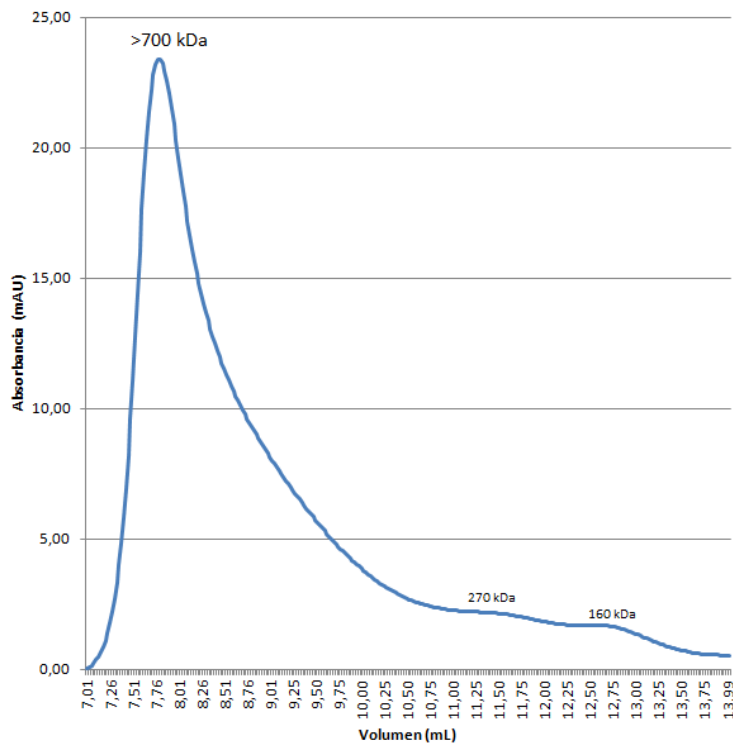


**Figura. 30. Curva de calibración** (log peso molecular *versus* volumen de retención) realizada en dicha columna con estándares de peso molecular conocidos. Las proteínas estándar utilizadas y sus pesos moleculares correspondientes fueron Tiroglobulina 660 kDa, Ferritina 440 kDa, Aldolasa 158 kDa, Conalbúmina 75 kDa y Ovoalbúmina 43 kDa.





**Fig.31. Cromatografía de exclusión molecular de SelTryp en columna Superdex G200 10/300.** En el eje Y se indican las unidades relativas de absorción a 280 nm y en el eje X el volumen de retención, señalándose el peso molecular aproximado de los picos más prominentes, el cual fue calculado a partir de la curva de calibración.

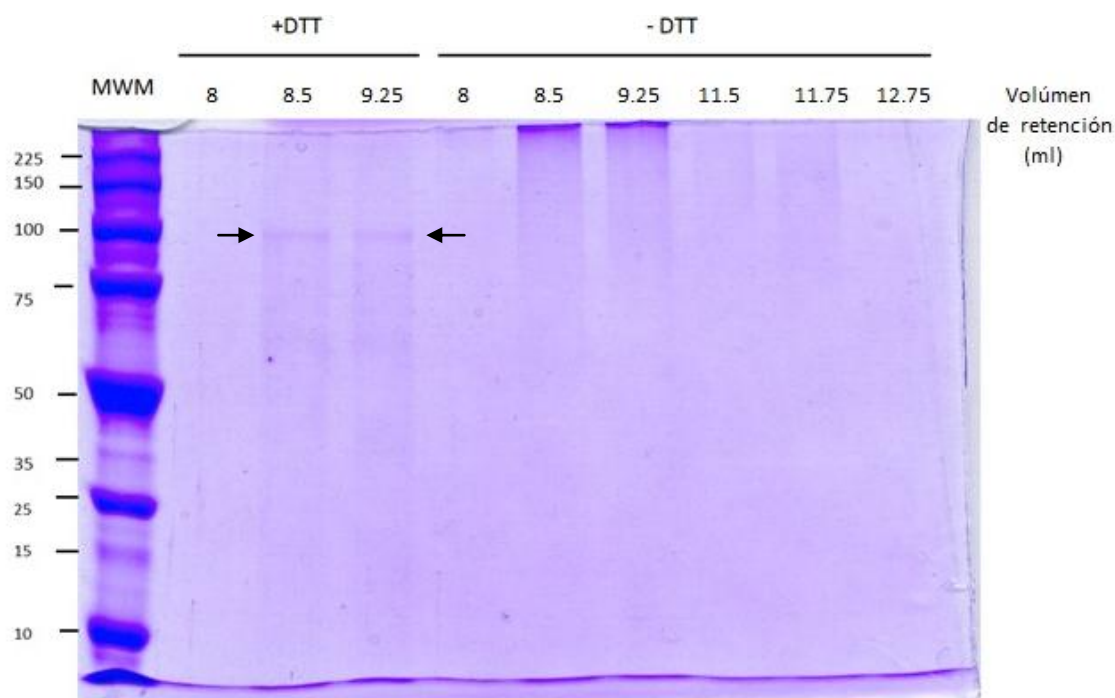


**Fig.32. Versión ampliada del cromatograma mostrado en Fig. 30.**

De acuerdo a la curva de calibración de la columna de exclusión molecular, la forma monomérica de SelTryp, la cual tiene una masa teórica de 97 kDa, debería presentar un volumen de retención de aprox. 13,6 mL. Ninguno de los picos detectados eluye a dicho volumen. Sin embargo, los picos con masas aparentes de 160, 270 y >700 kDa

podrían corresponderse con especies diméricas, triméricas y multiméricas de SelTryp. Para determinar la presencia de la proteína recombinante en cada uno de los picos obtenidos a partir de la cromatografía de exclusión molecular se procedió a analizar una muestra de cada uno de ellos mediante gel SDS-PAGE al 8% en condiciones reductoras y no reductoras (ver Fig. 33). A partir del mismo se pudo determinar que el primer pico (fracción entre 8,5 y 9,5 mL aprox.) contiene SelTryp, lo que estaría indicando que la proteína se encuentra formando multímeros de alto peso molecular, cuyas unidades se asocian por uniones covalentes del tipo puentes disulfuro. Esto se deduce a partir de que luego del agregado de un agente reductor como el DTT, las interacciones logran romperse visualizándose una única banda cercana a los 100 kDa y correspondiente a la masa de la subunidad de SelTryp. Si estos enlaces difulfuros presentes en la proteína recombinante están presentes en la proteína nativa o si son producto del plegamiento oxidativo incorrecto o de la oxidación espontánea no es posible establecerlo en base a los resultados obtenidos.

