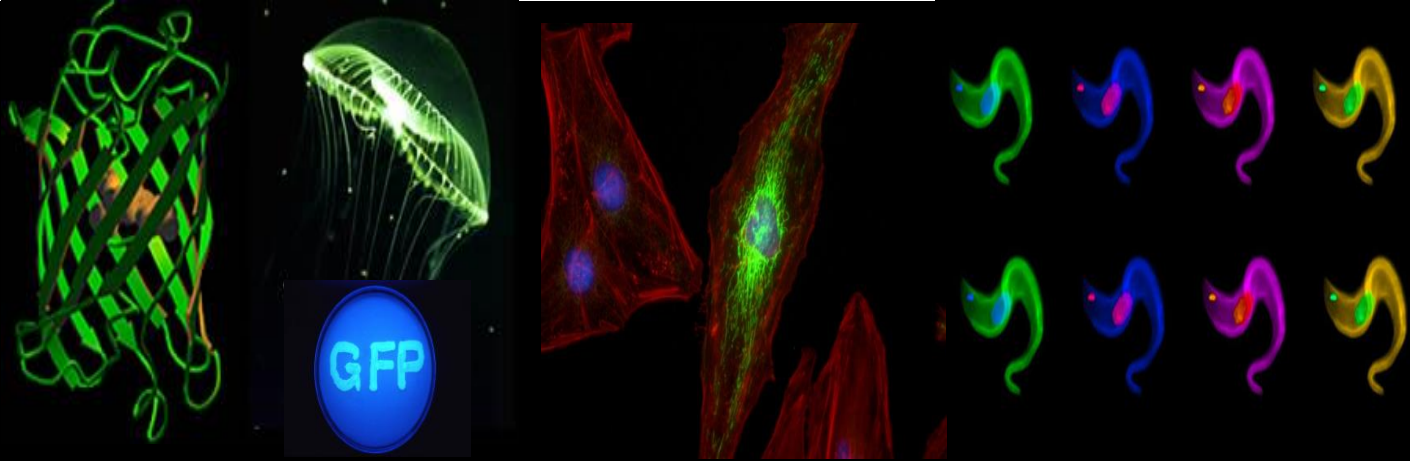




Generación y caracterización de biosensores redox para el estudio de procesos biológicos en tripanosomátidos

Lic. Florencia Sardi Piano

Tutor: Marcelo Comini

Tesis de Maestría

Laboratorio de Biología Redox de
Tripanosomas

Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

Mayo, 2016

ÍNDICE

1. Introducción	5
1.1 Aspectos generales del género Trypanosoma	6
1.2 Trypanosoma brucei y Tripanosomiasis humana africana	8
1.3 Trypanosoma cruzi y Enfermedad de Chagas	10
1.3.1 Ciclo de vida	11
1.4 El metabolismo redox de los tripanosomas	14
1.4.1 Triparredoxina	17
1.4.2 Glutarredoxinas	19
1.5 Métodos disponibles para evaluar el estado tiol /disulfuro intracelular	22
1.5.1 Sondas químicas para la detección de tioles	22
1.5.1.2 Sondas (in)activadas por la escisión de enlaces disulfuro o Se-N	23
1.5.1.3 Sondas basadas en la sustitución nucleofílica de tioles	25
1.5.1.4 Sondas basadas en la reacción de adición de Michael a tioles	26
1.5.1.5 Sondas basadas en metales	27
1.5.1.6 Métodos enzimáticos para detectar cisteínas	28
1.5.1.7 Inmunodetección Redox	28
1.5.1.8 Proteómica Redox	29
1.6 Biosensores redox basados en proteínas fluorescentes	31
1.6.1 Segunda generación de biosensores GFP redox sensibles	35
1.6.2 Fusión de roGFP a tioredoxinas	37
1.6.3 Biosensores redox basados en proteínas fluorescentes con corrimiento espectral hacia el azul o rojo	38
1.6.4 Sensores redox basados en FRET	39
1.7 Expresión de biosensores redox en diferentes sistemas biológicos y nuevos hallazgos ..	41
2. Objetivos	46
2.1 Hipótesis	47

2.2 Objetivos	47
2.2.1 Objetivo General	47
2.2.2 Objetivos Específicos.....	47
3. Materiales y Métodos	48
3.1 Reactivos y fungibles.....	49
3.2 Métodos de Biología Molecular	49
3.2.1 Clonado de la secuencia de hGrx-roGFP2 en vectores de expresión de tripanosomas	49
3.2.2 Generación del mutante R53F de la 2CGrx1 de <i>T. brucei</i> y su clonado en el vector pET-Trx	51
3.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	54
3.3.1 hGrx-roGFP2 y roGFP2	54
3.3.2 Mutante R53F de la <i>Tb2CGrx1</i>	55
3.4 Técnicas analíticas.....	57
3.4.1 Cuantificación de proteínas.....	57
3.4.2 Cuantificación de tioles	57
3.4.3 Reducción y oxidación de Tripanotión	58
3.4.4 Ensayo de estabilidad de unión de centros ferrosulfurados por la <i>Tb2CGrx1</i> salvaje y mutante R53F.....	58
3.4.5 Ensayo de reducción de la insulina	58
3.5 Espectrofluorimetría	59
3.6 Cultivos Celulares	60
3.6.1 Cultivo de <i>T. cruzi</i>	60
3.6.2 Transfecciones de la forma epimastigota de distintas cepas de <i>T. cruzi</i>	60
3.6.3 Infección de líneas celulares de mamífero por <i>T. cruzi</i>	61
3.6.4 Cultivo de <i>T. brucei</i>	63
3.6.5 Transfecciones de la forma infectiva de <i>T. brucei brucei</i>	64

3.6.6 Análisis de fenotipo de las líneas reporteras de <i>T. b. brucei</i> que expresan el biosensor	64
3.6.7 Inmovilización de parásitos <i>T. brucei</i> y <i>T. cruzi</i> en placa para microscopía confocal.	65
3.7 Ensayo de Western blot	65
3.8 Citometría de flujo	66
3.9 Microscopía	67
3.9.1 Microscopía de epifluorescencia.....	67
3.9.2 Microscopía confocal	67
3.10 Infecciones de ratones BALB/cJ por <i>T. brucei brucei</i> hGrx-roGFP2	68
3.11 Ensayos de actividad biológica de compuestos sobre la forma infectiva de <i>T. b. brucei</i> hGrx-roGFP2	69
3.12 Programas computacionales.....	70
3.12.1 Base de datos	70
3.12.2 Procesamiento de datos e imágenes	70
4. Resultados y Discusión	71
4.1 Caracterización <i>in vitro</i> de los biosensores redox hGrx-roGFP2 y roGFP2	72
4.1.1 Expresión y purificación de la proteína hGrx-roGFP2	72
4.1.2 Respuesta <i>in vitro</i> del biosensor hGrx-roGFP2 a diferentes estímulos redox.....	73
4.1.3 Expresión y purificación de la proteína roGFP2	78
4.1.4 Respuesta de la proteína roGFP2 a diferentes duplas redox. Evaluación de posible fusión con enzimas parásito específico.....	79
4.2 Expresión, purificación y caracterización bioquímica de la proteína mutante Tb2CGrx1 R53F.....	85
4.2.1 Alineamiento de secuencia y mutagénesis de la Tb2CGrx1.....	85
4.2.2 Expresión y purificación de la Tb 2CGrx1 R53F	87
4.2.3 Caracterización bioquímica de la proteína Tb2CGrx1 R53F	88
4.2.3.1 Actividad reductora de insulina	88
4.2.3.2 Determinación de presencia y estabilidad centros ferrosulfurados en Tb2CGrx1 WT y R53F.....	89

4.3 Generación de las líneas celulares de <i>T. b. brucei</i> y <i>T. cruzi</i> reporteras de cambios redox	91
4.3.1 Generación de la línea celular de la forma infectiva y salvaje de <i>T. brucei</i> que expresa el biosensor hGrx-roGFP2.	91
4.3.2 Generación de <i>T. cruzi</i> cepa CL-Brener y cepa Adriana que expresa la hGrx-roGFP2	94
4.3.3 Generación de la línea celular que expresa la hGrx-roGFP2 en la forma infectiva y <i>knock-out</i> para la enzima 2CGrx1 de <i>T. brucei</i>	98
4.3.4 Análisis de la expresión de hGrx-roGFP2 en líneas transgénicas de tripanosomas...	99
4.4 Validación biológica de las líneas reporteras de cambios redox de <i>T. b. brucei</i> y <i>T. cruzi</i>	103
4.4.1 Caracterización de la línea celular sanguínea de <i>T. brucei</i> hGrx-roGFP2.....	103
4.4.2 Caracterización de la línea celular sanguínea de <i>T. brucei</i> 2CGrx1 ^{-/-} -hGrx-roGFP2 .	106
4.4.3 Análisis funcional comparativo entre la línea reportera hGrx-roGFP2 de <i>T. brucei</i> cepa salvaje y cepa Tb2CGrx1 ^{-/-}	108
4.4.4 Caracterización de la línea reportera <i>T. cruzi</i> hGrx-roGFP2	112
4.4.5 Oxidación de hGrx-roGFP2 por peroxinitrito	117
4.5 Evaluación preliminar de las líneas reporteras de tripanosomátidos para detectar cambios redox in situ, en tiempo real y en contextos fisiológicos.	119
4.5.1 Análisis por microscopía confocal y de epifluorescencia de las líneas reporteras de <i>T. cruzi</i>	119
4.5.2 Infecciones de ratón con <i>T. brucei</i> hGrx-roGFP2	125
4.6 Aplicación de las líneas redox reporteras de <i>T. brucei</i> y <i>T. cruzi</i> a la evaluación de actividad biológica de compuestos químicos.....	128
4.6.1 Antecedentes previos.....	128
4.6.2 Aproximación al modo de acción de ciertos compuestos sobre la forma infectiva de <i>T. brucei</i> de la línea reportera hGrx-roGFP2	128
4.6.3 Aproximación al modo de acción de benznidazol y nifurtimox sobre <i>T. cruzi</i> CL-Brener hGrx-roGFP2.....	136
5. Conclusiones y Perspectivas.....	139
6. Bibliografía.....	143
7. Agradecimientos.....	158

1. Introducción

1.1 Aspectos generales del género *Trypanosoma*

Los Protozoa forman un sub-reino dentro del reino Protista. Se trata de un grupo muy diverso representado en su mayoría por organismos eucariotas unicelulares de gran complejidad y con motilidad. Este grupo está ubicado en la raíz evolutiva de los actuales animales. Se han descrito más de 50.000 especies, la mayoría organismos de vida libre, con capacidad de colonizar una gran diversidad de hábitats. La gran mayoría de los animales superiores se encuentran infectados con una o más especies de protozoarios. Las infecciones van desde asintomáticas a letales dependiendo de la especie y cepa del parásito y de la resistencia del huésped.

En 1985, la sociedad de Protozoologistas publicó el esquema taxonómico de distribución de los Protozoa en seis filos. Dos de estos seis filos, Sarcomastigofora y Apicomplexa, contienen la mayoría de las especies causantes de enfermedades humanas (Yaeger, 1996) y (Corliss, 2001).

El orden Kinetoplastida, perteneciente al filo Sarcomastigofora, fue creado 40 años atrás, al agrupar a dos familias que inicialmente se consideraban protozoos no relacionados, *Trypanosomatidae* y *Bodonidae*. Aquí vale la pena destacar que la familia *Trypanosomatidae* se compone por varios géneros de organismos siendo los dos principales *Trypanosoma* y *Leishmania*. Por otro lado, a partir de estudios filogenéticos iniciados en la década del 80 fue posible distinguir que los kinetoplástidos se relacionan estrechamente con los euglénidos (organismos unicelulares flagelados y fotosintéticos) dado que estos dos grupos de protistas convergían como una rama profunda en el árbol evolutivo de los eucariotas. Estas evidencias filogenéticas correlacionaban bien con las características morfológicas, estructurales y biológicas distintivas de ambos grupos (por ej. hetero- o auxotrofia). Hoy en día se ha puesto en evidencia que los tripanosomas claramente descienden de entre los bodonidos, y que la vieja división de los kinetoplastos en estos dos grupos es artificial (Simpson et al., 2006). Tal es así que un trabajo reciente, donde estudiaron el impacto de la incorporación de secuencias ambientales del ARNr 18S aisladas a partir de fuentes marítimas al árbol filogenético de los kinetoplástidos, propone un nuevo sistema de clasificación que divide a los kinetoplastos en Prokinetoplastina (Ichthyobodo y Perkinsiella) y Metakinetoplastina (contiene a los tripanosomátidos junto con otros tres órdenes: Neobodonida, Parabodonida y Eubodonida) (Moreira et al., 2004). *Bodo saltans*, un kinetoplastido de vida libre y con hábitos bacteriofágicos, pertenece al clado Eubodonida. Numerosos estudios indican que también los tripanosomátidos están estrechamente relacionados a este clado (Moreira et al., 2004); (Deschamps et al., 2011). Por esta razón, *B. saltans* ha resultado un organismo clave para el estudio de la evolución de los tripanosomátidos.

El género *Trypanosoma* comprende tanto las especies con origen en el continente africano, como por ej. *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* y *T. vivax* como aquellas que emergieron en el Nuevo Mundo, como por ej. *T. cruzi* y *T. rangeli*. Estudios moleculares recientes apoyan la teoría que propone que *Trypanosoma* y *Leishmania* descienden de

parásitos de insectos hematófagos que, accidentalmente, sobrevivieron a la transmisión y lograron adaptarse a un huésped vertebrado (Simpson et al., 2006). Siguiendo esta hipótesis, el origen de estos géneros (o la de sus ancestros con capacidad de infectar vertebrados) debe ser posterior a la aparición de los primeros vertebrados (370 millones de años atrás), dado que es poco probable que los vertebrados acuáticos pudieran ser blanco de los insectos terrestres (Simpson et al., 2006). Las especies de *Leishmania* presentan menor divergencia en sus secuencias de ARNr que las observadas en tripanosomas, por lo que estudios recientes permitieron estimar que este género tuvo su origen 100 millones de años atrás (Simpson et al., 2006). Por lo tanto, la transmisión del tripanosoma monoxénico (insecto) a la sangre de un vertebrado debe haber ocurrido muchas veces, pero solo tuvo éxito unas pocas. Sin embargo, una vez que la adaptación al huésped vertebrado fue exitosa, al patógeno se le facilitó el acceso a muchos otros nichos por transmisión vectorial directa (Simpson et al., 2006).

Es sabido que algunas características que son vitales para organismos de vida libre, pero que no son necesarias para organismos parásitos dentro del ambiente de su huésped, se pierden o eliminan cuando la presión selectiva por retenerlas desaparece. De esta forma, una reducción del fenotipo debería tener como contrapartida una disminución del tamaño del genoma de los parásitos. Los tripanosomátidos no parecen haber reducido el tamaño de su genoma (25–35 Mb en estado haploide) o la densidad génica (2,8–4,6 Kb/gen), ya que estos se comparan a los hallados en otros eucariotas unicelulares de vida libre (Jackson et al., 2014). Sin embargo, el genoma de los tripanosomátidos ha sufrido una minimización funcional asociada a la pérdida de algunos genes esenciales para otros Kinetoplastidos de vida libre. Por ejemplo, son auxótrofos para pteridina o folato, cofactores esenciales para la biosíntesis de macromoléculas, ya que perdieron los genes de las enzimas encargadas de la biosíntesis de estos importantes cofactores (Beck et al., 1990), (Bello et al., 1994), (Nare et al., 1997); (Ouellette et al., 2002). De manera similar, tienen que importar hemo de sus huéspedes u obtenerlo de bacterias endosimbiontes (Alves, 2011), ya que carecen de enzimas de la ruta biosintética (Chang et al., 1975); (Koreny et al., 2010). Los tripanosomas también son auxótrofos para purinas (Marr et al., 1978); (Gutteridge et al., 1979), vitales para la biosíntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo energético.

Otros componentes clásicos de la bioquímica eucariota también están ausentes, como por ejemplo la catalasa, la tiorredoxina reductasa y la glutatión reductasa, enzimas claves en la mantención de la homeostasis redox intracelular. Precisamente, el sistema redox dependiente de tioles de estos parásitos presenta características que lo hacen único y, en buena parte, ejemplifica la presión evolutiva a la que fue sometido el organismo, la cual fue resuelta exitosamente mediante simplificaciones funcionales (ver más adelante, (R. L. Krauth-Siegel et al., 2008); (Oza et al., 2005); (M. Comini et al., 2003)).

Una característica que destaca a los tripanosomas del resto de los eucariotas es que transcriben sus genes como largos policistrones que, como precursores de ARNs, luego son

procesados y transformados en ARNm monocistrónicos. Por este y otros motivos más (ej. no se han identificado promotores para la ARN polimerasa II), la regulación de la expresión génica en estos organismos es fundamentalmente controlada a nivel post-transcripcional (Torri et al., 1988); (Tschudi et al., 1985).

Las enfermedades causadas por tripanosomas son muy diferentes en términos de patología (Tabla 1), pero comparten estrategias similares para el tratamiento y control. A pesar de los esfuerzos por desarrollar una vacuna, los tratamientos actuales son exclusivamente quimioterápicos (Kinoshita et al., 2008); (Miyahira et al., 2008), aunque la gran mayoría de los correspondientes principios activos no haya estado sujeta a evaluaciones de eficacia y seguridad clínica. Muchos de los fármacos anti-tripanosomátidos disponibles hoy en día fueron descubiertos y desarrollados a comienzos y mediados del siglo XX. La mayoría de estos compuestos solo son efectivos durante la fase de infección aguda, no así para el tratamiento de las etapas tardías de la enfermedad, caracterizándose además por presentar marcados efectos secundarios (encefalitis, anorexia, vómitos, diarrea, etc). Los fármacos comercializados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son nifurtimox (1; Lampit®) y beznidazol (2; Rochagan®), pertenecientes a la clase de compuestos nitroaromáticos. El tratamiento contra la tripanosomiasis africana humana (HAT) depende de fármacos descubiertos hace 40 años, conocidos como suramina (3; Germanin®), una naftilurea polisulfonada, pentamidina (4; Pentacarinat®), una diamidina aromática, y melarsoprol (5; Mel b, Arsobal®). La eflornitina (6; Ornidyl®), un análogo del aminoácido ornitina, el cual actúa como un inhibidor de la enzima ornitina descarboxilasa que interfiere así con la vía metabólica de las poliaminas, es la excepción ya que este fármaco fue desarrollado de manera racional en la década de los 80' aunque inicialmente con fines cosméticos (Bacchi et al., 1979). La mayor desventaja de este fármaco es su alto costo y su efectividad limitada solo a la subespecie *T. brucei gambiense* (A. H. Fairlamb et al., 2003); (Nok et al., 2005).

1.2 *Trypanosoma brucei* y Tripanosomiasis humana africana

El parásito *Trypanosoma brucei* causa la “enfermedad del sueño” en humanos y la enfermedad “Nagana” en el ganado (Steenkamp et al., 2002). Estas enfermedades son endémicas de países del África subsahariana dado que el vector que la transmite infesta de manera predominante esta región del planeta. El ciclo de vida del tripanosoma africano se divide en 2 etapas (Figura 1): una que incluye la infección del huésped mamífero (ganado u hombre) y otra de desarrollo en un insecto o vector biológico (mosca hematófaga del género *Glossina* conocida como mosca *tse-tse*).

Cuando una mosca *tse-tse* infectada pica a un mamífero le inyecta la forma infectiva del parásito junto con la saliva. El parásito se multiplica primariamente en el sitio de infección durante cerca de 3 días, lo cual comúnmente da lugar al desarrollo de un edema inflamatorio que desaparece después de 3-4 semanas. Luego el patógeno se disemina por

todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo, iniciando la fase aguda de la enfermedad. En el huésped vertebrado la forma tripomastigota se multiplica por fisión binaria, pero a diferencia de *T. cruzi* y *Leishmania* spp., *T. brucei* no invade células u órganos, sino que habita en fluidos intersticiales incluyendo sangre, linfa y líquido cefalorraquídeo (CDC, 2012).

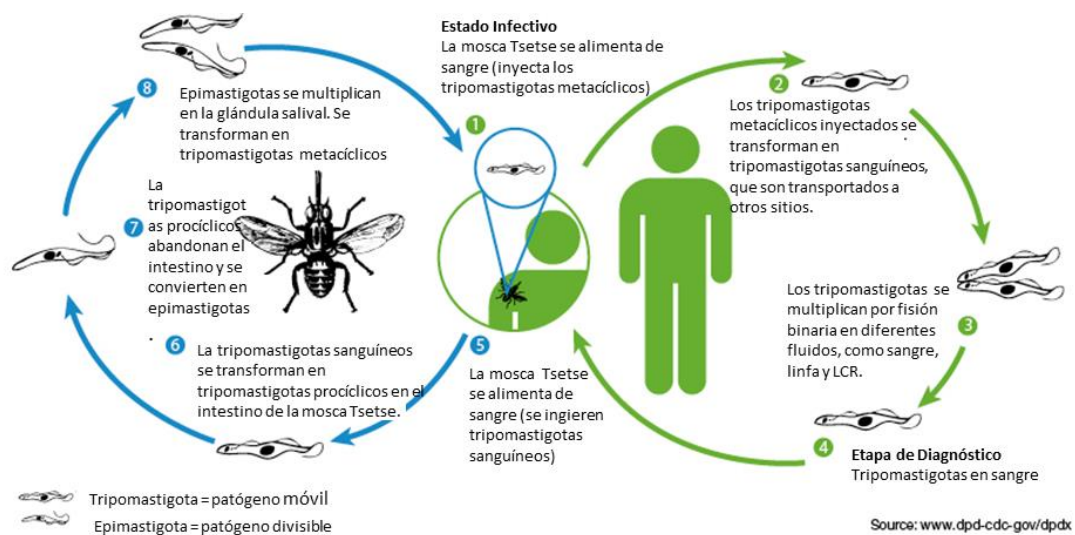


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. En azul se señalan y explican las etapas que suceden dentro del vector insecto mientras que en verde aquellas que ocurren dentro del ser humano. LCR, líquido cefalorraquídeo. Tomada y adaptada de www.dpd-cdc.gov/dpdx

Los tripomastigotes sanguíneos están recubiertos en su superficie con glicoproteínas las cuales son altamente inmunogénicas y están tan densamente empacadas que impiden el acceso de anticuerpos a otros componentes de la membrana. Por otro lado, el parásito cuenta con un repertorio de cerca de 2000 genes codificantes para distintas variantes de esas proteínas, denominadas *VSG* (del inglés *variant surface glycoprotein*), lo cual le permite evadir el sistema inmune humoral del huésped (Marcello et al., 2007); (Stockdale et al., 2008). Hasta hace unos años se creía que en cualquier momento durante la infección unos pocos parásitos de la población pasaban a expresar, de manera estocástica, una nueva variante de *VSG* (Turner C.M. et al., 1997); (Miller E.N. et al., 1981); (Hall J.P.J. et al., 2013); (Morrison L.J. et al., 2005). Como las variantes anteriores son reconocidas por el sistema inmune, los parásitos que las expresan son eliminados, permitiendo así una repoblación por aquellos con *VSG* recién conmutadas dando lugar a ondas de parasitemia bien características (Ross et al., 1910). Sin embargo, estudios recientes sobre muestras de pacientes con enfermedad del sueño mostraron la presencia simultánea de una gran diversidad de *VSG*, sugiriendo que la infección se da con una dinámica compleja de

variación de los VSG (Morrison et al., 2014). Un par de trabajos publicados un año atrás, lograron demostrar, empleando técnicas de alta resolución, que el recambio de unas pocas variantes de VSG por vez no ocurre a una tasa suficiente para sostener la evasión de la respuesta inmune (Mugnier et al., 2015) y que durante la infección se estaría expresando un gran repertorio de VSG que estaría sujeto a recombinación genética altamente eficiente lo cual asegura una rápida y gran diversidad de VSG (Morrison et al., 2014), y por lo tanto, la persistencia de la infección. La cronicidad de este fenómeno acarrea una gran producción de anticuerpos que llevan a la formación de complejos, que activan la vía del complemento y causan daños directos en los endotelios de los vasos y en los riñones. Los daños en los vasos generan edemas y micro-infartos en el cerebro, mientras la anemia es debida a la destrucción de los eritrocitos por lisis mediada por complemento, pero fundamentalmente por macrófagos del sistema retículo endotelial (Botero et al., 2003).