No se logran detectar proteínas en el segundo pico, lo que podría deberse a la escasa cantidad de proteína presente en esta fracción (Abs 280 nm  $\sim 0,0025$ ) y a la sensibilidad de detección del reactivo de Coomassie Blue empleado para teñir los geles ( $\sim 0,5 \mu\text{g}$  de proteína).



**Fig.33. SDS-PAGE 8% de las principales fracciones de elución de la cromatografía de exclusión molecular.** En los carriles 3 y 4 se señalan con flechas negras las bandas correspondientes a SelTryp obtenidas en presencia de agente reductor (+DTT). Nótese que las muestras correspondientes a las fracciones de elución de 8,5 y 9,25 ml separadas en condiciones no reductoras (-DTT) no presentan bandas proteicas visibles en el rango de 90-100 kDa sino que gran parte de la fracción proteica no logra ingresar y separarse en el gel dado su alto peso molecular.

## **6. Conclusiones**

En relación a la curva de crecimiento y tasa de duplicación de las líneas celulares en estudio se observó que las mismas están desfasadas, presentando la línea celular KO una tasa de duplicación en la fase exponencial más lenta respecto a la línea WT, lo que se traduce en un retardo en alcanzar la fase estacionaria, además de alcanzar una densidad máxima levemente menor.

Los estudios relativos al efecto del peróxido de hidrógeno sobre la proliferación de la línea WT y KO arrojaron resultados dispares. Por un lado se determinó que la cepa KO SepSecS presenta una sensibilidad al tratamiento con peróxido de hidrógeno durante 24 hs similar a la observada para la línea parental salvaje, en línea con lo reportado por Aeby y col. (2009). Sin embargo, a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (500  $\mu$ M) y durante tiempos de exposición cortos (2 y 4 hs) la línea celular KO SepSecS mostró una tolerancia reducida respecto a la exhibida por la línea WT, concordando con los resultados obtenidos por Costa y col. 2011. Esta tendencia podría asociarse con los roles propuestos para selenoproteínas en sistemas antioxidantes. Sin embargo, la significancia de estos resultados y de esta conclusión no pudo ser valorada dado que los datos obtenidos no fueron sometidos a análisis estadístico, en parte debido a cierta dispersión de los mismos.

Los estudios de infectividad demostraron claramente la mayor capacidad infectiva de la cepa KO SepSecS respecto de la WT, dado que en los ensayos se observó una menor tasa de sobrevivencia ( $p < 0,05$ ) y una mayor carga parasitaria en los ratones infectados con la línea KO respecto de aquellos inoculados con la línea WT. Habiéndose realizado estos experimentos con líneas celulares isogénicas, es decir genéticamente idénticas, excepto por la ausencia del gen que codifica para SepSecS en la cepa KO, estos resultados son muy promisorios y plantean un nuevo paradigma en cuanto al rol del metabolismo de Sec en tripanosomátidos. De todas formas, independientemente del rol que las selenoproteínas cumplan en el parásito es evidente que dichas funciones son totalmente prescindibles para la forma infectiva del tripanosoma africano lo cual permite descartar a estas proteínas como candidatos para el desarrollo de fármacos.

En el desarrollo del presente trabajo se propusieron varias hipótesis que podrían estar explicando dichos resultados, pero evidentemente la resolución de este interrogante requerirá de nuevos estudios que deberán incluir la elucidación de la actividad biológica de las selenoproteínas.

En relación a los ensayos de producción y purificación de SelTryp se encontró que la proteína es mayoritariamente insoluble, siendo muy baja la fracción de proteína que puede resolubilizarse. La fracción resolubilizada se encuentra formando multímeros de alto peso molecular, cuyas unidades se asocian por uniones covalentes del tipo enlaces disulfuro.

## **7. Agradecimientos**

A Gustavo y Marcelo por toda la ayuda que me dieron durante la realización de los ensayos y en la escritura de la tesina.

A mi esposo Fabricio por su apoyo constante e infinita confianza que me impulsan a continuar con mi formación.

A mi familia y amigos por acompañarme siempre.

A los compañeros del Instituto de Higiene y del IPMon por el tiempo compartido.

Al Lic. Gabriel Fernández y a la Vet. Martina Crispo de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del IPMon por su asistencia técnica durante los ensayos de experimentación animal.

A Josefina Louge de la Unidad de Biología Celular del IPMon por su colaboración para la adquisición y análisis de datos de citometría de flujo.

A los miembros del Tribunal que accedieron a leer y comentar este trabajo.

A la ANII por la financiación parcial de este trabajo a través de fondos del proyecto Innova-Uruguay (acuerdo DCI-ALA/2007/19.040 entre Uruguay y la Unión Europea) de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

## 8. Bibliografía

Aeby E., Seidel V. & Schneider A. 2009. The selenoproteome is dispensable in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 168: 191-193.

Aeby E., Palioura S., Pusnik M., Marazzi J., Lieberman A., Ullu E., Soll D. & Schneider A. 2009. The canonical pathway for selenocysteine insertion is dispensable in *Trypanosomes*. *PNAS* vol. 106: 5088- 5092.

Antoine-Moussiaux N., Magez S. & Desmecht D. 2008. Contributions of experimental mouse models to the understanding of African trypanosomiasis. *Trends in Parasitology* Vol.24 No.9 411-418.

Arias D.G., Cabeza M.S., Erben E.D., Carranza P.G., Lujan H.D., Téllez Iñón M.T., Iglesias A. & Guerrero S.A. 2011. Functional characterization of methionine sulfoxide reductase A from *Trypanosoma* spp, *Free Radic. Biol. Med.*, 50: 37–46.