La tripanosomiasis humana africana es causada por las subespecies *rhodesiense* y *gambiense* de *Trypanosoma brucei*, se estima un número actual de casos menor a 20.000 y una población en riesgo de 65 millones de personas (OMS, Febrero 2016). *T. b. rhodesiense* representa menos del 2% de los casos diagnosticados, la enfermedad que produce se desarrolla muy rápidamente y de manera aguda, observándose los primeros síntomas a las pocas semanas o pocos meses después de la infección, conduciendo a la muerte en cuestión de semanas o en un lapso menor a los 2 años (OMS 2016). Dado el rápido desenlace fatal de esta infección es probable que el verdadero número de pacientes, y por lo tanto el porcentaje total, se esté subestimando. Por otro lado, las infecciones por *T. b. gambiense* son más frecuentes y representan la mayoría de los casos (98%) de tripanosomiasis humana (OMS, Febrero 2016). Esta enfermedad tiene un desarrollo más lento donde el paciente puede pasar meses o años sin o con manifestaciones esporádicas de la misma. Sobre la fase final de la enfermedad y cuando los síntomas se hacen evidentes, el parásito ha logrado atravesar la barrera hemato-encefálica comprometiendo al sistema nervioso central (Kennedy et al., 2006). Los esfuerzos sostenidos en el control de la infección han reducido el número de muertes siendo que en el 2009 se reportaron por primera vez en 50 años menos de 10.000, y en 2014 se registraron 3796.

1.3 *Trypanosoma cruzi* y Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una zoonosis que constituye un problema de salud pública importante en Latinoamérica. Según datos de la OMS, se estima que alrededor de 8 millones de personas portan esta infección, principalmente en Latinoamérica, siendo la tasa de mortalidad de 12.000 personas por año (OMS, 2014). La morbilidad y mortalidad son especialmente elevadas en personas que viven en el medio rural y en condiciones de pobreza, donde el tipo de vivienda y la dificultad para el acceso a la atención médica facilitan la transmisión vectorial y complican el diagnóstico en etapas tempranas de la

infección. Alrededor de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de contagio, sin embargo esta cifra se logró reducir considerablemente en la últimas dos décadas gracias a los programas de control del vector de transmisión (OMS, 2014). La forma más frecuente de infección se da por transmisión vectorial, y se produce por el contacto de las mucosas o dermis con heces de insectos de la subfamilia *Triatominae* (familia *Reduviidae*, orden *Hemiptera*) infectados con el parásito. Si bien se han reconocido más de cien especies de estos insectos, solamente unas diez cohabitan con los humanos. Entre estos se encuentran *Triatoma infestans*, responsable del 85% de los casos de Chagas en el cono sur, *Rhodnius prolixus*, el segundo vector más importante en Centroamérica, y *Panstrongylus megistus* (OMS, 2007). En menor medida, la infección también puede ocurrir por ingesta de alimentos contaminados con heces del insecto que portan las formas infectivas del parásito. Dentro de las formas alternativas de transmisión se encuentran: la transfusión de sangre, el transplante de órganos y la vía congénita por parte de madres infectadas (Cavalli et al., 2009). Estas formas de transmisión cobran relevancia en países de América del Norte, Europa u Oceanía, donde el vector no se encuentra presente, pero la migración de personas infectadas ha llevado a la expansión de la enfermedad fuera de su región endémica (OMS, 2010).

1.3.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* (Fig. 2), que comprende una etapa intracelular en un huésped mamífero y otra en el insecto triatomo, involucra tres estadios: epimastigota, tripomastigota y amastigota (Fig. 2). La forma tripomastigota es una célula elongada con el núcleo ubicado de forma central y el kinetoplasto (o ADN mitocondrial condensado) en el extremo posterior. En este estadio el flagelo nace en el extremo posterior del parásito y se extiende a lo largo y adherido a la membrana celular hasta el extremo anterior del cuerpo, desde donde se proyecta hacia el medio extracelular. La forma epimastigota es ligeramente menor que el tripomastigota. El cuerpo del parásito sigue elongado, pero el kinetoplasto se ubica ahora anterior al núcleo. Por el desplazamiento del kinetoplasto, el flagelo se origina en el centro del cuerpo. La forma amastigota es pequeña y redondeada, presenta un núcleo y kinetoplasto pero carece de flagelo (sólo conserva un vestigio de este). En el intestino del insecto se encuentra la forma epimastigota la cual se diferencia a la forma infectiva de tripomastigota metacíclico que es excretada en la heces del insecto. Tanto la forma epimastigota como tripomastigota son formas extracelulares, y aunque si bien esta última es capaz de invadir células, dentro de las mismas ésta se diferencia rápidamente a la forma amastigota, como se describe a continuación.

abundante en la forma amastigota del parásito en el interior de las células de mamífero) podrían estar involucrados (Cruz et al., 2012); (Tyler et al., n.d.). Durante la diferenciación hacia formas tripomastigotas, la morfología y posicionamiento del kinetoplasto suele ser un marcador tardío del proceso (Tyler et al., n.d.). Diversos factores mecánicos (movimiento del flagelo de los tripomastigotas), físicos (incremento de la presión intracelular) como bioquímicos, desencadenan la lisis de las células infectadas liberando tripomastigotas y amastigotas que no hayan completado el ciclo de diferenciación.

Esta población pleomórfica de tripomastigotas sanguíneos (que también puede llegar a tener hasta un 10% de amastigotas) puede ser ingerida por un insecto *reduviid*. En el intestino medio de la vinchuca, los tripomastigotas no replicativos o bien los amastigotas se diferenciarán a epimastigotas. Eventualmente, los epimastigotas llegan al recto del insecto y se adhieren a la cutícula del mismo por intermedio de su flagelo. Aquí sufrirán un proceso denominado metaciclogénesis que implica cambios morfológicos y bioquímicos dramáticos. Esta elongación del flagelo permite al tripanosoma adherirse a superficies hidrofóbicas y estas interacciones son las que disparan la metaciclogénesis mediante un mecanismo AMPc-dependiente. Finalmente, los tripomastigotas (metacíclicos) infectivos terminan por desprenderse y son eliminados en las heces del insecto (Tyler et al., n.d.).

T. cruzi emplea la diferenciación celular como una estrategia para adaptarse a los diversos ambientes que encuentra en el huésped y el vector. La diferenciación está altamente controlada, y requiere la modificación de estructuras y funciones clave que involucran: i) la superficie celular, que le permitirá interactuar con los diferentes ambientes, ii) el citoesqueleto, tanto pelicular como flagelar, que termina afectando la morfología y motilidad, iii) la captación de nutrientes y metabolismo, por regulación de la estructura y actividad de la mitocondria principalmente, pero también por (in)activación de algunas enzimas glicosomales o citosólicas, iv) el ciclo celular y v) los mecanismos de defensa, dado que la respuesta a la infección por parte del huésped mamífero y del insecto son extremadamente diferentes (Noireau et al., 2009).

Tabla 1. Principales diferencias entre la tripanosomiasis africana humana (HAT) y la enfermedad de Chagas

	HAT	Enfermedad de Chagas
Principales formas o estadios de la enfermedad	Estadio temprano (hemolinfático), estadio tardío (SNC)	Fase aguda, indeterminada, crónica (forma cardíaca y digestiva)
Organismos causantes	<i>T. b. gambiense</i> y <i>T. b. rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>

Célula / tejido huésped	Extracelular, en sangre, linfa, fluido cerebro espinal, espacios intercelulares	Intracelular, músculo liso, intestino, sistema nervioso central, tejido adiposo, cardiomiocitos.
Vectores de importancia médica	Moscas tse-tse (≈ 20 <i>Glossina spp.</i>)	<i>Triatominae spp</i>
Transmisión	Picadura de mosca, congénita (raro), transfusión de sangre (raro)	Contacto de mucosas y heridas expuestas con heces de insectos infectados (p.e. en sitio de picadura, vía oral por ingesta de comida contaminada y mucosa ocular), por transfusión de sangre y transmisión congénita
Distribución geográfica	África sub-Sahara (36 países)	América del sur y central (19 países)
Población en riesgo	65 millones	25 millones
Infectados	70.000 – 80.000	8 – 11 millones
Muertes por año	<4.000	12.000
Medidas de prevención y control	Vigilancia activa de población en riesgo, tratamiento de pacientes infectados con fármacos, trampas para moscas tse-tse, destrucción del hábitat de la mosca para evitar re-invasión	Tratamiento de casas con insecticidas, tratamiento quimioterápico de casos agudos, indeterminados tempranos o congénitos, mejoramiento de hogares

Datos obtenidos de <http://www.who.int/neglecteddiseases/diseases>

1.4 El metabolismo redox de los tripanosomas

Los organismos aerobios utilizan oxígeno (O_2) para obtener energía a partir de nutrientes y con la cual abastecerán distintas funciones celulares. Especies reactivas del oxígeno (EROs), como el radical aniónico superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), así como las especies reactivas del nitrógeno, como por ejemplo el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), son generadas continuamente por células que crecen de forma aeróbica o bien como respuesta de éstas a estímulos ambientales (ej. radiación UV, metabolización de xenobióticos y defensa contra agentes exógenos) (Imlay et al., 2003). Estas especies tienen alta avidez por reaccionar con moléculas biológicas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, azúcares, etc), provocando la oxidación irreversible de las mismas con

graves consecuencias para sus funciones dentro de la célula (Cabiscol et al., 2000). Los radicales libres y peróxidos pueden atacar directamente los ácidos grasos poli-insaturados en las membranas e iniciar la peroxidación de lípidos. El primer efecto de esta peroxidación es la disminución de la fluidez de las membranas, lo cual afecta la actividad de las proteínas estructurales y funcionales ancladas a las mismas, hasta llegar a comprometer seriamente la permeabilidad. Estos efectos actúan como amplificadores, generando más radicales libres, degradando ácidos grasos poli-insaturados a una variedad de productos. Algunos de ellos, como por ejemplo los aldehídos, son grupos electrofílicos altamente reactivos y capaces de modificar de manera irreversible distintas biomoléculas. Por otra parte, el ADN es otro de los principales blancos de las especies oxidantes, las cuales pueden reaccionar tanto contra las bases nitrogenadas como contra los azúcares produciendo roturas simples o dobles en los enlaces, aductos entre las bases y azúcares y *cross-linking* con otras moléculas. Estas modificaciones químicas suelen ser irreversibles e implican un bloqueo del proceso de replicación del material genético. Por último, el ataque de especies oxidantes a las proteínas incluye la oxidación de grupos sulfhidrilo (tioles), modificación de grupos prostéticos o *clusters* de metal, *cross-linking* entre proteínas o fragmentación peptídica, entre otras (Cabiscol et al., 2000).

A lo largo de su evolución los organismos vivos desarrollaron mecanismos de protección contra las especies oxidantes. Uno de ellos lo constituyen los grupos tiólicos activos que están presentes en proteínas y compuestos de bajo peso molecular, los cuales juegan un rol fundamental como amortiguadores que equilibran perturbaciones del estado redox intracelular. Los kinetoplástidos están equipados con tioles de bajo peso molecular (Fig. 3) y proteínas redox activas que conforman un sistema redox dependiente de tioles único. El principal cosubstrato redox de bajo peso molecular presente en estos organismos lo constituye el tripanotión [N^1, N^8 bisglutathionil espermidina], un ditiol formado por dos moléculas de glutatión (GSH) unidas covalentemente a una molécula de espermidina. El tripanotión fue identificado por primera vez en el tripanosomátido *Crithidia fasciculata* hace más de 25 años atrás (A. H. Fairlamb et al., 1989)). Trabajos posteriores confirmaron su existencia en distintas especies de la familia *Trypanosomatidae* (citados en (L. Krauth-Siegel et al., 2007)).

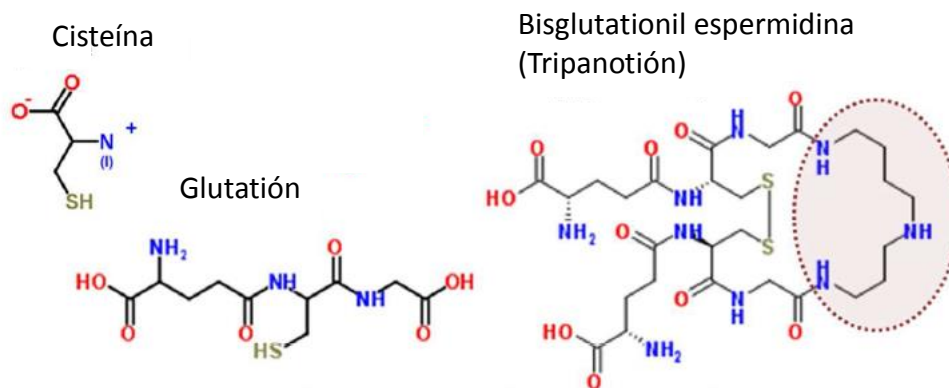


Figura 3. Tioles de bajo peso molecular presentes en los kinetoplástidos.

En total acuerdo con las evidencias bioquímicas recogidas a lo largo de estas últimas décadas en lo que respecta a los componentes del sistema redox de los tripanosomátidos (L. Krauth-Siegel et al., 2007); (Smith et al., 1992), los proyectos de secuenciación genómica culminados hace una década atrás (Berriman et al., 2005); (El-Sayed et al., 2005); (Ivens et al. 2005) confirmaron que estos organismos carecen de glutatión reductasa (GR) y tioredoxina reductasa (TrxR), dos enzimas indispensables en la mantención de la homeostasis redox en células de mamíferos.

El sistema básico con el que cuenta el parásito para mantener su equilibrio redox se completa con la enzima encargada de regenerar la forma reducida del tripanotión, la tripanotión reductasa (TR) (R. L. Krauth-siegel et al., 1987); (Shames et al., 1986); Smith et al., 1997), y una oxidoreductasa, la triparredoxina (TXN) (Gommel et al., 1997); (Montemartini et al., 1998), que aporta control catalítico a las reacciones de oxidoreducción dependientes del tripanotión sobre diversos blancos moleculares (R. L. Krauth-Siegel et al., 2008); (Manta et al., 2013); (M.D. Piñeyro et al., 2011). El hecho que los parásitos sean capaces de resistir el ataque oxidativo durante el proceso de infección y se adapten a diferentes condiciones metabólicas y ambientales durante su ciclo de vida, indica que a pesar del minimalismo de su sistema redox este opera de manera muy eficiente (R. L. Krauth-Siegel et al., 2008).

El dihidro tripanotión (forma reducida, $T(SH)_2$) reemplaza al GSH en la mayoría de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro que ocurren a nivel celular. Se ha determinado que $T(SH)_2$ presenta mayor reactividad que GSH en reacciones de óxido-reducción, una propiedad fundamentada en su naturaleza ditiólica y en el hecho que a pH fisiológico al menos una de sus cisteínas se halla en su forma desprotonada, tiolato, la cual es más reactiva para intervenir en reacciones de intercambio tiol-disulfuro (Moutiez et al., 1995). Por otro lado, se ha propuesto que el carácter ditiólico del $T(SH)_2$ favorece la formación de puentes disulfuro intramoleculares luego de reacciones oxidación por uno o dos electrones, previniendo la formación de radicales sulfinilo ($RSO\cdot$), una especie capaz de propagar la oxidación a otras moléculas (Manta et al., 2013). Los niveles de $T(SH)_2$ varían a lo largo del ciclo de vida del parásito, por ejemplo para el caso de *T. cruzi* su concentración es de 1,5-2,1 mM en epimastigotes, 0,5 mM en tripomastigotes y 0,12 mM en amastigotas (M R Ariyanayagam et al., 2001); (M. R. Ariyanayagam et al., 2003); (Maya et al., 1997); (Thomson et al., 2003a), mientras que para la forma infectiva de *T. brucei* los valores oscilan entre 0,1 y 0,34 mM y para la forma procíclica (no infectiva) el valor es cercano a 0,34 mM (M. R. Ariyanayagam et al., 2001); (M. A Comini et al., 2007); (Shahi et al., 2002).

El $T(SH)_2$ se mantiene en su estado reducido por la actividad NADPH-dependiente de la TR (Fig. 4). Esta enzima, perteneciente a la familia de las FAD-cisteín-oxidoreductasa, es un homodímero, con una masa de 55 kDa por subunidad (R Luke Krauth-siegel et al., 1987). La TR tiene un 35% de identidad de secuencia con la GR humana, compartiendo ambas muchas propiedades físicoquímicas, no así su especificidad por la naturaleza química de

los disulfuros a ser reducidos: TR interactúa con formas oxidadas cargadas positivamente de conjugados glutatión-poliamina como las presentes en $T(SH)_2$ y monoglutationil espermidina, mientras que GR sólo acepta glutatión oxidado (GSSG) cuya carga neta es negativa (Bradley et al., 1991); (Iribarne et al., 2002). La especificidad está determinada por 5 aminoácidos en el dominio de unión al sustrato, que hace al sitio activo de la TR más amplio, hidrofóbico y negativo respecto al de GR (Bradley et al., 1991); (Iribarne et al., 2002). La TR de varios tripanosomátidos, incluidos *T. cruzi* y *T. brucei*, contiene una extensión C-terminal con una señal putativa de localización glicosomal, por lo que se ha llegado a postular que una fracción de la enzima se halla en este compartimento además del citosol (Schlecker et al., 2005). Dado que los tripanosomas carecen de GR y TrxR, la TR es la única enzima capaz de conectar la generación de poder reductor en forma de NADPH con el sistema redox dependiente de tioles. Experimentos de genética reversa han demostrado que la TR es esencial para la viabilidad de *T. brucei*, validando a esta enzima como uno de los posibles blancos terapéuticos dentro del metabolismo redox del parásito (Krieger et al., 2000); (Tovar et al., 1996).

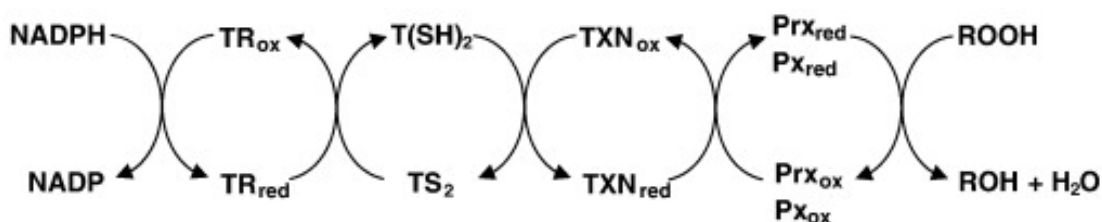
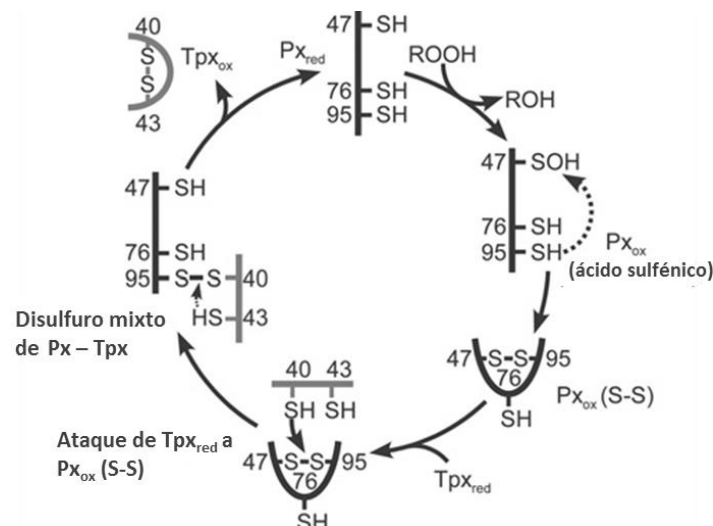


Figura 4. Esquema del sistema redox de descomposición de peróxidos mediado por $T(SH)_2$. La descomposición de peróxidos (ROOH) es llevada a cabo por peroxirredoxinas (Prx) y peroxidasa del tipo glutatión-peroxidasa (Px), enzimas que obtienen sus equivalentes de reducción de una cascada compuesta por tripanoxirredoxina (TXN), tripanotión reducido $T(SH)_2$ y tripanotión reductasa (TR), que adquiere poder reductor de NADPH. Los subíndices red y ox hacen referencia al estado de redox ditiólico o disulfuro, respectivamente, de las proteínas. TS₂ (tripanotión oxidado).