Barrett M., Burchmore R., Stich A., Lazzari J., Frasch A., Cazzulo J. & Krishna S. 2003. The trypanosomiasis. *Lancet*. Vol. 362, No. 9394, pp. 1469–1480.

Barry J.D. & McCulloch R. 2001. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in an eukaryotic parasite. *Adv. Parasitol.* 49, 1-70.

Bass B. 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101: 235-238.

Bewick V., Cheel L & Ball J. 2004. Statistics review 12: Survival analysis. *Critical Care* 2004, 8:389-394 (DOI 10.1186/cc2955). Sitio web: <http://ccforum.com/content/8/5/389>

Blum B., Bakalara N. & Simpson L. 1990. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 60: 189-98.

Blum B. & Simpson L. 1990. Guide RNAs in kinetoplastid mitochondria have a nonencoded 3' oligo(U) tail involved in recognition of the preedited region. *Cell*; 62: 391-7.

Brun R. & Krassner S. 1976. Quantitative ultrastructural investigations of mitochondrial development in *Leishmania donovani* during transformation. *J Protozool*; 23: 493-7.

Caban K., & Copeland P. 2006. *Cell Mol Life Sci* 63(1), 73-81.

Cavalli A. & Bolognesi M. 2009. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J. Med. Chem.* Vol. 52, No. 23, pp. 7339–7359.

Chambers I., Frampton J., Goldfarb P., Affara N., McBain W. & Harrison P. 1986. *Embo J* 5(6), 1221-1227.

Chavatte L., Brown B. A. & Driscoll D. 2005. *Nat Struct Mol Biol* 12(5), 408-416.

Clayton C. 1999. Genetic manipulation of Kinetoplastida. *Parasitol. Today* 15:372-378.

Comini M., Medeiros A. & Manta B. 2011. Stress response in the infective stage of *Trypanosoma brucei*. In: Stress response in microbiology. Ed. José M. Requena. Horizon Scientific Press, Norwich, UK. *In press*

Comini M.A., Manta B., Fleitas L. (2012) Chapter: Iron metabolism in pathogenic trypanosomes, In: Iron Metabolism. Ed. Sarika Arora. INTECH, Croatia, Rajika. ISBN 979-953-307-162-5.

Cone J. E., Del Rio R., Davis J. & Stadtman T. 1976. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(8), 2659-2663.

Costa F.C., Oliva M., de Jesus T., Schenkman S. & Thieman O. 2011. Oxidative stress protection of trypanosomes requires selenophosphate synthase. *Mol Biochem Parasitol*, doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.04.007

De Souza W. 2008. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des*; 14: 822-38.

DNDi Drugs for Neglected Diseases Initiative. 2013. [Diseases & Projects, Diseases](http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases-projects/diseases/hat.html), Human African Trypanosomiasis. Sitio web: <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/hat.html>

Docampo R., Scott D., Vercesi A. & Moreno S. 1995. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 310: 1005-12.

Encinar J.R., Schaumlöffel D., Y. Ogra Y. & Lobinski R. 2004. *Anal Chem* 76, 6635-6642

Engstler M., Pfohl T. & Herminghaus S. 2007. Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* 131: 505-15.

Duszenko M., Ferguson M.J, Lamont G.S., Rifkin M. R. & Cross G. A. M. 1985. *J. Exp. Med.*, 162: 1256–1263

Duszenko M., Mühlstädt K. & Broder A. 1992. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 50: 269–273)

Figueroa A., Martínez-Calvillo S., López-Villaseñor I. & Hernández R. 2003. Evidence supporting a major promoter in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene. *FEMS Microbiol Lett*; 225: 221-25.

Fomenko D., Xing W. & Adair B. 2007. *Science* 300:1439.

Fomenko D. Chapter 17. Selenoproteins in the endoplasmic reticulum. 2012 En *Selenium: Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*. Third Edition. Editores: DJ Hatfield, MJ Berry y VN Gladyshev. DOI 10.1007/978- 1-4614-1025-6\_17.

Glass R., Singh W., Jung W., Veres Z., Scholz T. & Statman T. 1993. Monoselenophosphate-synthesis, characterization and identity with the prokaryotic biological selenium donor compound SEPX. *Biochemistry* 32: 12555-9.

Gueiros –Filho F. & Beverley S. 1996. Selection against the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) locus as a probe of genetic alterations in *Leishmania major*. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5655- 5663

Gutteridge, J.M. & Halliwell, B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci.* 899:136-47

Hammarton T.C. 2007. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 153(1): 1-8.

Hammond S., Caudy A. & Hannon G. 2001. Post-transcriptional gene silencing by double stranded RNA. *Nature Rev.* 2:110-119.

Hoffman P. 2012. An Emerging Picture of the Biological Roles of Selenoprotein K. In: Hatfield D. *et al.* (eds). *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*. DOI 10.1007/978- 1-4614-1025-6\_26.

Ilgoutz S. & McConville M. 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* 2001; 31: 899-908.

Jacobs R., Nare B. & Phillips M. 2011. State of the art in African trypanosome drug discovery. *Curr Top Med Chem.* Vol. 11, No. 10, pp. 1255–1274.

Kryukov G., Castellano S., Novoselov S., Lobanov A., Zehtab O., Guigo R. & Gladyshev V. 2003. *Science* 300(5624), 1439-1443.

Landfear S. & Ignatushchenko M. 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 115: 117.