1.4.1 Tripanoxirredoxina

Tripanoxirredoxina, TXN, es el nombre que reciben aquellas oxidoreductasas pertenecientes a la superfamilia de las tiorredoxinas que son encontradas exclusivamente en el orden *Kinetoplastida* y cuya actividad depende del tripanotión. Estas enzimas difieren de las tiorredoxinas (Trxs) en varios aspectos: i) comparten sólo un 15% de homología con ellas, ii) son aproximadamente 5 kDa más grandes, iii) su sitio activo presenta el motivo WCPPCR, en lugar del clásico WC(G/A)PCK presente en la mayoría de las Trxs (Lüdemann et al., 1998) y iv) TXN no es reducida directamente por una flavoproteína NADPH-dependiente (como la TrxR) sino por un ditiol de bajo peso molecular, el $T(SH)_2$ (Gommel et al., 1997) (Fig. 7). TXN es una proteína muy abundante, en la forma infectiva de *T. brucei* alcanza una concentración intracelular de hasta 100 μ M (M. A. Comini et al., 2007) mientras que en *C. fasciculata* representa entre un 3-5% del contenido proteico soluble total (Gommel et al., 1997). Esta enzima aporta control catalítico a la mantención del

equilibrio redox intracelular del parásito ya que resuelve enlaces disulfuro intramoleculares de distintas proteínas blanco con una eficiencia que llega a ser al menos tres órdenes de magnitud superior a la reacción de reducción directa por $T(SH)_2$. El mecanismo de reacción de la TXN con sus blancos involucra a ambas cisteínas de su sitio activo. La cisteína N-terminal del motivo CPPC del sitio activo está expuesta al solvente, y su nucleofilicidad está garantizada por un rápido intercambio de protones que involucra a la segunda cisteína y una red de residuos internos sin carga. El anión tiolato reacciona con disulfuros de proteínas específicas, dando lugar a la formación de puentes disulfuro mixtos entre la TXN y la molécula blanco. El ataque del disulfuro mixto por la cisteína C-terminal del sitio activo de la TXN libera el blanco proteico reducido generándose concomitantemente la forma oxidada de TXN (Esquema 1) (Schlecker et al., 2005). La regeneración de TXN reducida se da por una reacción espontánea con el $T(SH)_2$. Los sustratos mejor estudiados de la TXN son distintos tipos de peroxidases y la ribonucleótido reductasa (R. L. Krauth-Siegel et al., 2002). Existen otras proteínas que son discutidas como potenciales blancos de acción de la TXN, como aquella que participa en la replicación del ADN mitocondrial (la UMSBP, *universal minicircle sequence binding protein*) (Avrahami et al., 1995), en la biogénesis de centros ferro-sulfurados (glutarredoxinas monotiolicas) (Filser et al., 2008), en la generación de NADPH y pentosas-5-fosfato (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) (R. L. Krauth-Siegel et al., 2008), precursores de cisteína (cistationin-γ-liasa) y poliaminas (metiltioadenosin fosforilasa, amidino transferasa) y algunas involucradas en la síntesis y degradación proteica (R. L. Krauth-Siegel et al., 2008); (M. D. Piñeyro et al., 2011). Dado que la función de muchas proteínas depende del estado redox de algunos de sus residuos de cisteína, los cuales pueden cumplir roles catalíticos o estructurales importantes, la actividad tiol/disulfuro oxidoreductasa de TXN le asegura al parásito el control y sostenimiento de dichas funciones (Fig. 4 y 5).



Esquema 1. Mecanismo de reacción propuesto para la TXN (también denominada Tpx). En este ejemplo se tomo como modelo de proteína blanco de la TXN, a una PX. En la primera mitad del mecanismo de reacción la Px reducida (Px_{red}) reacciona con un hidropéoxido (sustrato), oxidándose su Cys⁴⁷ a ácido sulfénico [Px_{ox} (ácido sulfénico)]. El ataque posterior de la Cys⁹⁵ provoca la formación de un disulfuro intramolecular en la Px [Px_{ox} (S-S)]. En la segunda mitad del mecanismo de reacción la Cys⁴⁰ de la Tpx

reducida (Tpx_{red}) ataca a la Cys⁹⁵ del enlace disulfuro resultando en un disulfuro intermolecular entre ambas proteínas (Px-Tpx disulfuro mixto). Finalmente la Cys⁴³ de la Tpx ataca a la Cys⁴⁰ vecina liberando la Px_{red} y la forma oxidada de la Tpx (Tpx_{ox}). Tomado y modificado de (Schlecker, Comini, Melchers, Ruppert, y Krauth-Siegel, 2007).

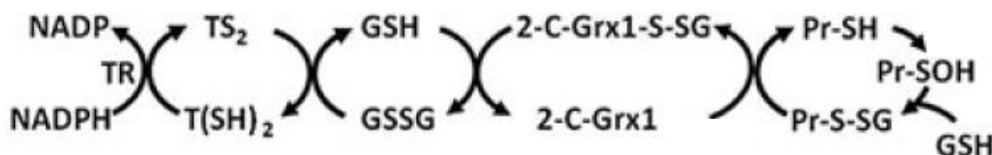
Una de las rutas metabólicas a las cuales la dupla T(SH)₂/TXN dona poder reductor es aquella que incluye los sistemas de detoxificación de especies oxidantes (ver Fig. 4 y 5) tal como el H₂O₂, el peroxinitrito, ciertos peróxidos de compuestos orgánicos de cadena corta, de ácidos grasos y de fosfolípidos (Wilkinson et al., 2002); (R. L. Krauth-siegel et al., 2012); (Hiller et al., 2014) (Schaffroth et al., 2016); (Piacenza et al., 2008); (Trujillo et al., 2004); (M. D. Piñeyro et al., 2011)). El armamento antioxidante de *T. cruzi* y *T. brucei* está distribuido en diferentes compartimientos subcelulares (citósol, mitocondria, glicosoma y retículo endoplasmático), donde actúa frente a una gran variedad de oxidantes. Los componentes básicos del mismo son las peroxirredoxinas, peroxidases del tipo glutatión peroxidases (GPx) y las superóxido dismutasas (SOD) (Irigoín et al., 2008), (M. A. Comini et al., 2013).

Otro proceso celular destacado donde la dupla T(SH)₂/TXN juega un rol importante es en la síntesis de ADN, proveyendo equivalentes de reducción para la síntesis de precursores de ADN a través de la ribonucleótido reductasa (RnR) (Fig. 5). En grandes concentraciones, el T(SH)₂ es capaz de reducir a la RnR, siendo hasta el momento el único tiol de bajo peso molecular conocido capaz de cumplir dicha función con alta eficiencia. En presencia de TXN, el flujo de electrones hacia la RnR se acelera al menos por 3 órdenes de magnitud (Dormeyer et al., 2001).

1.4.2 Glutarredoxinas

Las glutarredoxinas son pequeñas proteínas que también pertenecen a la superfamilia de las proteínas con plegamiento Trx. Normalmente se las clasifica de acuerdo al número de cisteínas en su sitio activo, encontrándose las ditiólicas (motivo CXXC, 2CGrx o clase I) o monotiólicas (motivo CXXS, 1CGrx o clase II). Las 1CGrx fueron descubiertas más recientemente, y salvo algunas excepciones (Rahlf et al., 2001); (Tamarit et al., 2003), carecen de actividad reductora de disulfuros aunque emplean su tiol de sitio activo para unir centros ferrosulfurados y de esta forma están implicadas en el metabolismo del hierro (M. A. Comini et al., 2012). Con respecto a las 2CGrx, la mayoría de los organismos están equipados con al menos dos isoformas de estas localizadas en diferentes compartimientos subcelulares y donde operan como oxidoreductasas dependientes de GSH catalizando la (de)glutathionilación de proteínas así como la reducción de disulfuros proteicos (Manta et al., 2013) (Fig 5). A nivel fisiológico, la glutathionilación de proteínas ocurre principalmente por una reacción del GSH con un ácido cisteinsulfénico de la proteína llevando a la formación de un disulfuro mixto, que protegerá a la cisteína de su sobreoxidación y/o regulará la actividad de dicha proteína. La reducción de este hetero-disulfuro ocurre casi exclusivamente por la catálisis de 2CGrx a expensas de un mecanismo monotiólico que

involucra a la cisteína del sitio activo y una segunda molécula de GSH, que reduce el disulfuro mixto entre la glutarredoxina y el GSH (Esquema 2).



Esquema 2. Reacciones de intercambio tiol-disulfuro catalizadas por la 2CGrx1. En este sistema la 2-C-Grx1 cataliza la reducción de disulfuros proteicos mixtos entre residuos de Cys y glutatión (Pr-S-SG), generándose un disulfuro mixto entre la Cys del sitio activo de la Grx y el glutatión. Una segunda molécula de glutatión reducido (GSH) ataca la forma glutatiónilada de la Grx (2-C-Grx1-S-SG), dando lugar a la formación de glutatión oxidado (GSSG). Dada la ausencia de GR y la actividad de la 2-C-Grx1 en tripanosomátidos se ha propuesto que esta última cataliza la reducción de GSSG a GSH a expensas de tripanotión reducido (T(SH)₂). La forma oxidada del tripanotión (TS₂) es luego reducida por la tripanotión reductasa (TR) a partir del poder reductor de NADPH.

El sistema Grx clásico está compuesto por una Grx ditiólica, por GSH, por una glutatión reductasa (GR) y por NADPH. Como se mencionó anteriormente, los tripanosomátidos carecen de GR y están equipados con cinco Grxs: dos Grx ditiólicas o de Clase I (2CGrx1 citosólica y 2-C-Grx2 mitocondrial) y tres Grx monotiólicas o de Clase II (1CGrx1 y 1CGrx2 de mitocondria, y 1CGrx3 citosólica) (M. A. Comini et al., 2012). Las Grxs de los parásitos tienen una amplia gama de características bioquímicas, estructurales y biológicas peculiares, y se encuentran funcionalmente ligadas al sistema del tripanotión (M. A. Comini et al., 2012). Las Grxs monotiólicas de *T. brucei* han sido caracterizadas, y se ha visto que la 1CGrx1 es una proteína mitocondrial esencial que participa en la biogénesis de centros ferro-sulfurados (Filser et al., 2008); (M. A. Comini et al., 2008) (Manta et al., 2013).

El mecanismo de acción de las 2CGrx está estrechamente relacionado con el sistema GSH/GR, dado que el disulfuro intramolecular en la proteína oxidada se regenera mediante reducción no enzimática por dos moléculas de GSH. El disulfuro de glutatión (GSSG) resultante es reducido por la GR a expensas de NADPH (Deponte et al., 2013). En tripanosomas, esta función es llevada a cabo por las 2CGrx que catalizan con gran eficiencia ($>10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) la reducción de GSSG a expensas de T(SH)₂ (Ceylan et al., 2010), sustituyendo así a la actividad GR ausente en este linaje (M. A. Comini et al., 2012); (Manta et al., 2013) (Esquema 2). En células eucariotas, la formación de disulfuros mixtos entre proteínas y GSH (glutathionilación) es la modificación post-transcripcional más frecuente de residuos de cisteína, seguida de la adición de lípidos (Schuppe-Koistinen et al., 1994); (Xiong et al., 2011). Este podría ser el caso de tripanosomas también, donde se ha visto que la 2CGrx1 contribuye con un 50% de la actividad reductora de disulfuros mixtos del GSH en el citosol de *T. brucei* (Musunda et al., 2015).

También se ha reportado que la 2CGrx1, no así la 2CGrx2, es capaz de unir un *cluster* de hierro-azufre binuclear del tipo [2Fe-2S] (Ceylan et al., 2010)(Fig. 5). Este *cluster* está unido a la 2CGrx1 por cuatro átomos de sulfuro, dos de los cuales provienen de la cisteína

nucleofílica de dos subunidades de la la 2CGrx1 y otros dos son provistos por dos moléculas de GSH o bien una de T(SH)₂ (Manta et al., 2013). En los pocos casos estudiados, el *cluster* [2Fe-2S] unido por 2CGrx no participa en reacciones de transferencia de electrones pero sirve como elemento regulatorio que apaga la actividad oxidoreductasa al secuestrar la cisteína del sitio activo (Manta et al., 2013).

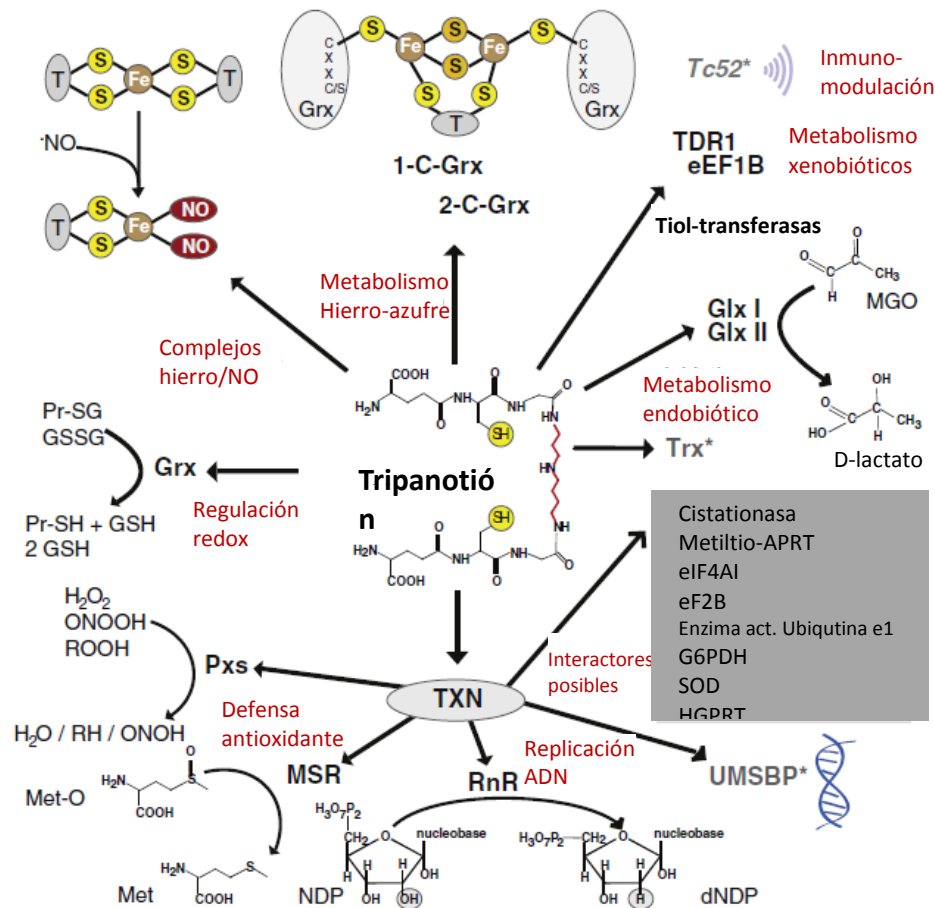


Figura 5. Funciones dependiente del tripanotión en tripanosomátidos. El tripanotión aporta equivalentes de reducción a múltiples proteínas blanco como: i) proteínas con actividad tiol-transferasa (TDR1 y eEF1B) que neutralizan los xenobióticos o con una actividad redox inmunomodulatoria (Tc52); ii) glioxalasa (Glx I y Glx II), las cuales transforman un cetoaldehído altamente tóxico (metilglioxal, MGO), derivado del catabolismo de la glucosa, en un ácido orgánico más inocuo (D-lactato); iii) triparredoxina (TXN) es la oxidoreductasa más importante que cataliza la transferencia de electrones del tripanotión a proteínas que sintetizan precursores de ADN (como la ribonucleótido reductasa, RnR) o que median la replicación de ADN mitocondrial (UMSBP, *universal minicircle sequence binding protein*), y a enzimas involucradas en la protección contra el daño oxidativo como la metionina sulfureductasa (MSR) y diversas clases de peroxidasas (Pxs); iv) las glutarredoxinas de ditiólicas (Grx o 2-C-Grx) que contribuyen a la homeostasis del GSH y están involucradas en la resolución de disulfuros mixtos proteína-GSH. Estudios recientes han identificado nuevas funciones para el T(SH)₂ como ligando del hierro y de complejos hierro-NO así como de centros ferro-sulfurados proteicos libres o unidos a proteínas como las Grx mono- (1-C-Grx, sitio activo CXXS) o ditiólicas (2-C-Grx, sitio activo CXXC). La identificación de nuevos interactores de la TXN ha abierto la posibilidad que otras funciones celulares estén sujetas a regulación redox por parte del tripanotión (recuadro gris). Abreviaciones no indicadas en el texto son: NDP, nucleótido difosfato; dNDP, deoxi-nucleótido difosfato; Fe, hierro; G6PDH, glucosa-6 fosfato deshidrogenasa; APRT, metiltio-adenosin fosforilasa; eIF4AI, subunidad del factor de inicio de la traducción eucariota; eF2B, factor 2 de elongación, SOD, superóxido dismutasa; HGPRT, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; HGRT, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa; Met, metionina; Met-O, metionina sulfóxido; MGO, metilglioxal; ONOOH, ácido peroxinitroso; ONOH, ácido nitroso; Pr-SG, proteína S-glutationilada; ROOH, hidroperóxido orgánico. Tomada y adaptada de (Manta, Comini, et al., 2013).

1.5 Métodos disponibles para evaluar el estado tiol /disulfuro intracelular

Debido a la importancia de los tioles biológicos, tal como cisteína, glutatión y homocisteína, se han desarrollado diferentes técnicas para cuantificar de manera específica y sensible la presencia de los mismos en muestras biológicas. La detección selectiva de tioles por medio de sondas reactivas y sensores ha sido de gran importancia en la investigación básica y en el diagnóstico de enfermedades. Los métodos para la detección de tioles involucran sondas y marcadores basados en la adición y sustitución nucleofílica, en la adición de Michael, en la escisión de enlaces disulfuro o enlaces Se-N, o bien en interacciones de los tioles con metales, así como los novedosos biosensores basados en proteínas fluorescentes. A continuación se presenta un resumen de los principales métodos disponibles para detectar y evaluar el estado tiol/disulfuro en células y muestras biológicas.

1.5.1 Sondas químicas para la detección de tioles

Las sondas químicas explotan la nucleofilicidad de los tioles para reaccionar de manera reversible o irreversible con disulfuros, con compuestos electrofílicos, con sulfonamidas, con ésteres de sulfonato, con enlaces Se-N o con complejos metálicos (M. A. Comini, 2016). Los agentes modificadores de tioles son diseñados de manera tal que el enlace covalente entre el tiol y el quimiosensor genere cambios en las propiedades ópticas del sensor (ej. fluorescencia, fosforescencia o absorción en el UV-visible) permitiendo así medidas cuantitativas.

La mayoría de las sondas fueron desarrolladas para detectar tioles no proteicos como cisteína libre, o glutatión y homocisteína. Esto se debe a que los tioles de bajo peso molecular se encuentran accesibles en fluidos fisiológicos o simplemente porque son fácilmente extraíbles de la célula. Por otro lado, a pesar de la relativa poca abundancia de cisteína en las proteínas, las sondas actualmente disponibles no permiten un marcaje selectivo de tioles proteicos, excepto por unas contadas excepciones.

La mayor desventaja de las técnicas que emplean este tipo de sensores es que las mismas se basan en la disrupción de la integridad celular para separar los tioles de bajo peso molecular de los proteicos, lo cual impide monitorear cambios en la relación tiol/disulfuro en tiempo real. Por otro lado, las sondas químicas para tioles no pueden distinguir entre proteínas blanco y por lo que solo aportan un estimado global del estado redox de las proteínas celulares. En ese sentido, el análisis complementario por espectrometría de masa durante un procedimiento cuantitativo permite identificar y evaluar el estado redox de proteínas individuales, aunque vuelve al procedimiento más laborioso (discutido en el punto 1.5.7)

Es importante puntualizar que la medición del estado tiol/disulfuro con este tipo de sondas requiere determinar por separado los niveles de tioles totales y reducido. El nivel de tiol reducido puede ser fácilmente medido en la muestra mientras que la determinación de tioles totales implica la conversión del pool nativo de disulfuros a tioles por una reducción química o mediada por enzimas, previo a la reacción con la sonda. Sustrayendo el valor de tioles totales con el valor de tioles reducidos, se obtiene el nivel de tioles oxidados, y así la relación tiol/disulfuro. De manera alternativa, el pool de tioles oxidados puede ser medido en forma directa por medio de un pre-tratamiento de una fracción de la muestra con un agente alquilante de tioles que bloqueará los tioles libres, para luego proceder a la reducción de los disulfuros nativos previo a su reacción con la sonda.

1.5.1.2 Sondas (in)activadas por la escisión de enlaces disulfuro o Se-N

Se han desarrollado diferentes sensores químicos para tioles basados en la reducción de disulfuros como mecanismo activador de la señal. El 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) o también conocido como el reactivo de Ellman es una de los reactivos más antiguos y más usados en la cuantificación de tioles proteicos y no proteicos (Ellman, 1959). La reacción de transulfuración entre el DTNB y los tioles se ve favorecida por el bajo pKa del grupo saliente, TNB (5-mercapto-2-nitrobenzoato). La reacción es estequiométrica y el TNB liberado es un cromógeno que absorbe a 412 nm (Fig. 6). A pesar de la quimioselectividad del DTNB, el producto de reacción TNB no es reactivo frente a disulfuros proteicos, lo cual disminuye el riesgo de interferencia con procesos bioquímicos cuando es usado en muestras biológicas. La mayor desventaja del DTNB es su baja estabilidad a pH básico y la doble carga negativa que puede afectar el acceso a tioles localizados en regiones proteicas con igual carga. Además, el DTNB no es permeable, por lo que la cuantificación de tioles proteicos intracelulares requiere la disrupción celular.

Los disulfuros de tiopiridilo (por ejemplo: disulfuro 2,2'-dipiridilo y disulfuro 4,4'-dipiridilo; DPS) son reducidos por el GSH y por tioles proteicos produciendo tiopiridonas que absorben en el UV cercano (ejemplo, 320-340nm) (Le et al., 1995),(Grassetti et al., 1967) (Fig. 6). La mayor ventaja de estos compuestos es que reaccionan con tioles a bajos pH debido a la protonación del nitrógeno del anillo piridilo que activa al disulfuro (Riener et al., 2002).

Una serie de sulfuros de selenio han sido desarrollados para funcionar selectivamente con tioles proteicos (B. Tang et al., 2007) (B. Tang et al., 2009). Estas moléculas combinan la quimioselectividad de Ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona), un compuesto que contiene un enlace Se-N que es blanco del GSH, con la presencia de un fluoróforo que frente a la remoción del grupo ebselen incrementa su emisión de fluorescencia. La primera generación de estos sensores utilizaron a rodamina 6G (λ_{em} 550 nm) como molécula señalizadora y mostraron una sensibilidad frente a tioles proteicos de Trx, GR y

metalotioneina que fue 2 a 3 órdenes de magnitud superior a la observada para GSH (B. Tang et al., 2007) (Fig. 6). El potencial de esta sonda para su uso en sistemas biológicos fue ensayado sobre una línea celular de hígado humano normal (HL-7702) y otra de origen tumoral (Hep62), mostrando que el sensor (0,5 μ M) fue capaz de detectar diferencias en el contenido de tioles de ambas líneas celulares. Una segunda generación de esta sonda, denominada Rh-Se-2, fue diseñada para obtener una mayor relación señal/ruido (B. Tang et al., 2009).

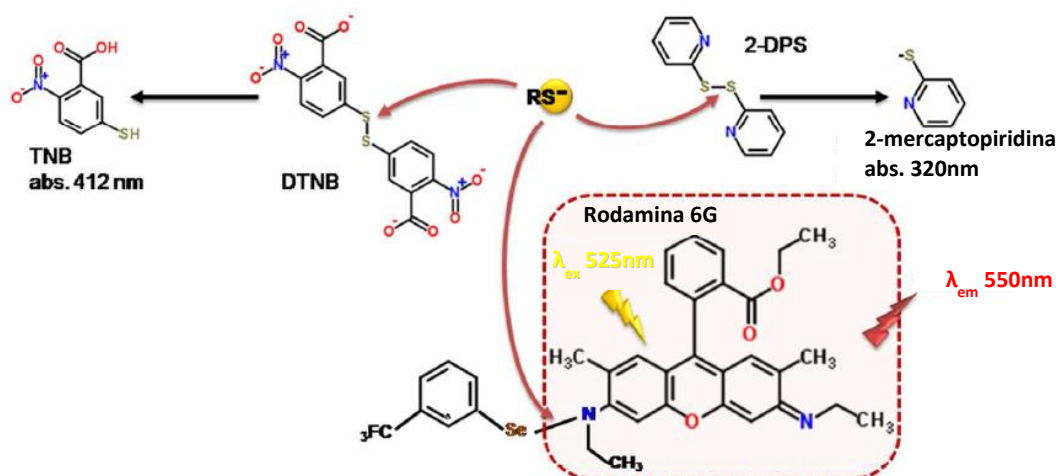


Figura 6. Mecanismo de detección de tioles por clivado del enlace Se-N y escisión de un enlace disulfuro. Tomada y adaptada de (M. A. Comini, 2016).

Otro tipo de sensores químicos basan su mecanismo de detección en el fenómeno de FRET. Estos consisten de un compuesto dador de fluorescencia unido por un enlace disulfuro, susceptible a la reducción por tioles, a un aceptor o extintor (*quencher*) de fluorescencia. Un ejemplo, es el par fluoresceína (λ_{ex}/λ_{em} 494/521 nm) y rodamina (λ_{ex}/λ_{em} 530/566 nm) unidos por un disulfuro aromático o alifático, donde la reducción del disulfuro libera a la fluoresceína del efecto de *quenching* de la rodamina (Pullela et al., 2006) (Fig. 7).

En la sonda Ratio-HPSSC (por sonda: ratiométrica de hidroxifenil porfirin disulfuro conjugada a cumarina), la cumarina que es el fluoróforo dador (λ_{ex}/λ_{em} 350/459 nm) está unida a la hidroxifenil porfirina (absorción a 421nm) por un enlace disulfuro. Este último grupo actúa como un aceptor de FRET apagando la emisión de fluorescencia del dador (Cao et al., 2011). La emisión de fluorescencia de la porfirina a 650 nm, la cual no es afectada por los tioles, permite obtener medidas ratiométricas (λ_{em} 459/658 nm) (Fig. 7). Aún debe investigarse la reversibilidad de la reacción y citotoxicidad de este sensor.

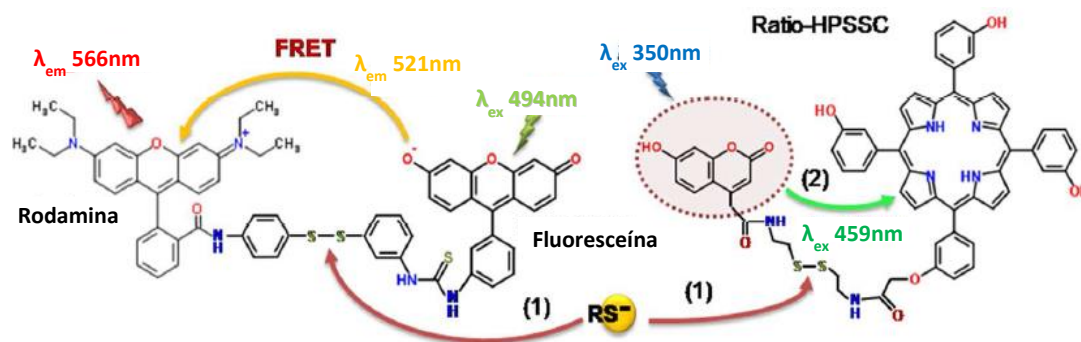


Figura 7. Mecanismo de detección de tioles mediado por escisión de un enlace disulfuro. Tomada y adaptada de (M. A. Comini, 2016).

Otro ejemplo es el quimiosensor FSSF, el cual consiste en dos dominios fluoresceína conectados por medio de un disulfuro, que luego de su reducción libera el fenómeno de extinción de fluorescencia que tenía lugar entre ambas moléculas. El FSSF mostró ser dos órdenes de magnitud más sensible que el DTNB para detectar GSH y presenta además un sorprendente rango dinámico de 4 unidades Log_{10} . Si bien el módulo conector incluye 4 amidas para mejorar la solubilidad del FSSF, su aplicabilidad biológica no ha sido aún explorada.

1.5.1.3 Sondas basadas en la sustitución nucleofílica de tioles

Otro tipo de quimiosensores consisten de agentes alquilantes que involucran aceptores de Michael (ver 1.5.1.4), los cuales modifican de manera irreversible a los tioles y deben ser utilizados bajo condiciones controladas para evitar un marcado no específico de proteínas o metabolitos.

Estas sondas fueron desarrolladas para marcar tioles de bajo peso molecular presentes en fluidos biológicos o liberados en la lisis celular. En la mayoría de los casos es necesario un paso de separación por HPLC o por electroforesis capilar para identificar o cuantificar la especie modificada. Algunos de los agentes alquilantes de tioles son: monobromobimano (mBB), 4-fluoro-7-sulfamoylbenzofurano (ABD-F), 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfónico amonio sal (SBD-F), 5-iodoacetamidafluoresceína (5-IAF), 2-cloro-1-metilpiridinio ioduro (CMPI) y el 2-cloro-1-metilquinolinio tetrafluoroborato (CMQT). La sustitución del átomo halógeno por el grupo tiol permite a los conjugados emitir fluorescencia (mBB, ABD-F, SBD-F y 5-IAF) (Fig. 8) o absorber luz UV (CMPI y CMQT). Se prefiere al primer grupo de sondas por su mayor sensibilidad (rango pM de detección), aunque la interferencia es un problema si la sonda se encuentra en exceso.

Hansen y colaboradores pusieron a punto una técnica que permite cuantificar el estado redox de la relación tiol/disulfuro en tioles de bajo peso molecular y en proteínas integrales de membrana empleando 4-DPS (R. E. Hansen et al., 2009). El método consiste en realizar una lisis celular a pH ácido (10% ácido tricloroacético), el cual evita que tengan lugar intercambios tiol/disulfuro no específicos, y luego separar la fracción soluble que

contiene los componentes de bajo peso molecular del pellet proteico. Los tioles libres de ambas fracciones reaccionan a pH bajo y fueron cuantificados con 4-ditiopiridina. Para medir el pool de tioles oxidados, los tioles libres de la muestra fueron bloqueados con NEM, y luego los disulfuros mixtos fueron reducidos con borhidrato de sodio o tris (hidroxipropil) fosfina seguido de un marcado cuantitativo de los tioles con 4-ditiodipiridina o SBD-F.

De forma más reciente, este método fue también implementado para estudiar la reserva de GSH intracelular y la relación tiol/disulfuro proteicos que acompañan la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (R. E. Hansen et al., 2013).

Recientemente se han generado derivados de fluoresceína del 2,4-dinitrofenil sulfonil que muestran una baja señal basal (Maeda et al., 2005). A pH y temperatura estable un compuesto análogo conjugado a un fluoróforo que emite en el rojo ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 560/623 nm) mostró ser selectivo contra los residuos de Cys y apropiado para experimentos basados en células (Bouffard et al., 2008) (Fig. 8). Análogos de esta sonda que muestran selectividad a selenoCys fueron diseñados por (Maeda et al., 2006). El DNBS-BODIPY (boron-dipirrometeno/ 2,4-dinitrobenzensulfonil) es una sonda específica para la detección de Cys con emisión de fluorescencia en la zona roja del espectro ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 520/590 nm) (Shao et al., 2011). La fluorescencia de esta sonda se vio incrementada más de 40 veces producto de su reducción por tioles biológicos, preferentemente Cys, y resultó ser independiente de la concentración de H^+ .

1.5.1.4 Sondas basadas en la reacción de adición de Michael a tioles.

Los tiolatos son buenos dadores de Michael y reaccionan rápidamente con un sistema α,β -insaturado, tal como en la maleimida (2,5-pirrolediona). Por otro lado, la reacción de la maleimida es selectiva con el grupo tiol solo a pH 7 (Crankshaw et al., 2001). La N-etil maleimida presenta buena permeabilidad celular y además el grupo etilo puede ser fácilmente reemplazado por otros sustituyentes. Por lo tanto, fluoróforos con un amplio rango en el espectro de emisión (ThioGlo series, λ_{em} 466-536 nm) fueron conjugados a maleimida generando sondas de tioles extremadamente sensibles (por ejemplo, límite de detección de GSH en 50 fM para TioGlo3) (Fig. 8).

Otras sondas basadas en maleimida dependen de la conjugación del tiol con BODIPY o tetrafeniletileno, las cuales presentan una elevada sensibilidad (orden nM o 1ppb, respectivamente) (Matsumoto et al., 2007). Recientemente fue sintetizado un marcador fluorescente (basado en but-3-yn-2-mono-7-dietilaminocumarina) que es activado por adición de Michael a tioles (Y. Liu et al., 2014). Esta sonda detecta de manera muy específica los residuos de cisteína frente a los de homocisteína y GSH, debido a que la isomerización del compuesto es favorecida por estructuras de aminoácidos simples. Ensayos realizados sobre células humanas de carcinoma renal permitieron validar el uso de este sensor por técnicas de microscopia confocal.

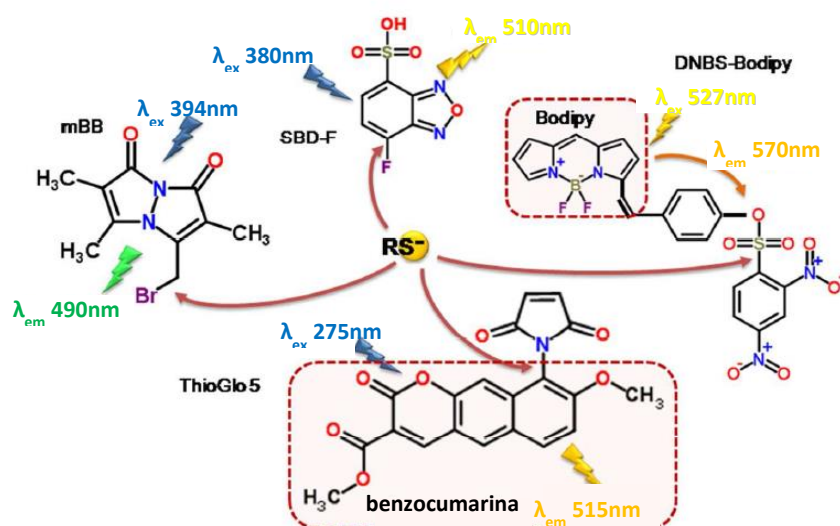


Figura 8. Mecanismo de detección de tioles por reacción de adición de Michael y sustitución nucleofílica. Tomada y adaptada de (M. A. Comini, 2016).

1.5.1.5 Sondas basadas en metales

Distintos quimiosensores de tioles basados en complejos metálicos han sido desarrollados (Chen, Zhou, Peng, & Yoon, 2010), pero solo los siguientes han sido testados en sistemas biológicos: la dupla cerio/quinina (Nie et al., 2003), (S. Wang et al., 2006) o cerio/ $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ (Rezaei & Mokhtari, 2007), un complejo $\text{Ru}(\text{II})$ poli(1,10-fenantrolina)-DNBS (Ji et al., 2010), un complejo $\text{Ir}(\text{III})$ -DNBS (Y. Tang et al., 2013).

La reducción de $\text{Ce}(\text{IV})$ por cisteína o GSH produce una forma quimioluminiscente del cerio, conocido como $\text{Ce}(\text{III})$. FRET entre la débil luminiscencia del $\text{Ce}(\text{III})$ y la quinina (λ_{ex} 300-400 nm, λ_{em} 450 nm) permite amplificar la señal. Este complejo mostró ser altamente específico y sensible para detectar concentraciones de cisteína en el rango nM bajo en una muestra de suero 1000 veces diluida (Nie et al., 2003).

En el caso del complejo Ru -fenantrolina/DNBS, la fosforescencia de éste se prende de manera selectiva frente la presencia de cisteína. El sensor escindido del grupo extintor muestra una fosforescencia 90 veces aumentada ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 455/598 nm) y una vida media larga, lo cual permite cancelar la interferencia de la fluorescencia de fondo que es de corta vida, mejorando así la relación señal/ruido (Fig. 9).

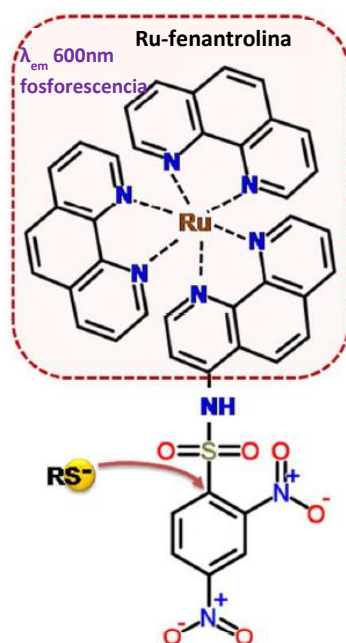


Figura 9. Mecanismo de detección de tioles por quimiosensor basado en metales. Tomada y adaptada de (M. A. Comini, 2016).

1.5.1.6 Métodos enzimáticos para detectar cisteínas

Un método enzimático para cuantificar la cantidad total de L-cisteína (libre: reducida y disulfuro: oxidada), está basado en la vía biosintética de la D-luciferina que utiliza a la L-cisteína para generar el sustrato bioluminiscente, luciferina. El método bioluminiscente presenta un límite de detección menor a 0,26 μM y es adecuado para determinar cisteína en muestras de suero (Niwa et al., 2010).

1.5.1.7 Inmunodetección Redox

El estado redox tiol/disulfuro de proteínas que contienen cisteínas redox activas puede ser cuantificado por medio de técnicas de *Western blot*. Estas técnicas permiten la separación, marcado selectivo e inmunodetección de distintas especies redox de proteínas en función de su migración electroforética bajo condiciones nativas o desnaturalizantes (Fig. 10).

Para algunas proteínas, la especie oxidada y la reducida se distinguen fácilmente una de la otra por su perfil migratorio diferencial sin que haya necesidad de recurrir a modificaciones para ponerlas en evidencia, excepto por el bloqueo de los tioles libres para evitar artefactos por intercambios tiol/disulfuros inespecíficos. Para otras proteínas se hace necesario realizar un tratamiento con un alquilante que modifique las propiedades fisicoquímicas de la proteína (por ejemplo: carga, masa) para poder distinguir la forma reducida de las oxidadas. Los agentes más utilizados son la iodoacetamida (IAA), el ácido 4-acetoamido-4'-maleimidilstilbeno-2,2'-disulfónico (AMS) y diferentes tipos de agentes peguilados (por ejemplo: maleimida polietilen glicol (mal-PEG)).

La IAA agrega una carga negativa por grupo tiol, lo cual incrementa la migración electroforética de la proteína modificada (previamente reducida) respecto a la forma no modificada (oxidada). La incorporación de AMS a un grupo tiol incrementa su masa en 500

Da, permitiendo la separación de la especie reducida, con mayor masa y menor migración electroforética, de la oxidada.

De manera similar, la adición de mal-PEG a la proteína incrementa su masa de acuerdo al tamaño del PEG utilizado (1-25 kDa). Debido a la alta solvatación de los derivados de PEG, las proteínas modificadas con PEG presentan a menudo migraciones aberrantes en geles de poliacrilamida. Por lo tanto, se prefiere el uso de mal-PEG de bajo peso molecular.

Luego de la separación electroforética bajo condiciones nativas o desnaturalizantes, las proteínas se transfieren a una membrana (gralte. de polivinil difluoruro o nitrocelulosa) y luego se identifica(n) la(s) banda(s) de interés por medio del agregado de un anticuerpo específico. Se pueden realizar medidas cuantitativas por densitometría de bandas.

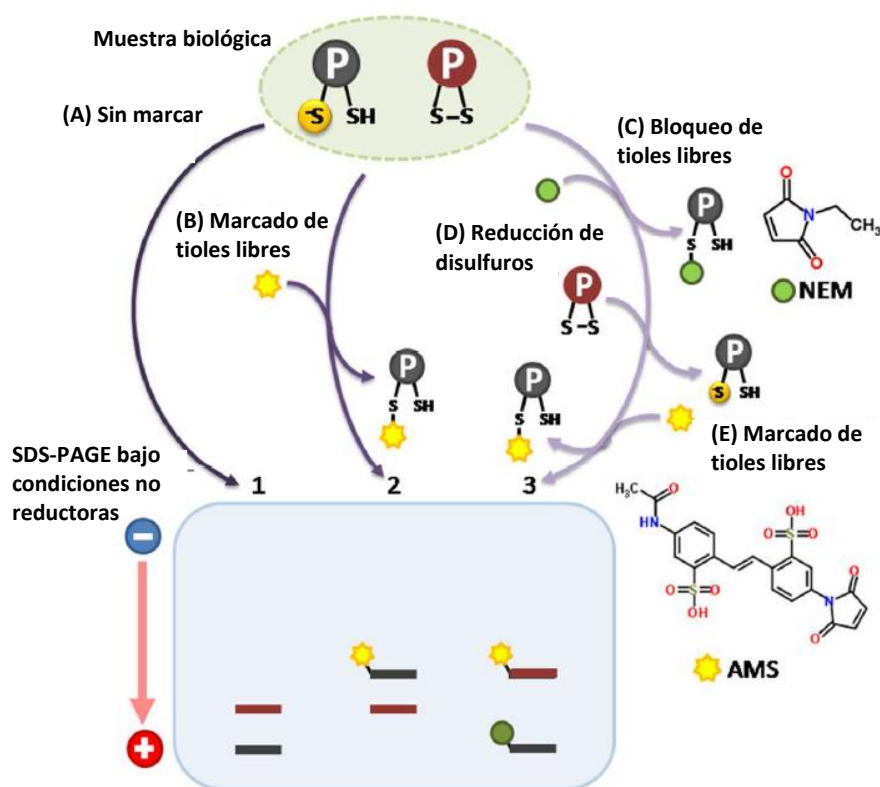


Figura 10. Estrategia para detectar el estado redox de tioles proteicos por Western blot. (A) Sin marcado; (B) Marcado de tioles libres; (C) Bloqueo de tioles libres; (D) Disulfuros reducidos; (E) Marcado de tioles libres. Tomada y adaptada de (M. A. Comini, 2016).

1.5.1.8 Proteómica Redox

Las aproximaciones basadas en proteómica ofrecen la ventaja de realizar muestreos cuantitativos, de amplio espectro y de alta *performance* sobre un determinado repertorio proteico celular. Al tratarse de una técnica de alta resolución, ésta permite además identificar modificaciones pos-traduccionales específicas en proteínas individuales. Este

tipo de enfoque ha sido aplicado en múltiples estudios para la identificación y cuantificación de proteínas con tioles reactivos y, en combinación con sondas específicas o sistemas enzimáticos, para la identificación de modificaciones pos-traduccionales selectivas (Lind et al., 2002)(Fratelli et al., 2002)(Shenton et al., 2003)(Lindemann et al., 2012)(Leichert et al., 2004)

Uno de los primeros estudios basado en proteómica redox dio lugar a la identificación de proteínas glutationiladas. En esta técnica los disulfuros mixtos entre GSH y proteínas fueron reducidos de manera específica con Grx y luego marcados con N-etilmaleimida conjugado a biotina, de esta forma las proteínas marcadas fueron purificadas por afinidad para luego ser identificadas por espectrometría de masas (Lind et al., 2002).

Un par de años más tarde, se desarrolló un método diferente que se basa en la alquilación con IAM de tioles proteicos de extractos celulares en estado basal o sujetos a reducción, procediendo luego a la detección por espectrometría de masas de las proteínas que incorporaron el grupo acetamida (59 Da). Este método fue utilizado con éxito para identificar proteínas de *E. coli* que presentaban residuos de cisteína susceptibles a la oxidación (Leichert et al., 2004). A partir de la relación proteína oxidada/reducida estimada por densitometría de los puntos de un gel 2D, se extrapoló el estado redox de las respectivas proteínas a nivel intracelular.

Otro método consistió en adaptar la técnica de electroforesis diferencial en gel, DIGE (del inglés *difference gel electrophoresis*). Este nuevo enfoque fue denominado redox-DIGE y consiste en el marcado de tioles proteicos de una muestra control y de una muestra de interés con dos marcadores fluorescentes diferentes (Cy3 and Cy5), seguido de la detección de cambios en la intensidad de fluorescencia relativa en un gel 2D y una posterior identificación de las proteínas por espectrometría de masa (Hurd et al., 2009)(Hurd et al., 2007)(Fig. 11). De manera similar a otras técnicas, los tioles libres son primero bloqueados con NEM y luego las cisteínas oxidadas pueden ser reducidas con TCEP, DTT o alguna oxidoreductasa específica (como Trx o 2CGrx), para luego ser marcados por fluorescencia. La principal ventaja de esta técnica es la posibilidad de comparar múltiples muestras en un mismo gel, lo cual mejora la reproducibilidad y la cuantificación. Aunque cabe mencionar que este tipo de técnica requiere de una laboriosa optimización del procedimiento, lo que incluye tiempo de marcados, concentración de agentes, número de réplicas y controles apropiados, para así maximizar la significancia estadística.