- Lecordier L., Walgraffe D., Devaux S., Poelvoorde P., Pays E. & Vanhamme L. 2005. *Trypanosoma brucei* RNA interference in the mammalian host. *Molecular & Biochemical Parasitology* 140 (2005) 127–131.
- Lee S.H., Stephens J.L. & Englund P.T. 2007. A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Apr;5(4):287-97.
- Leinfelder W., Forchhammer K., Veprek B., Zehelein E. & Bock A. 1990. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(2), 543-547.
- Liang X., Haritan A., Uliel S. & Michaeli S. 2003. *Trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*; 2: 830-40.
- Liu B., Liu Y., Motyka S., Agbo E. & Englund P. 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol* 21: 363-9.
- Lovbanov A., Gromer S., Salinas G. & Gladishev. 2006. Selenium metabolism in *Trypanosoma*: characterization of selenoproteomes and identification of Kinetoplastida-specific selenoproteins. *Nucleic Acid Research*. V.N. 4012-4024.
- Lopes A., Souto-Pradrón T., Dias F., Gomes M., Rodrigues G., Zimmermann L., Alves e Silva T. & Vermelho A. 2010. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal*, 4, 30-59.
- Lorenz P., Maier A., Baumgart E., Erdmann R. & Clayton C. 1998. Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex 11p. *EMBO J.* 17: 3542- 3555.
- Lobanov et al. 2006 *Nucl Acids Res* 34: 4012-4024
- Lukes J., Hashimi H. & Zíková A. 2005. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet*; 48: 277-99.
- Manta B., Fleitas L. & Comini M. 2012. Iron Metabolism in Pathogenic Trypanosomes, Iron Metabolism, Dr. Sarika Arora (Ed.), ISBN: 978-953-51-0605-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/iron-metabolism/iron-metabolism-in-pathogenic-trypanosomes>
- Manta B., Comini M., Medeiros A., Hugo M., Trujillo M., Radi R. 2013. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta.* 1830, 3199-3216.
- Martinez-Calvillo S., Vizuet-de-Rueda J. & Martinez F. 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*; 2010: 525241.



Matthews K. 1999. Developments in differentiation of *T. brucei*. Parasitol., Today 15, 76-80.

Matthews K., Ellis J. & Paterou A. 2004. Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. TRENDS in Parasitology Vol.20 No.1: 40-47.

Michels P., Hannaert V. & Bringaud F. 2000. Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae - new data and views. Parasitol Today; 16:482-49.

Michels P., Moyersoer J. & Krazy H. 2005. Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes. Mol Membr Biol; 22: 133-45.

Moutiez M., Meziane-Cherif D., Aumerceir M., Sergheraert C. & Tartar A. 1994. Compared Reactivities of Trypanothione and Glutathione in Conjugation Reactions, Chemical & Pharmaceutical Bulletin 42: 2641–2644.

Nakayasu E., Yashunsky D. & Nohara L. 2009. GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. Mol Syst Biol; 5: 261-79.

Ngo H., Tschudi G. & Ullu E. 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14687- 14692.

Organización Mundial de la Salud (2012) Trypanosomiasis, Human African (sleeping sickness). Fact sheet N° 259; sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>

Olsson T., Bakhtem M., Edlund C., Hojeberg B. & Kristensson K. 1991 .Bidirectional activating signals between *Trypanosoma brucei* and CD8+ T cells: a trypanosome-released factor triggers interferon-g production that stimulates parasite growth. Eur J Immunol 21: 2447–2454.

Podlipaev S. 2001. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. Int J Parasitol 31: 648-52.

Portman N. & Gull K. 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. Int J Parasitol 40: 135-48.

Ralston K., Kabututu Z., Melehani J., Oberholzer M. & Hill KL. 2009. The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. Annu Rev Microbiol 63: 335-62.

Salinas, G. 2010. Bioquímica de la selenocisteína, el 21er aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana. Mensaje Bioquímico Vol XXXIV 121-133.11.

Schmidt A. 2005. Crystal Structure of Kunitz Domain 1 (KD1) of Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 in Complex with Trypsin. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 280, No. 30, pp. 27832-27838.

Schwarz K. & Foltz C. 1957. *J Am Chem Soc* 79, 3292-3293.

Shchedrina V., Zhang Y., Labunskyy M., Hatfield D. & Gladyshev V. 2010. Structure-Function Relations, Physiological Roles and Evolution of Mammalian ER-Resident Selenoproteins. *Antioxidants & Redox Signaling* Volume 12, Number 7

Simpson A.G., Stevens J.R. & Lukes J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.*, 22: 168–174.

Soares M. & De Souza W. 1988. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J Submicrosc Cytol Pathol*; 20: 349-61.

Stadtman T. 1996. *Annu Rev Biochem* 65, 83-100.

Tachado D. & Schofield L. 1994. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Trypanosoma brucei* regulates IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  expression in macrophages by protein tyrosine kinase mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Comm* 205: 984– 991.

Tovar J., Cunningham M., Smith A. Croft S. & Fairlamb A. 1998. Down-regulation of *Leishmania donovani* tripanothione reductase by heterologous survival. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 5311- 5316.

Vercesi A., Moreno S. & Docampo R. 1994. Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange in acid vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J*; 304: 227-33.

Vickerman, K. 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes, *br. Med. Bull.* 41, 105-114.

Vickerman K. 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol*; 24: 1317-31.

Vincendeau P. & Bouteille B. 2005. Immunology and immunopathology of African tripanosomiasis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2006) 78(4): 645-665.

Xu X.M., Carlson B.A., Mix H., Zhang Y., Saira K., Glass R.S., Berry M.J., Gladyshev V.H. & Hatfield D.L. 2007. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol* Jan;5(1): e4.

Zinoni, F., Heider, J. & Bock, A. 1990. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12), 4660-4664.

## 9. Apéndices

1

### Objetivo del análisis:

Identificación de proteínas por mapeo peptídico.