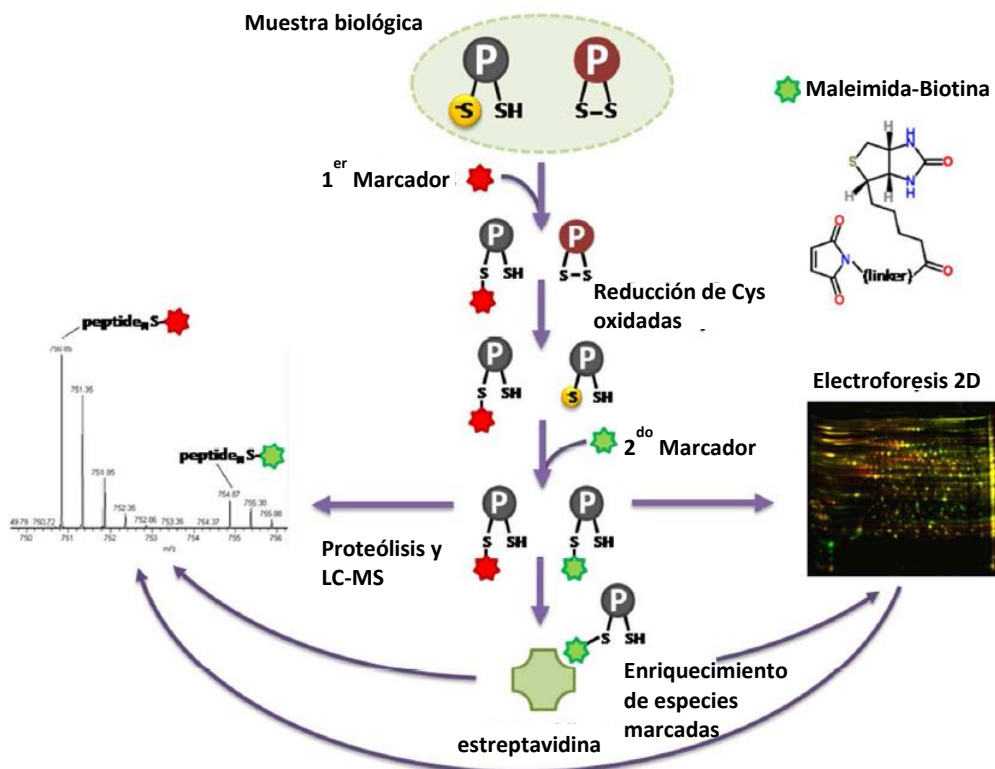


Figura 11. Estrategia para detectar el estado redox de tioles proteicos por Proteómica redox. Tomada y adaptada de (M. A. Comini, 2016).

1.6 Biosensores redox basados en proteínas fluorescentes

Como se ha visto, los métodos convencionales (la gran mayoría de los quimiosensores, *Western blot* redox y proteómica redox) para realizar medidas redox presentan varios problemas. Uno de ellos reside en el inevitable daño celular ocasionado durante el procesamiento de la muestra o por las mismas sondas redox, y la selectividad de los quimiosensores para identificar únicamente la especie reducida y no las oxidadas de cisteínas de proteínas o compuesto de bajo peso molecular. Esto genera oxidaciones artefactuales, impide realizar medidas dinámicas y en tiempo real, y carece de resolución específica de compartimento. Las sondas redox codificadas genéticamente prometen superar muchas de estas limitaciones.

Los primeros sensores redox codificados genéticamente consistieron en versiones mutadas de la proteína verde fluorescente o GFP (del inglés *green fluorescent protein*) (Meyer et al., 2010) y su variante la proteína amarilla fluorescente o YFP (del inglés *yellow fluorescent protein*) (Østergaard et al., 2001). La proteína GFP salvaje, originalmente aislada de la medusa *Aequorea victoria* por Osamu Shimomura, es una proteína soluble de 27 kDa. La cadena polipeptídica de 238 aminoácidos forma un barril β compuesto por 11 hojas β ocultando una corta hélice α en su interior que contiene al cromóforo, el cual se compone de 3 aminoácidos, Ser65, Tyr66 y Gly67. Estos aminoácidos sufren, de manera espontánea, una reacción de ciclación pos-traduccional, seguido de un paso de deshidratación y oxidación, para dar lugar al cromóforo maduro (Fig. 12). La oxidación lleva a la formación de un sistema conjugado de electrones- π capaz de absorber y emitir luz visible. La proteína GFP salvaje presenta dos picos de excitación que reflejan diferentes

estados de protonación del grupo fenol del residuo Y66 dentro del cromóforo, pero solo un pico de emisión con máximo en 509 nm. El primer pico de excitación con un máximo de 395 nm corresponde a la forma protonada o neutra del cromóforo (banda A) y el segundo pico con un máximo de 475 nm corresponde a la forma desprotonada, o aniónica (banda B). El protón es reversiblemente traslocado entre la Tyr66 y el Glu222 a través de un puente de hidrógeno que involucra también a la Ser205 (Meyer et al., 2010) (Fig. 12).

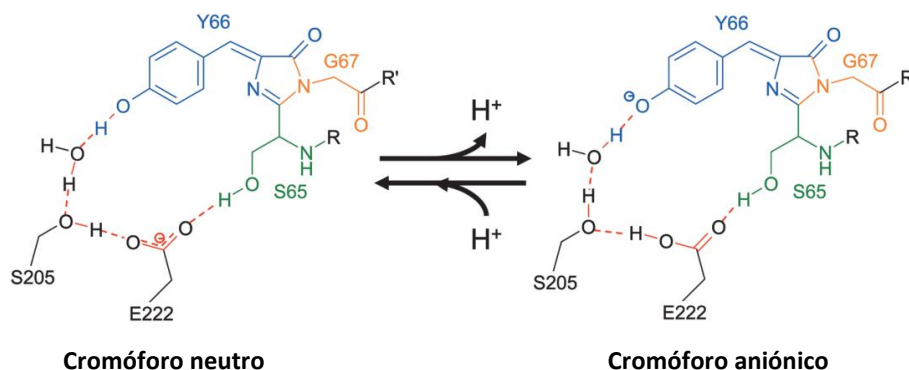


Figura 12. Desprotonación reversible del cromóforo de la proteína GFP. Interconversión del cromóforo entre la forma neutra y la aniónica. El cromóforo está conformado por S65 (verde), Y66 (azul) y G67 (rojo). La desprotonación del grupo hidroxilo del fenol está acoplado con la protonación del E222 a través de un enlace de hidrógeno, y de una molécula de agua. Tomada y adaptada de (Meyer y Dick, 2010).

Luego de la excitación de la banda A a 405 nm el cromóforo excitado neutro (A^*) se convierte en la forma aniónica no relajada (A^*) y transfiere el protón fenólico del residuo Y66 al carboxilato del residuo E222 transformándose en la especie I^* que al relajarse a la forma I emitirá fluorescencia a 509 nm. Este proceso es conocido como transferencia de protón en el estado excitado o ESPT (del inglés *excited state proton transfer*) (Chattoraj et al., 1996) e involucra una red de enlaces puente de hidrógeno alrededor del cromóforo. ESPT es la razón por la cual la excitación a las dos bandas (A y B) provoca emisión de luz verde a una longitud de onda similar (Meech et al., 2009) (Fig. 13).

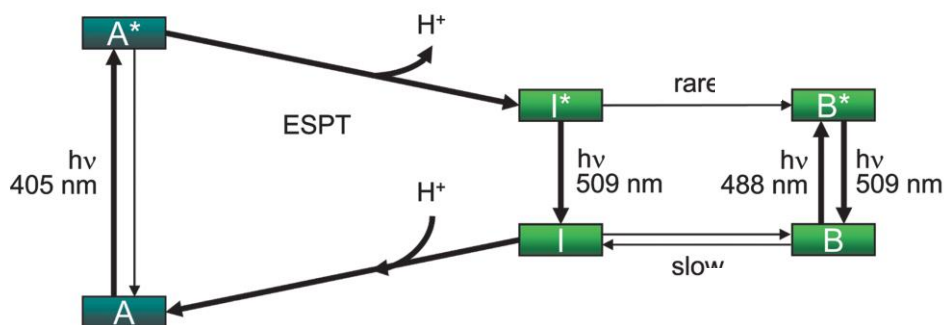


Figura 13. Transferencia de protón en el estado excitado (ESPT) en la GFP. El fenómeno de ESPT convierte la forma neutra A de la GFP en su forma aniónica I. Las λ_{ex} a 405 y 488 nm se emplean para realizar medidas ratiométricas. Tomada y adaptada de (Meyer y Dick, 2010).

El comportamiento de doble excitación asociado a una única λ_{em} de la GFP es justamente lo que posibilita realizar medidas ratiométricas con esta proteína.

Se vio que la desprotonación del cromóforo es significativamente favorecida cuando se sustituye la S65 por una treonina, lo cual provoca un corrimiento del pico mayor de excitación a 488 nm, dando lugar a la proteína GFP mejorada o EGFP (del inglés *enhanced GFP*), (Heim et al., 1995).

Las versiones redox sensibles rxYFP y roGFP fueron desarrolladas por medio de ingeniería genética a partir de YFP y de la GFP salvaje o la EGFP. Para conferirle propiedades redox a estas proteínas, se reemplazaron los residuos S147 y Q204 en GFP y N149C y S202C en rxYFP, ubicados en hojas β adyacentes (β -7 y β -10) en la superficie del barril β de la proteína, por residuos de cisteína. En estas posiciones los residuos de cisteína se ubican próximos uno del otro, de manera tal que al oxidarse forman un puente disulfuro, y también cercanos al cromóforo por lo que los pequeños cambios estructurales originados por el estado tiol/disulfuro de estos residuos se transmite en perturbaciones en la red de enlaces de puente de hidrógeno del cromóforo que afectan su estado de protonación y las propiedades espectrales de la proteína. La cristalización de la forma reducida y oxidada de una de las variantes de roGFP (PDB 1JC0 y 1JC1) permitió estudiar en detalle los cambios estructurales que explicarían la formación del disulfuro y la protonación del cromóforo (Hanson et al., 2004). El mecanismo exacto a partir del cual los cambios de fluorescencia ocurren son significativamente diferentes entre cada una de las variedades de las proteínas fluorescentes.

La formación de un enlace disulfuro entre los residuos cisteína mutados en las posiciones 149 y 202 en la proteína rxYFP (Østergaard et al., 2001) indujo una reducción del pico de emisión de fluorescencia de 2,2 veces respecto a la proteína YFP salvaje, sin afectar significativamente su longitud de onda de excitación. La proteína rxYFP exhibe dos picos de absorción: para la banda A (cromóforo neutro) un λ_{ex} 392 nm, y para la banda B (cromóforo aniónico) un λ_{ex} 514 nm, con un claro punto isosbético a 432 nm. Sin embargo, debido al fenómeno de *quenching*, la forma neutra del cromóforo de la rxYFP no es fluorescente y por lo tanto ésta exhibe un solo pico de excitación con un máximo en 512 nm y con un hombro menor cercano a los 448 nm (Figura 14). El potencial redox medio de la rxYFP fue determinado como E° -261 mV a partir de la titulación de la proteína recombinante con un amortiguador GSH/GSSG (Østergaard et al., 2001). Además como la reactividad de la rxYFP frente al glutatión es relativamente lenta, las muestras de proteína tuvieron que ser incubadas por 21 horas con las diferentes relaciones de GSH/GSSG.

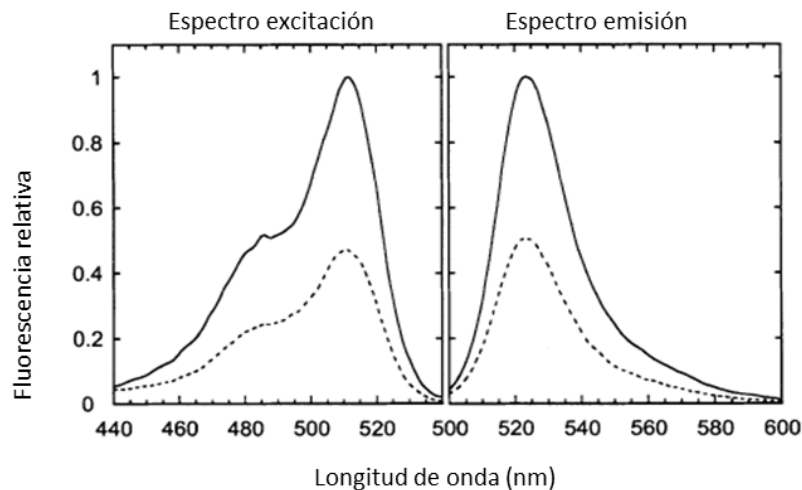


Figura 14. Espectro de excitación y de emisión de la forma oxidada y reducida de la rxYFP. Los dos espectros fueron registrados a una longitud de onda de emisión y de excitación de 540 nm y 490 nm, respectivamente, para la forma oxidada (línea punteada) y reducida (línea continua) de la proteína a pH 7.0. Tomada y modificada de (Østergaard et al., 2001)

Para la roGFP, las sondas redox obtenidas se denominaron roGFP1, basada en la GFP salvaje, y la roGFP2, basada en la EGFP. Los dos máximos de excitación característicos de GFP (400 nm para la banda A y 475-490 nm para la banda B) se mantienen para las variantes de la roGFP, correspondiéndose la banda A con el principal pico de excitación en roGFP1 y dominando la banda B en la roGFP2. La oxidación (formación del disulfuro) resulta en un incremento en la banda A y una disminución en la banda B y un comportamiento opuesto bajo condiciones reductoras (Fig. 15).

Por lo tanto, el estado redox del par ditiol/disulfuro está acoplado a la intensidad de fluorescencia relativa de los dos picos de excitación. A diferencia de la rxYFP, al presentar dos picos de excitación que responden de manera opuesta al estímulo redox la roGFP permite realizar medidas ratiométricas, independientes de la concentración de la sonda (Fig. 15). Este comportamiento tiene el potencial de reducir o eliminar alteraciones en los datos causados por fotoblanqueamiento, por diferencias en niveles de expresión, por inestabilidad en la iluminación, y por una distribución no uniforme entre las células o entre grupos de células. De todos modos, hay que considerar que estas medidas ratiométricas son sensibles a las longitudes de onda elegidas y a las características de cada instrumento, tales como el ancho de banda de excitación, y la sensibilidad del detector. Por lo que se debe realizar curvas de calibración individuales para cada sonda bajo las condiciones utilizadas para las medidas experimentales.

Otra propiedad que distingue a la roGFP de la rxYFP es que para la primera de ellas las medidas ratiométricas permiten cancelar la influencia del pH, en el rango fisiológico (pH 5,5-8,5), sobre la intensidad de fluorescencia, mientras que la última mostró una gran

sensibilidad al pH siendo el fenómeno de *quenching* significativo a pH < 7 (Elsiger et al., 1999).

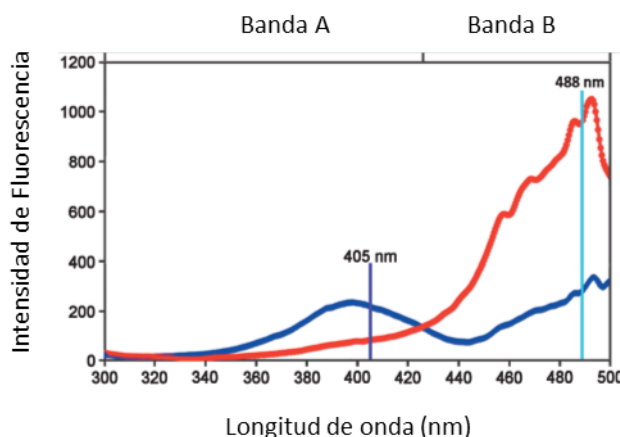


Figura 15. Cambios redox-dependientes en el espectro de excitación de la proteína roGFP2. Debido a la mutación S65T, el cromóforo de la roGFP2 reducida se encuentra preferentemente desprotonado, exhibiendo un pico de excitación predominante cercano a los 488 nm (curva roja). Frente a la oxidación, el cromóforo de la roGFP2 se encuentra preferentemente protonado, ganando excitabilidad a 405 nm y perdiendo excitabilidad a 488 nm (curva azul). Tomada y modificada de (Meyer y Dick, 2010).

No obstante, una de las mayores desventajas notadas para estas sondas fue la lenta (horas) cinética, principalmente *in vitro*, de equilibrio de su estado redox con el del medio en respuesta a señales redox fisiológicamente relevantes (J. M. Hansen et al., 2006).

1.6.1 Segunda generación de biosensores GFP redox sensibles

roGFP y rxYFP reaccionan de manera poco eficiente con H_2O_2 , GSSG y otros oxidantes debido a la baja reactividad de sus cisteínas (J. M. Hansen et al., 2006); (Østergaard et al., 2004). Sin embargo, la respuesta a estos mismos estímulos fue diferente cuando estos biosensores fueron expresados en sistemas celulares. En este caso, fue notable la capacidad de rxYFP y roGFP para detectar con gran sensibilidad (orden μM) y buena velocidad (min) cambios en el estado redox intracelular inducidos por los mismos estímulos por los cuales mostraron tan poca reactividad *in vitro* (J. M. Hansen et al., 2006); (Björnberg et al., 2006). Esto llevo a pensar que algún componente intracelular estaría contribuyendo al rápido equilibrio redox de estas sondas. Por su rol en la homeostasis redox intracelular, la Trx y Grx surgieron como posibles candidatos que estarían cumpliendo ese rol sobre rxYFP y roGFP2. Las investigaciones iniciales realizadas con la Grx1 de levadura y la rxYFP demostraron que la Grx acelera por al menos 3 órdenes de magnitud la transferencia de electrones desde la dupla GSH/GSSG a rxYFP, lográndose obtener respuesta en el orden de los (mili) segundos y con concentraciones nM de GSSG (Björnberg et al., 2006). Una conclusión similar fue obtenida un año más tarde empleando la Grx humana (hGrx) y la roGFP2 (Meyer et al., 2007). Estos hallazgos dieron lugar a la segunda generación de estos biosensores que consistieron en fusiones de rxYFP a la Grx1

de levadura y de la roGFP2 a la hGrx (Björnberg et al., 2006); (Gutscher et al., 2008)(Fig. 16).

Tal como lo hace sobre otros blancos moleculares, las reacciones catalizadas por la Grx sobre las proteínas fluorescentes redox sensibles involucran la glutationilación durante la fase oxidativa y la deglutationilación durante la fase de reducción. La formación del disulfuro mixto GSH-roGFP2 o -rxYFP es termodinámicamente inestable y rápidamente resuelto por la formación de un disulfuro intramolecular en la roGFP2 o la rxYFP con liberación de un GSH (Fig. 16, 17). Al fusionar este elemento transductor de señal al biosensor, el intercambio tiol/disulfuro se hace independiente de la presencia o concentración relativa de Grx endógena y se ve favorecido ya que la probabilidad de colisión molecular entre ambos módulos aumenta.

Otro dato interesante aportado por estos estudios es que a nivel celular la rxYFP y roGFP2 estarían reaccionando y reportando de manera directa los cambios en la relación GSH/GSSG, independientemente del origen del desbalance redox (por ej. depleción de NADPH, oxidantes en exceso, depleción de GSH, etc).

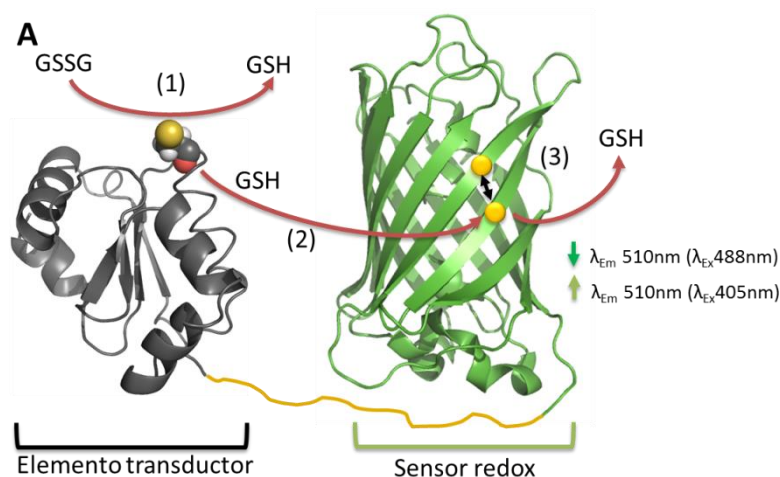


Figura 16. Biosensor redox hGrx-roGFP2. La hGrx cataliza eficientemente el equilibrio entre el par GSH/GSSG y la roGFP2. Para la reacción de oxidación, (1) el glutatión disulfuro reacciona (GSSG) con la cisteína nucleofílica del sitio activo de la hGrx, dando lugar a la cisteína glutationilada con la liberación de una molécula de glutatión reducido (GSH); (2) este disulfuro mixto de la hGrx es atacado por una de las cisteínas redox sensibles de la roGFP2 dando lugar a la forma glutationilada del sensor y la forma reducida de hGrx; (3) el disulfuro entre una de las cisteínas de la roGFP2 y el glutatión se resuelve por medio de la formación de un disulfuro intramolecular en la roGFP2 y la liberación de la segunda molécula de GSH. Este último paso se acompaña con un cambio ratiométrico en la intensidad de fluorescencia de la roGFP2 cuando es excitada a 488 nm y 405 nm. Tomada y adaptada de (M. A. Comini, 2016).

Más adelante (sección 1.7) se mencionan varias de las aplicaciones y avances logrados en el área de la biología redox por el empleo de los biosensores basados en proteínas fluorescentes.

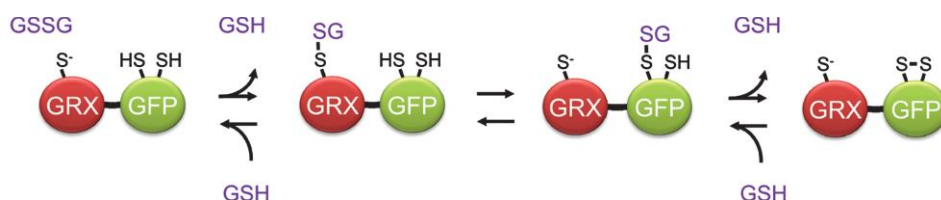


Figura 17. Mecanismo intercambio tiol/disulfuro en el biosensor hGrx-roGFP2. Cada paso individual de los tres del intercambio tiol disulfuro es totalmente reversible. Tomada y adaptada de (Meyer y Dick, 2010).

1.6.2 Fusión de roGFP a tiorredoxinas

Si bien los estudios *in vitro* indicaban que tanto la rxYFP como la roGFP2 estarían respondiendo al pool GSSG/GSH, no se descartaba la posibilidad que a nivel intracelular estos sensores respondieran también al sistema tiorredoxina. Para elucidar esto y, eventualmente, generar un nuevo biosensor selectivo para este sistema, se procedió a caracterizar una fusión de la Trx con la roGFP2 (Meyer et al., 2010); (Gutscher et al., 2008). Sin embargo, los ensayos bioquímicos mostraron que la Trx no es capaz de oxidar ni de reducir a la roGFP2 (Gutscher et al., 2008). En general, la reacción de intercambio tiol-disulfuro se da por una sustitución nucleofílica bimolecular (SN2), lo cual implica que los 3 átomos de azufre que participan (nucleófilo, electrófilo y el grupo saliente) deban estar alineados entre sí (Fig. 18) (Meyer et al., 2010). Simulaciones moleculares con la Trx y roGFP2 sugirieron que la falta de reactividad se origina por un impedimento estérico entre ambas proteínas que no favorece el correcto alineamiento de los átomos de azufre involucrados en el mecanismo redox (Gutscher et al., 2008), (Meyer et al., 2010). El tiol nucleofílico de la Trx, ubicado en un pequeño surco entre los residuos W31 P34 y otros, se ve impedido estéricamente de posicionarse para una reacción SN2.

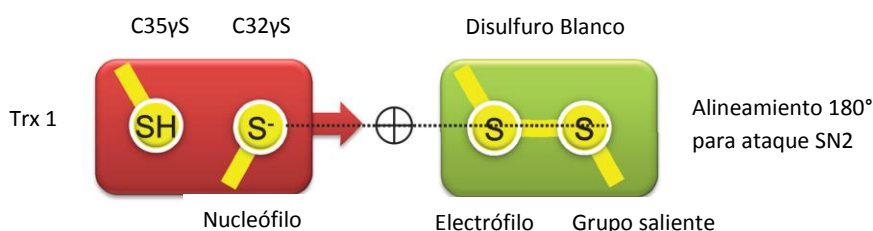


Figura 18. Sustitución nucleofílica bimolecular (SN2). La reacción de intercambio tiol-disulfuro planteada en este esquema requiere de un alineamiento entre el nucleófilo, el electrófilo y el grupo saliente. El tiol nucleofílico de la Trx necesita estar correctamente posicionado para atacar al disulfuro blanco. La geometría de este mecanismo impone restricciones estructurales para la interacción sustrato-enzima. Tomada y adaptada de (Meyer y Dick, 2010).

Por el contrario, la pequeña molécula de GSH puede acceder fácilmente a una posición o conformación que ubique a su tiol alineado para atacar el disulfuro de la roGFP2. Por otro lado, al encontrarse sobre la superficie del barril β , el disulfuro mixto roGFP2-S-SG resultante es más accesible para su rápida reducción por Grx o por la segunda cisteína de la roGFP2 dependiendo de los niveles GSH/GSSG (Fig. 19).

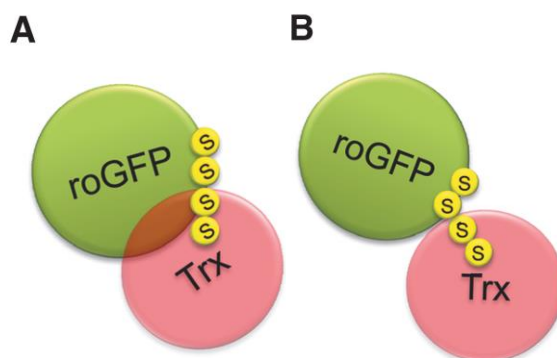


Figura 19. Posibles razones para la falta de reactividad entre la roGFP2 y la Trx1. (A) El alineamiento apropiado para una reacción SN2 se ve impedido por un conflicto estérico, (B) el ángulo adecuado entre ambas proteínas no es compatible con la geometría de los grupos tiol necesaria para que tenga lugar una reacción SN2. Tomada y adaptada de (Meyer y Dick, 2010).

Una de las estrategias planteadas para lograr biosensores capaces de monitorear el sistema Trx incluye el diseño racional de mutantes de la roGFP2 y/o la Trx que permitan el correcto alineamiento de los residuos de cisteínas involucrados en el intercambio tiol/disulfuro. Otra posibilidad es que existan ciertas isoformas de Trx que naturalmente posean la región de su sitio activo más expuesta de manera de poder atacar con facilidad el disulfuro de las proteínas fluorescentes redox sensibles. No obstante, ninguna de estas opciones ha sido investigada a la fecha.

1.6.3 Biosensores redox basados en proteínas fluorescentes con corrimiento espectral hacia el azul o rojo

Recientemente, se ha reportado la primera generación de biosensores redox contruidos sobre distintas variantes de la GFP que presentan emisión de fluorescencia en la zona azul y roja del espectro (Sugiura et al., 2015),(Fan et al., 2015). El biosensor redox con corrimiento hacia el rojo (rxRFP) utiliza como base una proteína roja fluorescente, RFP (del inglés *red fluorescent protein*), permutada circularmente, donde una de las cisteínas se ubicó en el extremo N-terminal y otra en el C-terminal de la proteína. De esta forma, un ambiente oxidativo induce la formación de un disulfuro entre estos residuos lo cual provoca un cambio conformacional que estabiliza al cromóforo aumentando 4 veces la intensidad de fluorescencia a pH fisiológico ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 576/600 nm) (Fan et al., 2015). Dado que el cromóforo es accesible al solvente en la conformación abierta de la proteína (cuando se encuentra reducida), la rxRFP presenta una marcada sensibilidad al pH observándose una marcada disminución de la intensidad de fluorescencia a pH menores de 8 además de cierta promiscuidad para reaccionar con el $ONOO^-$ y el O_2^- . Este fenómeno, junto con el hecho de que este sensor no es ratiométrico, obliga a realizar un análisis complementario de la línea celular que exprese una RFP redox- insensible para de este modo anular la influencia de la concentración de protones, estimar la selectividad de la modificación oxidativa y realizar medidas cuantitativas.

Los biosensores redox con corrimiento espectral hacia el azul consisten en versiones mutadas de la proteína Sirius (Oba-Qs; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 370/425 nm), la proteína celeste fluorescente (Oba-Qc; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 430/480 nm) y la proteína azul fluorescente mejorada (Oba-Qb; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 380/440 nm) que fueron ingenierizadas para contener cisteínas redox activas y residuos adicionales que favorecen cambios conformacionales en el biosensor que se traducen en alteraciones en sus espectros de fluorescencia (Sugiura et al., 2015). La titulación redox de Oba-Qc a diferentes pH no presentó una alteración significativa de la intensidad de fluorescencia, mientras que la emisión de Oba-Qs fue significativamente afectada a pH mayores. Los autores predijeron que de manera similar a lo observado para los sensores basados en la GFP, la serie de sensores Oba-Q deberían aumentar la cinética de su respuesta a oxidantes como el GSSG, si son fusionadas a Grx. Es así, que *in vitro* Grx1-Oba-Qc mostró cambios marcados en la intensidad de fluorescencia que fueron proporcionales a la concentración de GSSG y que pudieron ser revertidos con el agregado de DTT (Sugiura et al., 2015). La principal y más importante desventaja de esos sensores, es la imposibilidad de realizar medidas ratiométricas y medidas *in vivo*.

1.6.4 Sensores redox basados en FRET

Otra clase de biosensores redox basados en proteínas fluorescentes, son aquellos que interactúan mediante el fenómeno de FRET. El fenómeno de FRET consiste en la energía transferida de un fluoróforo excitado (dador) a un cromóforo (aceptor) cuyo espectro de excitación se solapa con el espectro de emisión del dador y emite fluorescencia a longitudes de onda mayores. FRET funciona a cortas distancia entre los cromóforos (preferentemente menores a los 5 nm) y requiere de ángulos óptimos entre los planos de los cromóforos. Por lo tanto, una buena eficiencia de FRET no es fácil de alcanzar.

El fenómeno de FRET conlleva diversos cambios espectrales en el sistema: (a) la intensidad de fluorescencia del dador decae dado que parte de la energía es absorbida por el fluoróforo aceptor, (b) la intensidad de fluorescencia del aceptor se ve incrementada (si el aceptor es fluorescente), debido a la presencia de una fuente de excitación adicional, (c) el tiempo de vida del estado excitado del fluoróforo dador disminuye, debido a que una mayor cantidad de energía se disipa hacia el aceptor.

Teniendo esto en cuenta, los cambios en FRET pueden ser evaluados siguiendo la relación de intensidad de fluorescencia del dador/aceptor, el aumento de la intensidad de fluorescencia del dador frente al foto-blanqueamiento del aceptor, y/o el tiempo de vida de la fluorescencia del dador. La principal ventaja de las sondas basadas en el fenómeno de FRET es que permiten obtener una señal ratiométrica a partir de la relación de las emisiones del dador y aceptor. A diferencia de una señal obtenida a una única longitud de onda, la señal ratiométrica permite cancelar variaciones de intensidad fluorescencia no relacionadas a cambios redox y originadas por ejemplo en niveles de expresión variables

del biosensor en distintas células y/o estadios del crecimiento, u otros factores como el volumen celular, los pigmentos, el pH, etc.

En estos sensores, la proteína fluorescente aceptora de FRET y la proteína fluorescente dadora de FRET se encuentran unidas por un módulo que contiene la estructura receptora compuesta por residuos de cisteína que equilibrarán su estado redox con el de las duplas tiol/disulfuro de compuestos de bajo peso molecular u oxidoreductasas del entorno. Cuando las cisteínas del módulo receptor se oxidan a disulfuro esto induce un cambio conformacional en el conector que aproxima espacialmente el dador al aceptor permitiendo el fenómeno de FRET (Fig. 20).

Kolossov y colaboradores desarrollaron y optimizaron biosensores redox basados en el efecto FRET (Kolossov et al., 2012)(Kolossov et al., 2011)(Kolossov et al., 2008) que utilizan a la proteína fluorescente celeste mejorada, eCFP, (del inglés *enhanced cyan fluorescent protein*) y a la YFP como par de FRET unidas por un conector de diferentes longitudes (ej, A(EAAAK)_nA, con n= 2–8) y que contiene la secuencia del sitio activo de la Trx (WCGPCK) y residuos de cisteínas adyacentes. Durante la oxidación y la reducción el conector redox sufre cambios conformacionales totalmente reversibles que acercan y alejan a los fluoróforos. *In vitro*, todas las construcciones respondieron al estímulo redox (GSSG/GSH), siendo las construcciones con cisteínas adyacentes (de 1 a 4 residuos de cisteína adyacentes) las que presentaron los valores más altos de eficiencia de FRET (70-90%). Los biosensores más eficientes se expresaron en células CHO y respondieron de manera reversible al tratamiento con diamida y con DTT. Para obtener medidas cuantitativas, la señal de FRET fue normalizada con el espectro de fluorescencia de cada fluoróforo.

Yano *et al.* (Yano et al., 2010) desarrollaron un nuevo biosensor denominado Redoxfluor, donde el FRET se da entre la proteína *cerulean* (una versión de la CFP mejorada) y la proteína citrina (una versión de la YFP mejorada) unidas por el dominio rico en residuos de cisteína del factor de transcripción de levaduras redox sensible, YAP1 (Delaunay et al., 2000). Redoxfluor fue utilizado para estudiar el estado redox de los peroxisomas de células CHO carentes de la maquinaria para ensamblar peroxisomas. La sonda mostró que este compartimento es, para sorpresa, más reductor que el citosol, como fue previamente observado en plantas (M Schwarzländer et al., 2008), y de manera opuesta, las células carentes de maquinaria para ensamblar los peroxisomas presentaron un citosol más reductor.

La principal desventaja de los sensores basados en FRET es su bajo rango dinámico, presentan un alto peso molecular, lo cual dificulta su localización en compartimentos subcelulares, y ocupan un amplio rango del espectro. La mayoría de las proteínas fluorescentes son más o menos sensibles al pH, por lo tanto, sensores FRET con dos cromóforos diferentes pueden tener respuestas complejas al pH (Belousov et al., 2006).

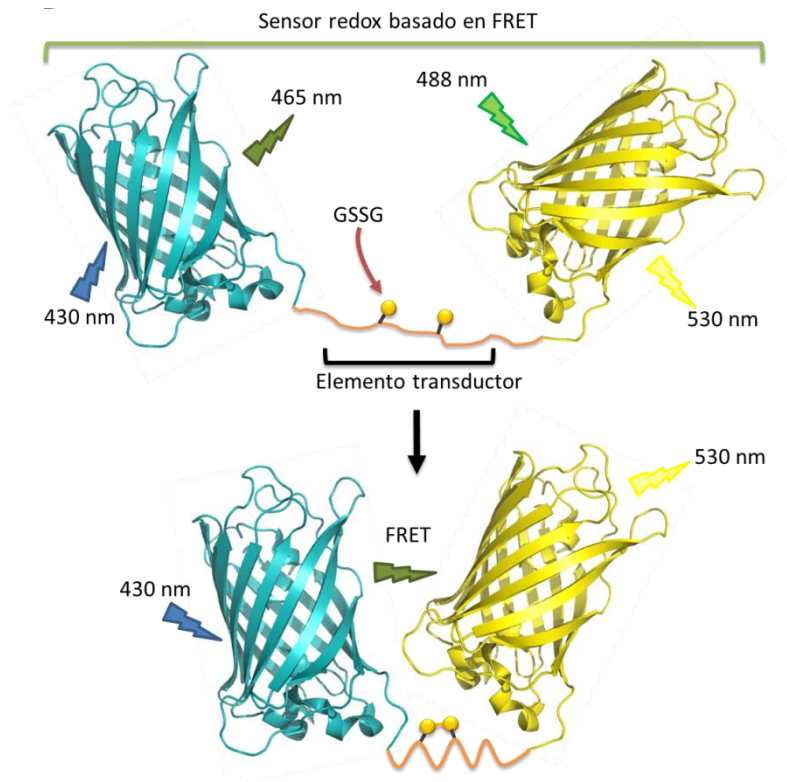


Figura 20. Esquema representativo de un sensor basado en el fenómeno de FRET. El GSSG oxida las cisteínas del conector que une las dos proteínas fluorescentes del par FRET provocando un cambio estructural que acerca a los módulos fluorescentes y aumenta la eficiencia de FRET. Tomada y adaptada de (M. a Comini et al., 2008).

1.7 Expresión de biosensores redox en diferentes sistemas biológicos y nuevos hallazgos

Las levaduras fueron el primer sistema biológico que fue estudiado con la rxYFP (Østergaard et al., 2004), mientras que la funcionalidad de la roGFP fue inicialmente investigada en líneas celulares de mamífero (Dooley et al., 2004), (Hanson et al., 2004). Algunas roGFP fueron etiquetadas y enviadas a diferentes compartimentos subcelulares, como el citosol, la matriz mitocondrial, la membrana plasmática, y el núcleo (Dooley et al., 2004), demostrando su potencial para el análisis redox sitio- específico.

Los estudios con la roGFP fueron luego extendidos a plantas con el fin de explorar el metabolismo del GSH (Jiang et al., 2006), (Meyer et al., 2007), (Schwarzlander et al., 2008). En ese sentido, se combinó la expresión transiente en hojas de tabaco, con la expresión en el citosol y diversos organelos de líneas estables de *Arabidopsis* lo cual permitió inferir el rol de diversos componentes del sistema redox de plantas (Fig. 21). Además, la expresión de la roGFP en diversos tejidos fotosintéticos (por ejemplo: hojas) y no-fotosintéticos (por ejemplo: raíz) facilitó el análisis de importantes procesos fisiológicos como la muerte celular y la senescencia.

La posibilidad de compartimentalizar diferentes variantes de los sensores redox basados en proteínas fluorescentes en diversos dominios subcelulares, como el citosol, la matriz mitocondrial, el espacio intermembrana de la mitocondria, los peroxisomas, y el ER, ha sido utilizada para abordar cuestiones fundamentales de la biología redox de eucariotas (Braun et al., 2010), (Kojer et al., 2012), (Morgan et al., 2011)(Fig. 21). Por un lado, la expresión de sensores redox fluorescentes en el citosol de levaduras permitió medir el potencial redox intracelular e identificar la presencia de una vacuola Ycf1 que acumula y exporta GSSG de manera activa hacia el exterior de la célula, contribuyendo de esta forma al equilibrio redox intracelular. Además, estos estudios demostraron que ante la ausencia de GR existen sistemas de respaldo como Trx2 y Grx2, abastecidos con poder reductor por parte de la TrxR que contribuyen a sostener la homeostasis redox (Morgan et al., 2012). Por otro lado, se adaptó la expresión de hGrx-roGFP en *Saccharomyces cerevisiae* para explorar la interacción dinámica entre el *pool* de glutatión citosólico, del espacio intermembrana mitocondrial y la matriz mitocondrial. Este tipo de acercamiento experimental puso en evidencia que el nivel de glutatión del citosol y del espacio intermembrana mitocondrial se encuentran cinéticamente relacionados, y que la regulación del potencial redox del GSH depende de la presencia de la GR citosólica, de la generación de NADPH citosólico y de porinas de la membrana mitocondrial externa (Kojer et al., 2012).

Para las bacterias patógenas *Mycobacterium tuberculosis* y *Chlamydia trachomatis* se han generado líneas celulares que expresan la hGrx-roGFP2 o versiones modificadas (Baker et al., 2014), (Bhaskar et al., 2014), (X. Wang et al., 2014)(Fig. 21). La disponibilidad de sistemas para sensar cambios redox en ambos patógenos es de particular importancia para dilucidar el rol redox en la interacción huésped-patógeno.

Se va a explicar con más detalle el novedoso biosensor redox específico para el tiol de bajo peso molecular más importante de los actinomicetes (ejemplo: *Mycobacterium tuberculosis*), conocido como micotiol, que ha sido recientemente desarrollado (Bhaskar et al., 2014).

El sensor (Mrx1-roGFP2) está basado en la fusión roGFP2 a la micoredoxina 1 de *M. tuberculosis*, una oxidoreductasa dependiente de micotiol con un sitio activo CGYC que, como las Grx con GSH/GSSG, equilibra el nivel de micotiol reducido/oxidado con el estado redox de proteínas blanco. La catálisis de la oxidoreducción de la roGFP2 con la dupla micotiol/micoredoxina sigue el mismo mecanismo descrito para el biosensor hGrx-roGFP2 y solo requiere de la cisteína del extremo N-terminal de la oxidoreductasa. El biosensor muestra una alta especificidad y sensibilidad (rango nM) por el micotiol. Mrx1-roGFP2 reveló que la relación intramicobacteriana tiol/disulfuro de micotiol no difiere significativamente entre cepas resistente a fármacos que fueron obtenidas de aislamientos clínicos o generadas en el laboratorio, respecto a las cepas sensibles. De todas formas, el biosensor permitió identificar diferencias en el potencial redox de cepas con rápido

crecimiento (potencial redox medio de -300mV) respecto de cepas con crecimiento normal (potencial redox medio de -273mV a -280mV).

El estado redox del *pool* de micotiol durante el proceso de invasión de macrófagos fue investigado realizando un tratamiento de las muestras con NEM (para bloquear tioles libres) y posterior fijación con paraformaldehído seguido de un análisis por citometría de flujo y microscopía confocal. De esta forma, el biosensor permitió distinguir un comportamiento heterogéneo del estado redox intracelular del micotiol que fue tiempo y cepa dependiente. La dependencia con el tiempo fue asociada al proceso de internalización que implica el pasaje de la bacteria fagocitada a través de diferentes compartimentos vacuolares (por ejemplo: endosomas, lisosomas, y autofagosomas) lo cual genera gradientes redox.

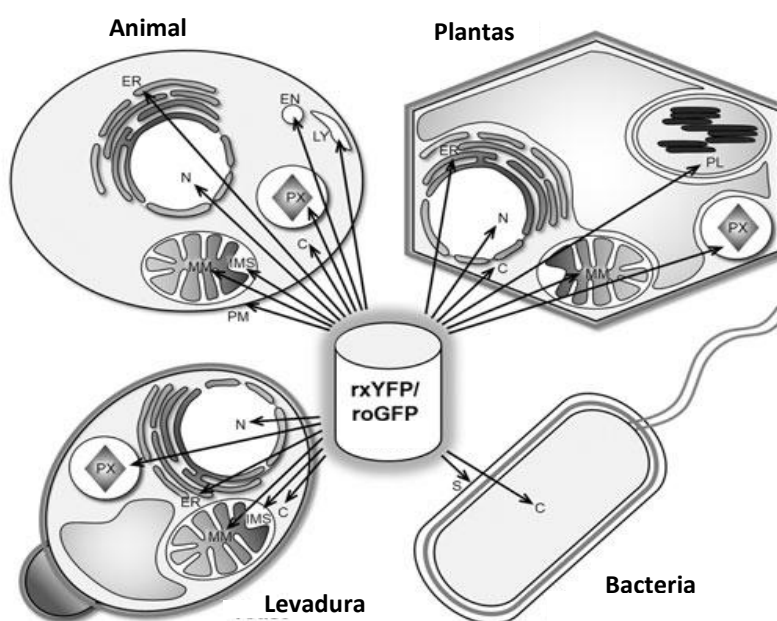


Figura 21. Compartimentos subcelulares y tipos celulares donde se expresaron biosensores redox. C, citósol; EN, endosomas; ER, retículo endoplasmático; IMS, espacio mitocondrial intermembrana; LY, lisosomas; MM, matriz mitocondrial; N, núcleo; PL, plástidos; PM, membrana plasmática; PX, peroxisoma; S, superficie celular. Tomada y modificada de (Markus Schwarzländer, Dick, Meyer, & Morgan, 2015).

También se ha reportado la generación de animales transgénicos que expresan la hGrx-roGFP2 como ser la mosca *Drosophila* (Albrecht et al., 2011), (Albrecht et al., 2014), (Z. Liu et al., 2012), el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Back et al., 2012), y el pez cebra (O'Donnell et al., 2013), (Seiler et al., 2012). Estos sistemas permitieron el análisis de cambios redox en organismos multicelulares completos y durante las diferentes etapas de su desarrollo, reproducción y envejecimiento.