### Datos relevantes:

**MGSSHHHHHSSGLVPAGSHMAS**MTGGQQMGRGSMEKEGGKEEKGPAKCPAQSVDSMQRKNRS  
TFRPVLLVAGSLDDTVCQEITRRRLRQYRNRYPILRLTATLMAPAVQEVLEFGHCEGVDVTDGRATNGKK  
GIAEGKETNGKSGSGSMVAKRLRGDSLIAAPCAAIMAERRIKVVSRLHENNDGMSAVEKLEAFMAYQFLPL  
ALTHNCHPKLSLSEKSFILRHVHEARTSSFLIADLQEKTAIIDPQLDISMYEADISALRLRCGVVLSHCF  
VDVVMGHAALLTKHPEAVLLSSTPWTQEVDPTEGWPTLSLSPLQLHCVPVPSFSPECMLVELHYNSTLL  
ALFTGTVIGTDSVPRHEFFADFPGLSPKSNVSSCEATRATTVAQRFLKERLWDRYFAQTGEGNGQTLEH  
VWIFPSHGGYNNVTHQLDLYWALHVGDLKRMKHSRKMLGKLLDHESYAAYVQERPPLPKTPLFHVSRDYN  
LLLAPSAFGGSGARLVSRHSLPSCPLPRFNSVASAASSAMTPIVLDIRDITTDHQLAHLKGSVNIPMNFATA  
YGVKKAELWLQCLLQPLQPIVICRNEEEFPLVRKRELLSPGAPIETYTAKELESPSSLSAAGAEVRVQGF  
ITKPLPESIVSSFLPRQLVWVSDSAASFLRIDNYQLQCIPESEDTLVLDCRTSYEFKNGSHKHSVHIPLAE  
LCQLTALDTMSSSSLLNGTNKQETPVVDFYTPSPRLGQKILEKLHESFMAENVRRRFSFQGIKNIIVYCASG  
YRSIIAGSLLRRAFEAAATVPIQVRDVGALQIMKQRPDLWTVKDCSIICVSRPR

Secuencia N-terminal en rojo corresponde al vector de expresión (poliHis). U denota selenocisteína y en celeste se indica...

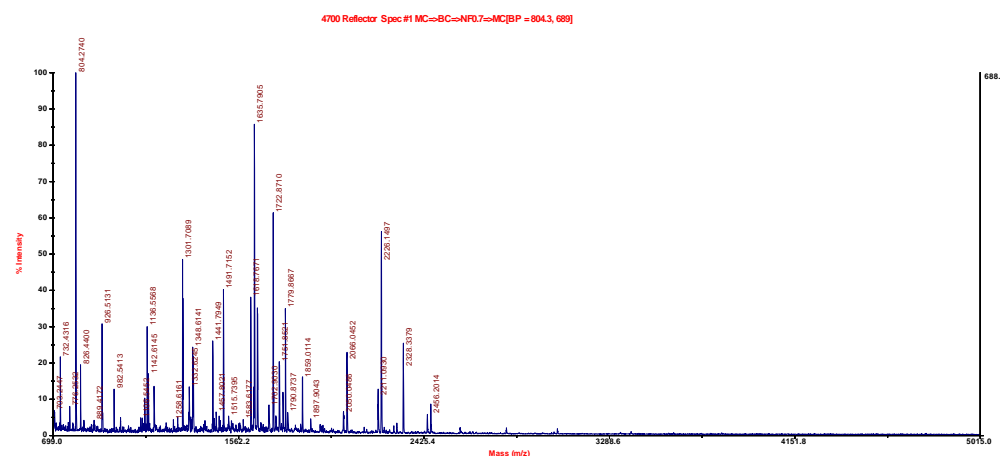
**Muestra:** Seltryp

**Placa:** Setiembre 2da. 2011

**Posición :** B22

### Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)



## Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

713.2041, 732.4316, 769.2788, 776.2532, 790.2371, 804.2740, 806.2745, 826.4400, 842.4954, 889.4172

926.5131 ions(175.0976, 201.1241, 237.1042, 257.1032, 274.1517, 277.1035, 282.1559, 288.1900, 324.1487, 331.1777, 358.2060, 359.1960, 386.8465, 394.1956, 401.2151, 411.2094, 429.2493, 445.1940, 480.2126, 481.2117, 483.2213, 498.2475, 506.1470, 516.2291, 555.2698, 570.2027, 582.2304, 625.2792, 628.2701, 635.2849, 637.2497, 645.2841, 653.1125, 653.2865, 719.9942, 724.3727, 735.8455, 737.8405, 752.3098, 754.2394, 755.1440, 770.3076, 782.1604, 799.3101, 838.2872, 838.4988)

929.5585, 982.5413, 1012.4853, 1106.5452, 1113.5514, 1118.5603, 1125.5822

1136.5568 ions(175.1454, 213.1873, 216.1126, 244.1024, 257.1922, 259.1234, 274.2191, 344.1924, 370.2611, 373.1656, 387.3062, 388.1747, 463.2161, 470.3171, 471.2397, 471.3970, 488.3750, 497.1983, 502.2296, 507.3458, 534.8564, 604.2131, 618.3763, 621.3624, 632.2678, 635.4705, 647.2880, 649.3182, 689.3094, 722.4086, 732.3809, 734.1558, 750.4050, 764.5280, 822.0815, 831.2292, 834.3062, 845.4174, 847.2568, 858.5229, 893.5533, 925.1465, 931.1717, 933.1856, 947.0087, 963.4460, 964.4565, 965.4340, 979.5006, 981.4529, 996.5794, 1013.5020, 1014.6172, 1022.6810, 1023.5932)

1142.6145, 1168.6095, 1224.6198, 1258.6161, 1278.6349

1301.7089 ions(175.1018, 183.1338, 211.1239, 219.0932, 228.1235, 244.0968, 272.1218, 274.1390, 339.1751, 348.0950, 355.1167, 360.2010, 367.1729, 368.1591, 385.2245, 402.2406, 419.1557, 426.1576, 436.1577, 438.2154, 444.1675, 462.2156, 473.1347, 490.2008, 498.2155, 502.1795, 525.2448, 547.2370, 551.2313, 563.2687, 570.3050, 573.2495, 578.3069, 591.2379, 595.3071, 601.2512, 612.3431, 627.2527, 672.3006, 675.1536, 690.3034, 694.3653, 696.3246, 711.3931, 713.0355, 713.2861, 787.3239, 794.4786, 800.4110, 812.4290, 822.3107, 883.4323, 896.3460, 954.5032, 1045.3076, 1083.5273, 1130.3678, 1171.4856)

1329.6102, 1330.6354, 1331.6310, 1332.6245, 1334.6091, 1339.6492, 1348.6141, 1351.6920, 1441.7949, 1448.7295, 1457.8021, 1471.6890, 1476.7415, 1491.7152, 1515.7395, 1528.7169, 1583.6177