El uso de sondas redox codificadas genéticamente en *Drosophila melanogaster* permitió establecer un mapeo cuantitativo *in vivo*, en un animal completo y durante sus distintas etapas del desarrollo, del potencial redox del glutatión y del peróxido de hidrógeno en

diferentes compartimentos subcelulares (como citosol y mitocondria), (Albrecht et al., 2011). Se generaron líneas transgénicas de esta mosca usando cuatro sondas redox diferentes, una para medir el potencial redox del GSH en el citosol (cyto-Grx1-roGFP2) y en la matriz mitocondrial (mito-roGFP2-Grx1), y otras dos para medir H_2O_2 en el citosol (cyto-roGFP2-Orp1) y en la matriz mitocondrial (mito-roGFP2-Orp1). Los resultados mostraron que el desarrollo y el envejecimiento se encuentran asociados a cambios redox que son claramente específicos del par redox, del compartimento subcelular y del tejido.

Por otro lado, se desarrollaron líneas transgénicas de *C. elegans* que expresan los biosensores HyPer (biosensor de peróxido de hidrógeno) y hGrx1-roGFP2. Estos estudios mostraron que la relación GSSG/GSH disminuye durante el desarrollo postembrionario, que los niveles de H_2O_2 aumentan con la edad y que los adultos jóvenes presentan regiones con diferentes propiedades redox posiblemente asociadas a funciones biológicas específicas (Back et al., 2012). En conclusión, la aplicación de sensores redox codificados pueden revelar detalles desconocidos de la biología redox de un organismo multicelular.

Recientemente, ha sido desarrollado el primer modelo de ratón con sensores redox. Con el fin de explorar las bases redox de la enfermedad de Parkinson se generaron líneas de ratones que expresan una variante de la proteína roGFP, la cual presenta una secuencia dirigida a la matriz mitocondrial, denominada mito-roGFP. Se sabe que la enfermedad de Parkinson (desorden neurodegenerativo asociado al envejecimiento), se manifiesta con pérdida de control motor el cual es un reflejo de la muerte de un pequeño grupo de neuronas dopaminérgicas que se encuentran en el SNC. El estrés oxidativo mitocondrial está ampliamente asociado a esta muerte. Por medio de la generación de ratones transgénicos con neuronas dopaminérgicas en el SNC que expresan de manera constitutiva el sensor mito-roGFP, permitió un monitoreo reversible y cuantitativo de la oxidación de proteínas de la matriz mitocondrial (Guzman et al., 2010), (Goldberg et al., 2012). Además se encontró que la entrada de calcio por canales de tipo-L durante la actividad autónoma normal de la neurona provoca un estrés oxidativo mitocondrial que aumenta la probabilidad de mutaciones genéticas asociadas a diferentes formas de la enfermedad de Parkinson.

Estos experimentos en ratones transgénicos fueron seguidos de la generación de líneas que expresan roGFP1 citosólica o mitocondrial en la piel sobre la base que el estrés oxidativo está asociado al proceso de envejecimiento (Wolf, Nishimaki, Kamimura, & Ohta, 2014). No hay hasta el momento métodos sensibles capaces de detectar el estrés oxidativo en animales vivos, limitando así el desarrollo de tratamientos que modulen o reduzcan el estrés oxidativo asociado al envejecimiento. La generación de ratones transgénicos que expresan la proteína roGFP en el citosol o en la mitocondria de diversos tejidos, incluido queratinocitos epidérmicos permitió medir de manera no invasiva el estado oxidativo de la piel luego de una aplicación tópica de peróxido de hidrógeno y luego de la exposición de la piel a radiación UVA (365 nm).

Se han generado líneas estables para tres parásitos eucariotas que expresan la hGrx-roGFP2 en su citosol. Por un lado, el hongo *Botrytis cinera* y el hongo del arroz *Magnaporthe oryzae* que son patógenos de plantas y representan organismos de gran relevancia a nivel agropecuario (Heller et al., 2012), (Samalova et al., 2014). Más recientemente, se ha generado un sensor para el parásito causante de la malaria, *Plasmodium falciparum* (Kaszi et al., 2013), el cual permitió estudiar *in vivo* el estado redox del patógeno cuando reside en el interior del glóbulo rojo.

Hasta la fecha no se ha reportado la generación de organismos del Orden Kinetoplastida que expresen biosensores redox fluorescentes, lo cual representa el principal objetivo de este trabajo de Tesis.

2. Objetivos

2.1 Hipótesis

A pesar del peculiar sistema redox dependiente de tioles que presentan los tripanosomátidos la proteína fluorescente redox sensible roGFP2 acoplada a glutarredoxina humana o su homóloga del parásito debería ser capaz de transmitir cambios redox que ocurren a nivel intracelular del patógeno.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

Validar el empleo de un biosensor fluorescente redox-sensible en tripanosomátidos patógenos para el estudio de cambios redox asociados a procesos biológicos y al modo de acción de (potenciales) fármacos.

2.2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar cuantitativamente la respuesta *in vitro* del biosensor redox hGrx1-roGFP2 a diferentes componentes del metabolismo redox de tripanosomátidos.
2. Optimizar el sistema biosensor redox/línea celular empleando *Trypanosoma brucei* como modelo.
3. Generar líneas redox reporteras en la forma infectiva y monomórfica de *Trypanosoma brucei brucei* y en la forma no infectiva epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.
4. Validar biológicamente la funcionalidad de las líneas redox reporteras de *T. b. brucei* y *T. cruzi*.
5. Verificar la aplicabilidad de las líneas redox reporteras para investigar el modo de acción de fármacos y de compuestos con potencial de interferir con el equilibrio redox del parásito.

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos y fungibles

Todas las enzimas utilizadas en métodos de biología molecular (ADN polimerasas, enzimas de restricción, fosfatasas, ligasas y amortiguadores correspondientes) fueron adquiridas en Invitrogen, Roche o New England Biolabs. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por IDT (ver Tabla 2). Los kits para extracción y purificación de ADN fueron de Sigma-Aldrich, Macherey Nagel, General-Electric (GE). Las secuenciaciones de ADN fueron realizadas en la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo.

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Applichem (Alemania), Invitrogen o Sigma-Aldrich (en orden alfabético): ácido acético (HAc), ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), albúmina sérica bovina (BSA), azul de metileno, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal), cistatina, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de sodio (NaCl), diamida, 4,4'-ditiodipiridina (DTDPy), ditioneitol (DTT), N-etilmaleimida (NEM), extracto de levadura, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), glutatión (GSH), glutatión disulfuro (GSSG), isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), lisozima de clara de huevo (liofilizada), menadiona, β -mercaptoetanol (β ME), pepstatina A, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), N- α -tosil-L-lisina clorometilcetone (TLCK), triptona, Tritón X-100®, sorbitan monolaurato de polioxietileno (Tween-20®). Todos los reactivos de uso general fueron de grado analítico, con la excepción de algunos solventes para usos no analíticos. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30% (v/v) fue adquirido en J.T. Baker (EUA) mientras que el tripanotión reducido ($T(SH)_2$) fue gentilmente provisto por la Dra. Luise Krauth-Siegel, Universität Heidelberg, Alemania y sintetizado de acuerdo a (M. A. Comini et al., 2009). El anticuerpo anti-GFP monoclonal anti-conejo fue comprado a Life Science. Los antibióticos ampicilina, tetraciclina, kanamicina, higromicina B, fleomicina y tetraciclina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich o Invitrogen, en diferentes presentaciones. La oxitetraciclina (oxitet) fue adquirida a Laboratorio Microsules, Uruguay (Oximic Plus). Todas las columnas usadas en la purificación de proteínas recombinantes fueron adquiridas en General Electric Healthcare Lifesciences (GE).

3.2 Métodos de Biología Molecular

3.2.1 Clonado de la secuencia de hGrx-roGFP2 en vectores de expresión de tripanosomas

La secuencia de la hGrx-roGFP2 (tamaño molecular 1137 pb) fue aislada a partir del vector pBinCM-Grx-roGFP2, gentilmente cedido por el Dr. Andreas Meyer (Heidelberg Institut for Plant Science, Universität Heidelberg, Alemania), mediante reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Para facilitar el clonado de la hGrx-roGFP2 en los vectores de expresión para *T. brucei* y *T. cruzi* se emplearon los siguientes pares de oligonucleótidos Fo Grx-roGFP ndIII (5'-GCTAAGCTTATGGCTCAAGAGTTTGTG-3', se subraya el sitio de restricción para la enzima *HindIII*) / Re roGFP mHI (5'-TGGATCCCCCGGGTTACTTGTAC-3', se subraya el sitio de restricción para la enzima *BamHI*) y Fo Grx-roGFP otl (5'-

TAGCGGCCGCATGGCTCAAGAGTTTGTG-3', se subraya el sitio de restricción para la enzima *NotI*) / Re roGFP mHI, respectivamente. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 100 µL que consistió de: 1 µL de ADN molde (100 ng/mL pBinCM-Grx-roGFP2), 10 µL de 2 mM dNTPs, 2 µL de cada oligonucleótido preparado a 100 µM, 10 µL Buffer Pfu Pol 10X, 1,5 µL de Pfu Polimerasa (10 U/µL, Fermentas MBI) y 73,5 µL de agua ultrapura. El programa de amplificación consistió de los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95°C 1 min, 50°C 1 min y 72°C 2 min, y finalmente un paso de extensión a 72°C durante 10 min. Se empleó el termociclador LabNet MultiGene OptiMax

La reacción de PCR fue analizada mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% (p/v) corrido en buffer TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA pH 8.0) a 100 mV en un equipo PowerPac™ HC de BioRad. El gel fue luego teñido con solución de bromuro de etidio 1 ng/mL durante 10 min y las bandas resultantes se visualizaron en transiluminador o cámara G-Box (Syngene, EUA). Las bandas de aproximadamente 1,1 kb correspondientes a la hGrx-roGFP2 fueron purificadas del gel con el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) y eluías en un volumen final de 25 µL.

Las secuencias de hGrx-roGFP2 y los vectores pHD1700 (gentilmente provisto por la Dra. Christine Clayton, Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, Alemania) y pTC-INDEX (gentilmente provisto por el Dr. John Kelly, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Reino Unido) fueron digeridos con las enzimas *HindIII/BamHI* o *NotI/BamHI* según correspondiera. Las digestiones fueron realizadas en un volumen final de 50 µL como se detalla continuación: 1-10 µg de ADN (plásmidos o amplicones), 5 µL de buffer de restricción 10X (buffer B Fermentas MBI para el par *HindIII/BamHI* o NEBuffer 3 de New England Biolabs para el par *NotI/BamHI*), 1 µL de cada enzima (equivalente a 10 U de c/u de ellas en la reacción) y agua ultrapura hasta 50 µL. Las reacciones se incubaron durante 1-3 hs a 37°C, y luego de inactivar las endonucleasas a 65°C durante 15 min los productos de digestión fueron separados y purificados a partir de un gel de agarosa 1% (p/v) empleando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Todos los productos de interés se eluyeron en 10 µL de agua ultrapura.

Previo a la reacción de ligación los vectores pHD1700 y pTC-INDEX digeridos fueron sometidos a reacción de desfosforilación que consistió de: 5 µL de ADN, 1 µL de rSAP Buffer 10X, 1 µL de *Shrimp Alkaline Phosphatase* recombinante (rSAP; equivalente a 1 U) y 3 µL de agua ultrapura. Luego de incubar la reacción durante 1 h a 37°C, la rSAP se inactivó a 65°C por 10 min.

Las ligaciones se realizaron en una relación molar 1:6 vector: inserto (100 ng de los vectores pHD1700 y pTC-INDEX linealizados y desfosforilados y 300 ng hGrx-roGFP2), y en un volumen final de 10 µL como se detalla a continuación: 0,5 µL de T4 ADN ligasa (equivalente a 5 U), 1 µL de Buffer T4DNA ligase 10X, 2 µL del vector, 6 µL del inserto y 0,5 µL de agua ultrapura. La reacción se incubó a 18-20°C durante aproximadamente 16 h.

Previo a la transformación de células competentes la ligasa fue inactivada a 65°C durante 10 min.

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

El cribado inicial para detectar colonias positivas se realizó por la técnica de *colony PCR*. Para ello 10 colonias de cada reacción de ligación fueron tocadas con la punta de un *tip* y las células levantadas fueron resuspendidas en 50 µL de agua ultrapura contenida en tubos de PCR (0,1 mL). Los tubos se calentaron a 95°C durante 5 min en un termobloque. Luego de una centrifugación durante 2 min a 20000g, 1 µL del sobrenadante fue transferido a un tubo de PCR (0,1 mL) conteniendo 19 µL de los componentes de una reacción de PCR (0,2 mM de dNTPs, 2 µM de cada par de oligonucleótidos: Fo Grx-roGFP ndIII/Re roGFP mHI o Fo Grx-roGFP otl/Re roGFP mHI, Buffer Paq Pol 1X, 10 U de Paq Polimerasa y agua ultrapura hasta 19 µL). Para la amplificación de la secuencia de la hGrx-roGFP2 se empleó el mismo programa de PCR descrito en el primer párrafo de esta sección.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v como se detalló más arriba. Se seleccionaron dos colonias positivas (nota: las que presentaron un amplicón de 1,1 kb) para preparar el ADN plasmídico de acuerdo al kit QIAprep Miniprep (QIAGEN). La presencia de hGrx-roGFP2 en los vectores pHD1700 y pTC-INDEX se confirmó mediante digestión con *HindIII/BamHI* y *NotI/BamHI*, respectivamente, aplicando el mismo protocolo de reacción y análisis descrito anteriormente para la linealización de los plásmidos.

Finalmente, un clon de cada vector fue secuenciado en sus dos hebras para verificar la integridad de la secuencia de la hGrx-roGFP2 utilizando los oligonucleótidos Fo Grx-roGFP ndIII/Re roGFP mHI (para la construcción pHD1700-hGrx-roGFP2) y Fo Grx-roGFP otl/Re roGFP mHI (para la construcción pTC-INDEX-hGrx-roGFP2) y el servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo o la empresa MWG-Biotech (Alemania). Las secuencias se analizaron con los programas Chromas Lite y Vector NTI v 6.0 (InforMax Inc.)

3.2.2 Generación del mutante R53F de la 2CGrx1 de *T. brucei* y su clonado en el vector pET-Trx

El residuo R53 de la 2CGrx1 de *T. brucei* fue reemplazado por una fenilalanina mediante técnica de mutagénesis sitio dirigida con *megaprimer*. Esta técnica está basada en la generación de megacebadores a partir de una primera reacción de amplificación sobre el ADN molde con cebadores sentido y antisentido sintéticos conteniendo la mutación deseada, los cuales son luego purificados y empleados en una segunda reacción de PCR

para obtener la secuencia de largo completo y doble hebra mutada. Los cebadores empleados para las sucesivas reacciones de PCR fueron: TbGrx1_FwHindIIINcoI (5'-AAGCTTCCATGGAACCTCTATCG-3', subrayado y en itálica se indica el sitio de corte para las enzimas *HindIII* y *NcoI*, respectivamente), TbGrx1_R53F_Rv (5'-GGTAAATCTCACCAAACAGTTGTTCTCC-3', en itálica se indica el codón mutado), TbGrx1_R53F_Fw (5'-GGAGAACAACTGTTTGGTGAGATTACC-3', en itálica se indica el codón mutado) y TbGrx1_RvKpnI (5'-CGTGGTACCTTAGCTCAGCAAAC-3', subrayado se indica el sitio de corte para *KpnI*). La primera ronda de reacción PCR consistió en emplear el siguiente juego de primers: TbGrx1_FwHindIIINcoI / TbGrx1_R53F_Rv (dará lugar al amplicón 1) y TbGrx1_R53F_Fw / TbGrx1_RvKpnI (dará lugar al amplicón 2) bajo las siguientes condiciones de reacción (se indican las cantidades o concentraciones finales de cada componente): 250 ng de ADN genómico *T. brucei* cepa 427, 1X Buffer de PCR sin MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 5 U Taq DNA Pol (Invitrogen), 0,25 µM de cada cebador y agua ultrapura hasta un volumen final de 100 µL. El programa de amplificación consistió de los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C 30 seg, 56°C 30 seg y 72°C 2 min, y finalmente un paso de extensión a 72°C durante 10 min.

Los amplicones generados en estas reacciones de PCR (amplicón 1: ~180 pb y amplicón 2: ~150 pb) se analizaron en un gel de agarosa al 1,5% p/v y luego se purificaron de la reacción de PCR empleando el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Los amplicones se eluyeron en 100 µL de agua ultrapura. Estos megacebadores fueron empleados en una segunda reacción de PCR que se realizó en un volumen final de 100 µL tal como se detalla a continuación: 2 µL amplicón 1 (26 ng/µL) y 2,5 µL amplicón 2 (19 ng/µL), 10 µL Buffer Pfu 10X, 2 µL 10 mM dNTPs, 10 U Pfu Pol (Invitrogen), 0,25 µM de TbGrx1_FwHindIIINcoI y 0,25 µM de TbGrx1_RvKpnI y agua ultrapura hasta volumen final de 100 µL. El programa de amplificación fue similar al empleado en la primera reacción de PCR excepto que el tiempo de extensión durante los ciclos fue de 1 min en lugar de 30 seg. Una vez completada la reacción de PCR esta fue analizada en un gel de agarosa al 1% (p/v). Al observarse una única banda del tamaño molecular esperado (300 pb), se procedió a purificar el amplicón directamente de la reacción de PCR usando el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Este amplicón fue luego clonado en un vector TA (pCR2.1, Invitrogen) mediante la siguiente reacción: 3 µL del amplicón, 1 µL Buffer de ligación 10X, 2 µL vector pCR2.1 (25 ng/µL), 3 µL agua ultrapura y 1 µL T4 ADN ligasa (4 U Weiss). La reacción de ligación fue incubada durante una noche a 14°C y al día siguiente se emplearon 5 µL de la misma para transformar bacterias *E. coli* DH5-α quimiocompetentes de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Invitrogen). Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas LB agar conteniendo 100 µg/mL ampicilina, 40 µL de X-gal 20 mg/mL y 40 µL IPTG 100 mM. Se seleccionaron 3 colonias blancas a partir de las cuales se preparó ADN plasmídico de acuerdo a las instrucciones del kit QIAprep Miniprep (QIAGEN) y el cual fue sometido a secuenciación de una hebra empleando el cebador TbGrx1_FwHindIIINcoI y el servicio de secuenciación del IP-Montevideo.

El plásmido pCR2.1-Tb2CGrx1 R53F conteniendo la mutación deseada y el vector pET-Trx (para expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*) fueron digeridos con las enzimas de restricción *Nco*I y *Kpn*I como se describe a continuación: 5 ng de pCR2.1-Tb2CGrx1 R53F (clon B) o 5 ng pET-Trx, 10 µL de Buffer K 10X (Invitrogen), 10 µL de 0,1% albumina bovina, 1 µL *Nco*I HF (20 U/µL), 1 µL *Kpn*I HF (20 U/µL) y agua ultrapura hasta completar 100 µL. La reacción se incubó a 37°C durante 3 h, luego de la cual las endonucleasas fueron inactivadas por calentamiento a 65°C por 10 min. El inserto digerido fue purificado de la reacción de digestión empleando el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), mientras que el vector linealizado fue corrido en un gel de agarosa 1% (p/v) y purificado del mismo utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). El inserto y el vector digeridos fueron eluidos de las columnas QIAGEN con 25 µL de agua ultrapura y ligados de acuerdo al siguiente protocolo: 25 ng vector, 100 ng inserto, 0,5 µL de T4 ADN ligasa (equivalente a 5 U), 1 µL de Buffer T4DNA ligase 10X y agua ultrapura hasta 50 µL. La reacción fue incubada durante la noche a 14°C y previo a la transformación de células competentes la ligasa fue inactivada a 65°C durante 10 min.

E. coli cepa DH5α quimiocompetentes (Invitrogen) se transformaron con 10 µL de la reacción de ligación mediante shock térmico siguiendo las indicaciones del proveedor. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB agar suplementadas con kanamicina 50 µg/mL y se incubaron durante 16-20 h a 37°C. Se obtuvieron dos colonias resistentes al antibiótico a partir de las cuales se extrajo ADN plasmídico y se procedió a su secuenciación en ambas hebras del ADN empleando los cebadores TbGrx1_FwHindIIINcoI y TbGrx1_RvKpnI (Servicio de secuenciación del Institut Pasteur Montevideo). Uno de los plásmidos, denominado pET-Trx-Tb2CGrx1 R53F B-1 resultó positivo al análisis de secuencia presentando el reemplazo de F por R en la posición 53 y la ausencia de mutaciones adicionales en el marco abierto de lectura del inserto.

Tabla 2. Secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de diferentes secuencias. Se subrayan los sitios de restricción introducidos. Todos los oligonucleótidos fueron preparados a una concentración *stock* de 100 pmol/µL.

Nombres	Secuencias de los oligonucleótidos
Fo Grx-roGFP ndIII	5'-GCTAAGCTTATGGCTCAAGAGTTTGTG-3'
Re roGFP mHI	5'-TGGATCCCCCGGGTTACTTGTAC-3'
Fo Grx-roGFP otl'	5'-TAGCGGCCGCATGGCTCAAGAGTTTGTG-3'
TbGrx1_FwHindIIINcoI	5'-AAGCTTCCATGGAACCCTCTATCG-3'
TbGrx1_R53F_Rv	5'-GGTAAATCTCACCAAACAGTTGTTCTCC-3'
TbGrx1_R53F_Fw	5'-GGAGAACAAGTGTGGTGAGATTACC-3'
TbGrx1_RvKpnI	5'-CGTGGTACCTTAGCTCAGCAAAC-3'

3.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*

3.3.1 hGrx-roGFP2 y roGFP2

Entre 30-50 ng de las construcciones plasmídicas pQE60 hGrx-roGFP2 (cedido gentilmente por el Dr. Andreas Meyer, Heidelberg Institute of Plant Sciences, University of Heidelberg, Alemania) y pQE60-roGFP2 (cedido gentilmente por el Dr. Tobias Dick, German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania) fueron incorporadas a células *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes mediante shock térmico a 42°C durante 2 minutos. Las células transformadas se incubaron a 37°C por 1 hora a 200 rpm, y luego se sembraron sobre placas de LB agar suplementadas con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron toda la noche a 37°C.

Se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante a partir de un inóculo de varias colonias provenientes de placas LB-ampicilina. Luego, se realizó una dilución 1/5 en medio TB (*Terrific Broth*: extracto de levadura 12 g/L, triptona 24 g/L, K₂HPO₄ 25 mM, KH₂PO₄ 25 mM, glicerol 0,4% v/v) con ampicilina 100 µg/mL final. Estos cultivos se incubaron a 37°C y 220 rpm durante 3-4 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) ≈ 0,6-0,8. En este punto se realizó la inducción de la expresión con 500 µM IPTG y se cultivó a 20°C y 160 rpm durante 16-18 hs aproximadamente.