1618.7671 ions(169.1321, 175.0941, 212.0932, 255.1254, 272.1549, 342.1664, 362.1319, 401.2999, 411.2263, 439.2049, 456.2364, 471.2916, 497.2656, 510.2101, 513.2675, 522.2021, 527.2172, 538.2529, 540.2610, 557.3058, 608.2814, 609.3737, 611.1939, 627.1597, 629.2995, 637.3042, 661.2930, 703.3674, 720.3159, 720.4521, 752.3552, 792.3148, 804.4294, 822.4108, 823.2669, 824.3826, 867.4161, 877.3306, 899.2789, 965.4261, 966.4047, 982.4934, 1081.5131, 1277.6179, 1360.6349, 1378.6204)

1632.8295, 1635.7905, 1649.8517, 1702.9030

1722.8710 ions(175.1431, 185.1099, 228.1660, 246.1848, 256.1880, 303.2223, 389.2032, 390.2809, 403.3235, 407.2173, 430.2728, 447.2840, 460.2641, 471.2438, 477.3161, 478.2350, 487.3031, 502.3325, 503.3047, 504.3682, 520.3467, 588.3312, 591.4083, 600.5294, 605.4083, 615.3679, 633.4309, 643.4045, 651.4141, 679.5266, 704.4442, 722.5116, 732.3976, 732.5351, 744.7093, 746.5912, 749.4839, 792.5181, 801.5703, 817.5428, 817.7072, 821.5692, 846.6368, 848.3360, 864.5439, 871.5663, 889.5949, 906.6243, 935.6550, 959.6548, 960.7040, 977.6605, 1055.5355,

1073.7883, 1090.7666, 1144.8400, 1203.8635, 1219.7294, 1316.9648, 1327.8235, 1414.0155,  
1414.8960, 1430.9950, 1548.8778, 1593.9036)

1735.8662, 1751.8521, 1768.8442

1779.8667 ions(175.1121, 258.1188, 274.1724, 351.1275, 364.1109, 372.2195, 385.1598, 437.2371,  
441.0877, 459.1707, 470.2191, 474.3107, 501.1518, 511.2496, 517.1884, 521.3483, 531.2514,  
588.3113, 614.4280, 615.2076, 616.3542, 621.3663, 632.3743, 643.2294, 661.2855, 686.3255,  
688.4684, 695.4150, 703.3959, 711.4396, 725.7587, 762.2667, 764.2341, 783.5423, 790.3538,  
790.4965, 805.9818, 824.3381, 827.5930, 870.6823, 884.4777, 958.6244, 965.3456, 983.5145,  
988.4161, 991.4929, 1000.5571, 1027.5068, 1087.6475, 1088.5198, 1157.5699, 1174.6992, 1224.6232,  
1291.7089, 1304.5833, 1306.6285, 1321.7098, 1351.6984, 1392.6678, 1408.6971, 1420.9478,  
1514.6150, 1536.7408, 1614.1403, 1625.8855, 1650.6519, 1678.4897)

1790.8737, 1859.0114, 1897.9043, 2050.0486, 2066.0452, 2211.0930, 2225.1045, 2226.1497,  
2328.3379

2440.2097 ions(175.1045, 393.2098, 454.3130, 480.3947, 569.4311, 593.4684, 675.4611, 692.4756,  
708.4270, 710.4595, 747.8760, 762.3609, 780.5389, 810.5255, 884.3560, 891.4862, 962.6686,  
990.6587, 1231.8070, 1270.7372, 1332.0303, 1402.9480, 1419.0009, 1428.7936, 1475.8361, 1713.4098,  
1808.1656, 1826.1937, 1839.1498, 1841.5120, 1856.1938, 1860.0549, 1872.1046, 1902.1166,  
1996.2499, 2392.6870)

2456.2014 ions(175.1161, 451.3832, 591.3404, 593.4034, 686.3740, 688.6647, 779.5986, 792.5615,  
812.6623, 833.7159, 992.2186, 1154.7871, 1354.7284, 1355.0281, 1356.9817, 1418.9513, 1419.9413,  
1421.9529, 1491.0442, 1808.2015, 1816.4506, 1854.6794, 1855.0643, 1857.2225, 1872.2147)

2593.1926

## **Búsqueda realizada en base de datos local donde se encuentra depositada la secuencia enviada por el usuario:**

### **Search Parameters**

Type of search : Sequence Query  
Enzyme : Trypsin  
Variable modifications : [Oxidation \(M\)](#), [Dehydro \(C\)](#), [Gln->pyro-Glu \(N-term Q\)](#), [Oxidation \(HW\)](#)  
Mass values : Monoisotopic  
Protein Mass : Unrestricted  
Peptide Mass Tolerance : ± 0.05 Da  
Fragment Mass Tolerance: ± 0.2 Da  
Max Missed Cleavages : 1  
Instrument type : MALDI-TOF-TOF  
Number of queries : 64

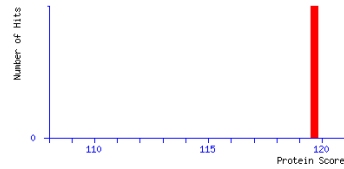
### **Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot**

([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com))

Database : Uniprot: 2011-05-27 (142 sequences: 52373 residues)  
 Timestamp : 22 Sep 2011 at 14:47:50 GMT  
 Protein hits : [Seltryp|MarceloComini](#)

### Mascot Score Histogram

Ions score is  $-10 \times \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 4 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



### Peptide Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold  $p <$  0.05 Max. number of hits 10

Standard scoring  MudPIT scoring  Ions score or expect cut-off 0 Show sub-sets 0

Show pop-ups  Suppress pop-ups  Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

1. [Seltryp|MarceloComini](#) Mass: 92423 Score: 120 Matches: 2 (2) Sequences: 2 (2)  
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 25	1301.7089	1300.7016	1300.7139	-0.0123	0	62	6.4e-007	1	U	R_AFEAATVPIQVR.D
<input checked="" type="checkbox"/> 43	1618.7671	1617.7598	1617.7675	-0.0077	0	71	8.5e-008	1	U	K_QETPVVDFYTPSPR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q)

## Protein View

Match to: [Seltryp|MarceloComini](#) Score: 305 Expect: 4.5e-029

Nominal mass ( $M_r$ ): 92423; Calculated pI value: 8.40

NCBI BLAST search of [Seltryp|MarceloComini](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Oxidation (M), Gln->pyro-Glu (N-term Q), Dehydro (C)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 31%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MGSSEHHHHH  SSGLVPAESH  MASMTGGQQM  GRGSMKEEGG  KEEKGPAKCP
51  PAQSVDSMQR  KNRSTFRPVL  LEVAGSLDDT  VCQEITRRLR  QYRNRYAPIL
101 RLTATLMAPA  VQVELFGHC  EGVVDVDGRA  TNGKKGIAEG  KETNGKSGSG
151 SNVAKRLRGD  SLIAAPCAAI  MAERRIKVVS  RLHENNDGMS  AVEKLEAFMA
201 YQFLPLALTH  NCHPKLSLSE  KSFILRHYVH  EATRTSSFLI  ADLQEKTAAI
251 IDPQLDISMY  EADISALRLR  LCGVVLSHCF  VDVMGHAAL  LTKHPEAVLL
301 SSTPWTQEVD  VPTEGWPTLS  LSPRLQLHCV  PVPSPSPECM  LVELHYNSTL
351 LALFTGTVIG  TDSVPRHEFF  ADFPGLSPKS  NVSSCEATRT  ATTVAQRFLK
401 ERLWDRYFAQ  TEGGNNGQTL  EHVVIFFSHG  GYNNVTHQLD  LYWALHVGDL
451 KRMKHSRKML  GKLLDHESYA  AYVQERPLP  KTPLFSHVRD  YNLLLAPS&F
501 GGSGARLVSR  HSLPSCPLPR  FNSVASAASS  AMTPIVLDIR  DTTDHQLAHL
551 KGSVNIPMNF  PATAYGVKKA  ELWLQCLLQP  LQPIVVICRN  EEEFPLVRKR
601 LELLSPGAPI  ETYTAKELES  PSSLSAAGA  EVRVQGFIIT  KPLPESIVSS
651 FLPRQLVWVS  DSAASAFLRI  DNYQQLQCIE  PSEDTLVLDC  RTSYEFKNGS
701 HKHSVHIPLA  ELCQLTALDT  MSSSLLNGT  NKQETPVVDF  YTPSPRLGQK
751 ILEKLHESFM  AENWRRRFSF  QGIKNIIVYC  ASGYRSIAG  SLLRRAFEAA
801 TVPIQVRDVV  GGALQIMKQR  PDLWTVKDCS  IICVSUPR

```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
96 - 101	732.4316	731.4243	731.4330	-0.0087	0	R.YAPILR.L (No match)
768 - 774	826.4400	825.4327	825.4385	-0.0058	0	R.FSFQGIK.N (No match)
786 - 794	929.5585	928.5512	928.5705	-0.0193	0	R.SIIAGSLLR.R (No match)
767 - 774	982.5413	981.5340	981.5396	-0.0056	1	R.RFSFQGIK.N (No match)
227 - 234	1012.4853	1011.4780	1011.4886	-0.0106	0	R.HYVHEATR.T (No match)
511 - 520	1106.5452	1105.5379	1105.5702	-0.0323	0	R.HSLPSCPLPR.F (No match)
819 - 827	1125.5822	1124.5749	1124.5979	-0.0229	0	K.QRPDLWTVK.D Gln->pyro-Glu (N-term Q) (No match)
819 - 827	1142.6145	1141.6072	1141.6244	-0.0172	0	K.QRPDLWTVK.D (No match)
775 - 785	1258.6161	1257.6088	1257.6176	-0.0087	0	K.NIIIVYCASGYR.S (No match)
541 - 551	1278.6349	1277.6276	1277.6364	-0.0088	0	R.DITDHQLAHLK.G (No match)
796 - 807	1301.7089	1300.7016	1300.7139	-0.0123	0	R.AFEAATVPIQVR.D (Ions score 62)
755 - 765	1332.6245	1331.6172	1331.6292	-0.0120	0	K.LHESFMAENVR.R (No match)
49 - 60	1334.6091	1333.6018	1333.5755	0.0264	0	K.CPPAQSVDSMQR.K Oxidation (M) (No match)
755 - 765	1348.6141	1347.6068	1347.6241	-0.0173	0	K.LHESFMAENVR.R Oxidation (M) (No match)
235 - 246	1351.6920	1350.6847	1350.7031	-0.0184	0	R.TSSEFLIADLQEK.T (No match)
795 - 807	1457.8021	1456.7948	1456.8150	-0.0202	1	R.AFEAATVPIQVR.D (No match)
367 - 379	1491.7152	1490.7079	1490.7194	-0.0115	0	R.HEFFADFPGLSPK.S (No match)
733 - 746	1618.7671	1617.7598	1617.7675	-0.0077	0	K.QETPVVDFYTPSPR.L Gln->pyro-Glu (N-term Q) (Ions score 71)
655 - 669	1632.8295	1631.8222	1631.8308	-0.0085	0	R.QLVWVSDSAASAPLR.I Gln->pyro-Glu (N-term Q) (No match)
733 - 746	1635.7905	1634.7832	1634.7941	-0.0108	0	K.QETPVVDFYTPSPR.L (No match)
655 - 669	1649.8517	1648.8444	1648.8573	-0.0129	0	R.QLVWVSDSAASAPLR.I (No match)
601 - 616	1702.9030	1701.8957	1701.9189	-0.0231	0	R.LELLSPGAPIETYAK.E (No match)
600 - 616	1859.0114	1858.0041	1858.0200	-0.0159	1	K.RLELLSPGAPIETYAK.E (No match)
521 - 540	2050.0486	2049.0413	2049.0565	-0.0151	0	R.FNSVASAASSAMTPIVLDIR.D (No match)
768 - 785	2066.0452	2065.0379	2065.0455	-0.0076	1	R.FSFQGIKNIIVYCASGYR.S (No match)
463 - 481	2226.1497	2225.1424	2225.1480	-0.0056	0	K.LLDHESYAAIVQERPLPK.T (No match)
634 - 654	2328.3379	2327.3306	2327.3253	0.0053	0	R.VQGFIIITKPLPESIVSFLPR.Q (No match)
670 - 691	2593.1926	2592.1853	2592.1836	0.0017	0	R.IDNYQLQCIEPSEDIVLDCR.T 2 Dehydro (C) (No match)

Link al resultado (solo funciona en la Pc del servicio):

[http://ubypa8/mascot/cgi/master\\_results.pl?file=../data/20110923/F005286.dat](http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20110923/F005286.dat)

Link al protein view (solo funciona en la Pc del servicio):

[http://ubypa8/mascot/cgi/protein\\_view.pl?file=../data/20110923/F005286.dat&hit=1](http://ubypa8/mascot/cgi/protein_view.pl?file=../data/20110923/F005286.dat&hit=1)

## Búsqueda realizada en base de datos publica NCBI nr:

### Search Parameters

Type of search : Sequence Query  
Enzyme : Trypsin  
Variable modifications : [Oxidation \(M\)](#), [Gln->pyro-Glu \(N-term Q\)](#), [Oxidation \(HW\)](#), [Dehydro \(C\)](#)  
Mass values : Monoisotopic  
Protein Mass : Unrestricted  
Peptide Mass Tolerance :  $\pm 0.05$  Da  
Fragment Mass Tolerance :  $\pm 0.2$  Da  
Max Missed Cleavages : 1  
Instrument type : MALDI-TOF-TOF  
Number of queries : 64

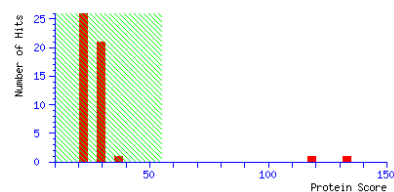
### Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

[www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)

Database : NCBIInr 20110911 (15270974 sequences; 5234858139 residues)  
 Timestamp : 22 Sep 2011 at 19:48:46 GMT  
 Protein hits : [gi|71423232](#) hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]  
[gi|322822359](#) hypothetical protein TCSYLWIO\_5334 [Trypanosoma cruzi]  
[gi|158284634](#) Anopheles gambiae str. PEST AGAP012696-PA [Anopheles gambiae str. PEST]  
[gi|75762702](#) Ornithine cyclodeaminase [Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646]  
[gi|71013973](#) hypothetical protein UM02542.1 [Ustilago maydis 521]  
[gi|333997824](#) hypothetical protein TREPR\_2657 [Treponema primitia ZAS-2]  
[gi|38605956](#) OSJNBa0019K04.17 [Oryza sativa Japonica Group]  
[gi|321473123](#) hypothetical protein DAPPUDRAFT\_239388 [Daphnia pulex]  
[gi|223044318](#) phage head morphogenesis protein [Staphylococcus capitis SK14]  
[gi|308071858](#) hypothetical protein [Pantoea phage LIMElight]  
[gi|333367746](#) amidophosphoribosyltransferase [Psychrobacter sp. 1501(2011)]  
[gi|163846287](#) GAF domain-containing protein [Chloroflexus aurantiacus J-10-f1]  
[gi|225620636](#) hypothetical protein BHWa1\_01725 [Brachyspira hyodysenteriae WA1]  
[gi|333601759](#) tRNA pseudouridine synthase A [Gardnerella vaginalis 315-A]  
[gi|261749323](#) transketolase, C-terminal subunit [Blattabacterium sp. (Periplaneta americana) str. BPLAN]  
[gi|329847327](#) pentapeptide repeat 8 copies family protein [Asticcacaulis biprothecum C19]  
[gi|301115015](#) conserved hypothetical protein [Phytophthora infestans T30-4]  
[gi|302418228](#) bifunctional protein GAL10 [Verticillium albo-atrum VaMs.102]  
[gi|126735929](#) fructose-bisphosphate aldolase [Roseobacter sp. CCS2]  
[gi|157136519](#) hypothetical protein AaeL\_AAELO03480 [Aedes aegypti]

### Mascot Score Histogram

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Individual ions scores > 55 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



### Link al resultado:

[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=../data/20110922/Ftocieuwm.dat](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20110922/Ftocieuwm.dat)

### Link al protein summary:

[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=../data/20110922/Ftocieuwm.dat&REPTYPE=protein&sigthresh=0.05&REPORT=20&server\\_mudpit\\_switch=99999999&ignoreionsscorebelow=0&showsubsets=0&showpopups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20110922/Ftocieuwm.dat&REPTYPE=protein&sigthresh=0.05&REPORT=20&server_mudpit_switch=99999999&ignoreionsscorebelow=0&showsubsets=0&showpopups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0)

### Link al protein view:

[http://www.matrixscience.com/cgi/protein\\_view.pl?file=../data/20110922/Ftocieuwm.dat&hit=1](http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=../data/20110922/Ftocieuwm.dat&hit=1)

## Search unmatched:

### Link al resultado:

[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=../data/20110922/Ftocieuat.dat](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20110922/Ftocieuat.dat)

### Link al protein summary:



[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=..%2Fdata%2F20110922%2FFtocieuat.dat&REPTYPE=protein&sigthreshhold=0.05&REPORT=20&server\\_mudpit\\_switch=99999999&ignoreionsscorebelow=0&showsubsets=0&showpups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=..%2Fdata%2F20110922%2FFtocieuat.dat&REPTYPE=protein&sigthreshhold=0.05&REPORT=20&server_mudpit_switch=99999999&ignoreionsscorebelow=0&showsubsets=0&showpups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0)

**Link al protein view:**

[http://www.matrixscience.com/cgi/protein\\_view.pl?file=../data/20110922/Ftocieuat.dat&hit=1](http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=../data/20110922/Ftocieuat.dat&hit=1)

**Conclusión:**

- En esta muestra se identifican de manera estadísticamente significativa las siguientes proteínas
    - “Seltryp”
    - hypothetical protein TCSYLVIO\_5334 de *Trypanosoma cruzi*.
-