A continuación, se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 5.000g y 4°C durante 20 minutos. El *pellet* se pesó y luego se resuspendió completamente en amortiguador A (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0) en una relación de 5 mL de amortiguador A por cada gramo de *pellet* húmedo. Para iniciar la lisis celular, se agregó 3 mg/ml lisozima, 1 mM PMSF, 40 µg/mL TLCK, 150 nM pepstatina y 4 nM cistatina todos preparados en amortiguador A. La muestra se incubó en hielo durante 1 hora luego de la cual se procedió a la sonicación (Branson Sonifier Cell Disruptor 200V) utilizando los siguientes parámetros: tiempo total de 2 min con un impulso *on* de 30 seg, un impulso *off* de 30 seg y una amplitud de 40%. A continuación se realizaron dos centrifugaciones (Thermo Scientific™ Sorvall™ RC 6 Plus) a 23.000g durante 60 minutos a 4°C para separar los restos celulares del sobrenadante. Previo al pasaje por la columna de afinidad y para eliminar partículas insolubles, el extracto líquido se filtró utilizando filtros de 0,45 µm (Minisart, Sartorius).

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) empleando una columna *HisTrap Fast Flow* (GE healthcare) de 1 mL a una temperatura de trabajo de 4-8°C y empleando una bomba peristáltica (TRIS Teledyne ISCO). La columna fue pre-equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador A y luego se aplicó el extracto soluble filtrado a la columna. A continuación se realizaron 2 lavados sucesivos, ambos con 10 volúmenes del mismo amortiguador agregado de 20 mM de imidazol. La elución de la proteína se realizó con gradiente, mezclando diferentes volúmenes de amortiguador A y amortiguador B (imidazol 500 mM en amortiguador A pH

8,0) a modo de ir incrementando la concentración de imidazol. Las proteínas eluyeron a una concentración de imidazol de 200 mM. Todos los pasos de esta cromatografía se realizaron a un flujo de 1 mL/min.

Para visualizar las fracciones conteniendo la proteína en cuestión y determinar el grado de pureza de la misma, se realizó un SDS-PAGE al 15%. Para revelar el gel, se sumerge el mismo en azul de Coomassie [0,1% p/v brilliant blue R350, metanol 20% v/v y ácido acético 10% v/v] durante un par de horas y seguidamente se destiñe con una solución de etanol: agua 7:10 y ácido acético 10% v/v. Asimismo, la concentración proteica de las fracciones se determinó mediante ensayo del ácido bicinonínico (BCA) empleando albúmina sérica bovina como estándar.

Para la hGrx-roGFP2 no fue necesario un segundo paso de purificación ya que la muestra presentó un nivel de pureza ~80% de acuerdo al análisis por SDS-PAGE. Para la roGFP2 fue necesario realizar una segunda cromatografía que consistió en un intercambio aniónico realizado sobre una columna MonoQ 5/5 (GE-Healthcare) conectada a un equipo de cromatografía líquida de baja presión ÄKTA Pure (GE-Healthcare) con detección UV-visible en línea a 280 nm. En primer lugar las fracciones de elución de la IMAC conteniendo la roGFP2 fueron concentradas a 2,5 mL por diafiltración (tubo Amicon Ultra-15 con filtro de 3 kDa, Millipore) y éste concentrado fue aplicado a una columna PD-10 (GE-Healthcare) pre-equilibrada en amortiguador C (Tris HCl 20 mM, NaCl 10 mM, pH 8). Las proteínas se eluyeron con 3,5 mL de amortiguador C y luego se inyectaron en una columna MonoQ 5/5 pre-equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador C. La elución se realizó por gradiente de fuerza iónica de 10 mM a 1 M NaCl en buffer Tris HCl 20 mM (pH 8) para un volumen total de 30 mL, colectando automáticamente fracciones de 1 mL y monitoreando en línea la absorción a 280 nm. Durante la cromatografía se trabajó a un flujo constante de 1 mL/min. La visualización, cuantificación y determinación de la pureza de las fracciones se realizó como fue descrito anteriormente en la purificación por IMAC.

A aquellas fracciones obtenidas de la IMAC y del intercambio iónico que mostraron un nivel de pureza aceptable (homogeneidad de la muestra 60-80%), se les realizó un cambio de amortiguador a través de una columna pD10 (GE healthcare) equilibrada previamente con el amortiguador de intercambio PBS 1X, 1mM EDTA, pH 7.

3.3.2 Mutante R53F de la Tb2CGrx1

El plásmido pET-Trx-Tb2CGrx1 R53F B-1 (ver sección 3.2.2) fue incorporado a células *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes mediante shock térmico a 42°C durante 2 minutos. Las células transformadas se incubaron a 37°C por 1 h a 200 rpm, y luego se sembraron sobre placas de LB agar suplementadas con kanamicina 100 µg/mL y se incubaron toda la noche a 37°C. Se realizó en paralelo la expresión y purificación de la forma salvaje de la proteína, pET-Trx-Tb2CGrx1. Aquí vale la pena recordar que este plásmido permite la expresión de la proteína de interés como fusión a la Trx1 de *E. coli* donde ambas proteínas están unidas

por un linker que contiene un tag de polihistidina y un sitio de corte para la proteasa TEV (*tobacco etch virus*) que, luego de tratamiento con esta proteasa, permite obtener la proteína en cuestión libre de etiquetas.

Se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante a partir de un inóculo de varias colonias provenientes de placas LB-kanamicina. Luego, se realizó una dilución 1/5 en medio TB con kanamicina 100 µg/mL final. Estos cultivos se incubaron a 37°C y 220 rpm durante 3-4 h hasta alcanzar una DO₆₀₀ ≈ 0,6-0,8. En este punto se realizó la inducción con 500 µM IPTG y se cultivó a 20°C y 160 rpm, durante 16-18 h aproximadamente.

La cosecha, lisis enzimática, sonicated y clarificación del cultivo se realizaron de manera similar a la descripta en la sección 3.3.1.

La purificación de la proteína recombinante mutada y salvaje se realizó por IMAC empleando una columna *HisTrap Fast Flow* (GE healthcare) de 1 mL a una temperatura de trabajo de 4-8°C y una bomba peristáltica (TRIS Teledyne ISCO) a un flujo de 1 mL/minuto. Los pasos cromatográficos así como los buffer empleados fueron idénticos a los utilizados para la purificación de los biosensores recombinantes (sección 3.2.1). Las distintas fracciones de la purificación fueron analizadas en un gel SDS-PAGE 15 %, donde se espera observar una banda correspondiente a la proteína Tb 2CGrx1 fusionada al pTrx, de ≈25 kDa y $\epsilon_{280} = 27.055 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Las fracciones de elución conteniendo la proteína de interés se juntaron y ésta muestra fue sometida a proteólisis con TEV-P recombinante (1 mg por cada 35-70 mg de proteína total) en presencia de 2 mM EDTA y 5 mM DTT. Esta proteasa es producida en nuestro laboratorio (Bruno Manta 2014, Tesis de Doctorado PEDECIBA). El proteolizado fue dializado a 4°C utilizando una membrana con tamaño de poro de exclusión (MWCO) de 3 o 10 kDa (Sigma-Aldrich) contra amortiguador A con agitación, de manera de eliminar el imidazol presente en el eluido. En la primera etapa de la diálisis un volumen de muestra se dializa contra 20 volúmenes de amortiguador A durante 4 hrs a 4°C con agitación y en la segunda etapa se dializa 1 volumen de muestra contra 20-40 volúmenes del amortiguador A, O.N. y en iguales condiciones. La mezcla proteolizada y con baja concentración de imidazol fue clarificada por filtración (0,45 µm) y sembrada en un segundo paso de purificación por IMAC en donde se retiene la Trx de fusión (que contiene el linker con poli-His), la TEV-P (etiquetada con poli-His) y contaminantes menores. La fracción no unida en esta segunda IMAC, que posee a la proteína de interés, fue concentrada y sometida a una cromatografía de exclusión molecular (SEC) en una columna HiLoad Superdex 75 16/60 (GE) previamente equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM (amortiguador SEC), acoplada a un equipo de cromatografía líquida de baja presión con detección UV-visible en línea a 280 nm (ÄKTA Pure, GE, Unidad de Proteínas Recombinantes, IP-Montevideo) (Figura 24). Las diferentes fracciones de los distintos pasos cromatográficos fueron analizadas por electroforesis en condiciones desnaturizantes sobre gel de poliacrilamida 15% p/v teñidos con azul de coomasie

obteniendo una banda correspondiente a la proteína Tb2CGrx1 de 10.5 kDa y un $\epsilon_{280} = 11.585 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

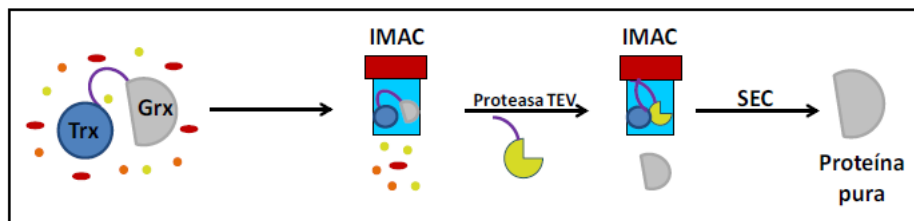


Figura 24. Esquema de la purificación de Tb2CGrx1 salvaje y mutante R53F. La proteína se obtiene con un alto grado de pureza tras dos pasos de cromatografía de afinidad por metales (IMAC), un paso intermedio de proteólisis con TEV-P y un paso final por filtración en gel (SEC).

3.4 Técnicas analíticas

3.4.1 Cuantificación de proteínas

Las proteínas recombinantes purificadas fueron cuantificadas espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de absorción molar teórico para 280 nm provisto por el servicio ProtParam (ExpASY).

La cantidad de proteína en muestras fue además cuantificada por medio del ensayo del ácido bicinónico (BCA) adaptados para lectura en microplaca según instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich), usando BSA como estándar. Se usaron placas de adsorción de 96 pocillos (Greiner) y el lector de microplacas con filtro de 562nm (BioTek ELx808 Absorbance Reader).

3.4.2 Cuantificación de tioles

La determinación de tioles se realizó mediante el método de Ellman (Ellman and Lysko, 1979). El DTNB stock se prepara a 4 mM en amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH ≤ 5 y se almacena en alícuotas protegidas de la luz a -20°C .

Para determinar la concentración de tioles en una muestra, esta se incubó (generalmente en una relación 1:50) con 1 mM de DTNB durante 5-10 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz y a continuación se midió la Abs 412 nm en un espectrofotómetro Cary (Variant). La concentración de tioles totales en la muestra se calcula haciendo uso de la Ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$) con un coeficiente de extinción molar para el TNB a 412 nm de $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH $\geq 7,3$ (Riddles et al., 1979); (Riener et al., 2002) y en caso de corresponder, este valor se afectó por el factor de dilución.

3.4.3 Reducción y oxidación de Tripanotión

El tripanotión reducido fue cuantificado con DTNB (ver sección 3.4.2) previo a los ensayos de fluorimetría. En caso que no se encontrara totalmente reducido, se procedió al tratamiento con NaBH_4 70 mM final en agua, 1 hora a temperatura ambiente semi-cubierto. Posterior a la reducción se volvió a cuantificar la concentración de tioles.

Para obtener el tripanotión totalmente oxidado se procedió a tratarlo con concentración equimolar de H_2O_2 por 2 horas a temperatura ambiente. Posterior al tratamiento se confirmó la oxidación con DTNB.

3.4.4 Ensayo de estabilidad de unión de centros ferrosulfurados por la *Tb2CGrx1* salvaje y mutante R53F

Las proteínas que unen centros ferrosulfurados presentan picos de absorción en el rango de los 300-700 nm con patrones característicos para cada tipo de complejo Fe/S, los cuales decaen durante el proceso de desensamblaje. *Tb2CGrx1* une un centro Fe/S del tipo 2Fe/2S con picos de absorción a 320 nm, 420 nm y 610 nm (Ceylan et al., 2010). El ensayo para cuantificar la estabilidad del holocomplejo consistió en medir espectros de absorción de las proteínas en cuestión a diferentes tiempos. Brevemente, la *Tb2CGrx1* salvaje o mutante R53F fue preparada a una concentración final de 20 mg/mL en buffer NaCl 300 mM, NaH_2PO_4 50 mM pH 8,0. Unos 162 μL de esta solución fueron transferidos a una cubeta de cuarzo (10-20mm), procediéndose a registrar los espectros de absorción en el rango 240-550nm (el pico de 610 nm fue excluido ya que este presenta una baja absorción) durante 30 min y utilizando la función Scanning kinetics del espectrofómetro Cary Eclipse (Variant). Bajo estas condiciones y a tiempo 0 ambas muestras de proteínas presentaron un valor de absorción a 420 nm de 0,3. Al cabo de 3 min, a las muestras se les agregó H_2O_2 a una concentración final de 5 mM (hasta completar un volumen final de reacción de 200 μL) y se prosiguió con la adquisición de los espectros en el tiempo. La cinética de liberación del cluster Fe/S fue graficada como la absorción a 420 nm en función del tiempo.

3.4.5 Ensayo de reducción de la insulina

La actividad oxidoreductasa de disulfuros fue evaluada mediante el ensayo de reducción de la insulina (Holmgren, 1979). En este ensayo se mide la turbidez causada por la precipitación de la cadena B de la insulina, tras la reducción de los disulfuros intermoleculares que la asocian a la cadena A en la forma nativa de la proteína. La reacción fue llevada a cabo en amortiguador fosfato de potasio 100 mM, 2 mM EDTA, pH 7, con una concentración final de insulina de 130 μM (0,75 mg/mL) y 1,5 mM DTT en placa de 96 pocillos en un volumen final de 200 μL . La forma recombinante de la *Tb2CGrx1* salvaje y mutante R53F fue ensayada a una concentración de 40 μM mientras que como

control de actividad oxidorreductasa se utilizó la Trx1 de *E. coli* a una concentración de 4 μM . Además se agregó como control una preparación de la Tb2CGrx1 salvaje recombinante previamente obtenida por el Dr. Bruno Manta en el laboratorio bajo las mismas condiciones de purificación que los utilizados en este trabajo. El desarrollo de turbidez se siguió mediante medición de la densidad óptica a 620 nm en un lector de placas Multiscan FC (Thermo). La cinética de la reacción fue analizada a partir de los gráficos de absorción a 620 nm en función del tiempo para cada condición ensayada.

3.5 Espectrofluorimetría

Las formas recombinantes de hGrx-roGFP2 y roGFP2 (15 y 10 μM , respectivamente) fueron pre-reducidas con DTT 20 mM u oxidadas con GSSG 200 μM por 1 h a temperatura ambiente en buffer PBS, EDTA 1mM en un volumen final de 1 mL. Luego se separaron del agente reductor u oxidante por gel filtración en una columna PD10 (GE), obteniendo 2 mL correspondientes a la proteína hGrx-GFP2 o roGFP2 reducida u oxidada. La concentración de proteína eluida de la columna PD10 fue cuantificada por medida de absorción a 280 nm, donde $\epsilon_{280} = 23.290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para hGrx-roGFP2 y $\epsilon_{280} = 15.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para roGFP2. Mediante un espectro de excitación (rango $\lambda_{\text{ex}} = 380\text{-}500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{nm}$, PMT ajustado a intensidad de fluorescencia en mitad de la escala) se confirmó la reducción (presencia solamente de pico a $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, relación $405/488 \approx 0,1$) u oxidación (aparición de pico a $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ y disminución del pico a $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ siendo la relación $405/488 \approx 0,7$) de las proteínas. En una microplaca de fluorescencia para 96 pocillos (Fluotrack, Greiner Bio One) 2 μM de proteína reducida fue incubada con diferentes concentraciones de GSSG, TS_2 (tripanotión oxidado), H_2O_2 , menadiona, diamida y diferentes compuestos (ver sección 4.1.2)–en buffer PBS, 1mM EDTA pH 7,0 a un volumen final del ensayo de 200 μL . De manera similar, 2 μM de proteína oxidada fueron tratadas con diferentes concentraciones de GSH, T(SH)_2 y DTT a un volumen final del ensayo de 200 μL . Los agentes oxidantes y los agentes reductores utilizados fueron evaluados con las proteínas en un rango de concentración de 10- 500 μM . Para el caso de la roGFP2, su forma reducida u oxidada fue incubada con diferentes oxidoreductasas tal como la triparredoxina (TXN) y la 2CGrx1 de *T. brucei*, y como control la glutarredoxina 1 humana, en una relación de concentraciones equimolares. Se registraron los cambios en la fluorescencia emitida a 510 nm para un espectro de excitación en el rango de 380 a 500 nm durante un máximo de 45 min. Los valores máximos de emisión de fluorescencia obtenidos en la longitud de onda de excitación a 405 y 488 nm fueron utilizados para calcular la relación 405/488, indicativa del estado redox de la proteína. Las mediciones (cinéticas) se llevaron a cabo en un equipo Cary Eclipse a 25°C y agitación (Variant) (IP-Montevideo). Los valores obtenidos fueron procesados y analizados con el software Origin 8.0

3.6 Cultivos Celulares

3.6.1 Cultivo de *T. cruzi*

En este trabajo se utilizaron parásitos de las cepas Adriana y CL-Brener de *T. cruzi*. Asimismo, se trabajó con la línea *T. cruzi* CL-Brener pLew13 (Taylor et al., 2006), gentilmente cedida por el Dr. Esteban Serra (Universidad Nacional de Rosario, Argentina), que contiene integrado en su genoma secuencias codificantes para la T7-ARN polimerasa y la proteína represora de tetraciclina, que permiten la expresión inducible de secuencias exógenas (ver secciones 3.2.1 y 3.6.2).

Los parásitos en estadio epimastigota fueron cultivados a 28°C en medio BHI completo (*brain heart infusion* 33 g/L, triptosa 3 g/L, KCl 0,4 g/L, NaH₂PO₄ 4 g/L con el agregado de hemina 0,02 g/L, glucosa 0,2 g/L, penicilina/estreptomicina 10.000 U/L) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino libre de tetraciclina (SFB - PAA). Para la línea pLew13 el medio debió suplementarse con 250-500 µg/mL del antibiótico geneticina (o G418) durante protocolos de transfección y el mantenimiento de la línea transfectada.

Rutinariamente los recuentos de células se realizaron en cámara de Neubauer (Precicolor HBG, Germany) de la siguiente manera: i) una alícuota de una suspensión celular se incubó durante 5 minutos en paraformaldehído 4% v/v, ii) la muestra se transfirió directamente a una cámara de Neubauer mejorada o se diluyó previamente en PBS para facilitar el recuento celular, iii) se contaron las células viables (morfológicamente normales) ubicadas en los cuatro cuadrantes laterales, compuestos de 16 campos cada uno de ellos, de cada hemicámara (n1 y n2), y iv) el promedio $[(n1/4 + n2/4)/2]$ se multiplicó por 1×10^4 para obtener el número de células por mL, y en caso de corresponder, este valor se afectó por el factor de dilución.

3.6.2 Transfecciones de la forma epimastigota de distintas cepas de *T. cruzi*

Epimastigotas de *T. cruzi* cepa Adriana fueron cosechados en fase de crecimiento exponencial tardía ($4-6 \times 10^7$ parásitos/mL) a 2.000g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con 10 mL de PBS, luego con 10 mL de amortiguador de electroporación (HBS: 50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄·2H₂O pH 7,4) y finalmente se resuspendieron en esta solución a una densidad de 10^8 parásitos/mL. A 400 µL de esta suspensión se le agregaron 50 µL de una solución acuosa conteniendo 100 µg de la construcción pTcINDEX-hGrx-roGFP2 que fue previamente linealizada (para favorecer su integración por recombinación homóloga) con 10 U de enzima *SpeI* (New England Biolabs) durante toda la noche, esterilizada por precipitación con etanol absoluto (C. Erba) y disuelta en agua estéril. La mezcla ADN/células se colocó en cubetas de electroporación de 0,2 mm y se electroporó con un pulso a 450 V, 1300 µF, 13 Ohms utilizando el equipo ECM 600 (BTX). De la misma manera,

400 µL de la suspensión celular fueron electroporadas con 50 µL de H₂O estéril (control negativo).

Las células electroporadas se transfirieron a una botella de cultivo de 25 cm² conteniendo 2 mL de medio de cultivo BHI completo con 500 µg/mL G418. El cultivo se incubó a 28°C durante 24 h, luego de lo cual se le agregó 2 mL de medio BHI completo fresco con una concentración final de higromicina de 50 µg/mL (1/4 de la concentración final). A las 72 h post-transfección la concentración de higromicina fue incrementada a 200 µg/mL (concentración de selección). Cada 2-3 días se monitoreó el crecimiento del cultivo transfectado y del control negativo, y en caso de observar proliferación celular se realizaron diluciones al medio con medio fresco suplementado con 200 µg/mL de higromicina. A partir de la tercera semana la totalidad de los parásitos del control negativo murieron mientras que aquellos transfectados con el plásmido pTcINDEX-hGrx-roGFP2 presentaron resistencia a higromicina y lograron proliferar. Los estudios posteriores se realizaron sobre esta población de células ya que con *T. cruzi* no es posible realizar selección clonal ya que presenta un crecimiento densidad-celular dependiente. El acondicionamiento de las células para su criopreservación se realizó por cosecha de 2-8 x10⁷ parásitos en fase de crecimiento exponencial mediante centrifugación a 2.000g a temperatura ambiente y posterior resuspensión en 1 mL de medio de cultivo BHI con concentración de antibióticos apropiados y glicerol 10% v/v. Los criotubos se almacenaron a -80°C.

Epimastigotas de *T. cruzi* cepa CL-Brener pLew13 fueron cosechados en fase de crecimiento exponencial tardía (4-6 x 10⁷ parásitos/mL) a 2.000g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con 10 mL de PBS, luego se resuspendieron en 100 µL de solución Amaxa Basic Parasite (Lonza) a una densidad de 10⁸ parásitos/mL. A estos 100 µL se le agregaron 5 µL de una solución acuosa conteniendo 11 µg de la construcción pTcINDEX-hGrx-roGFP2 que fue previamente linealizada (para favorecer su integración por recombinación homóloga) con 100 U de enzima *BmgBI* (New England Biolabs) durante 3 horas a 37° C, esterilizada por precipitación con etanol absoluto (C. Erba) y disuelta en agua estéril. La mezcla ADN/células se colocó en cubetas de electroporación de 0,2 mm (Lonza) y se aplicó el programa de electroporación D-003 del equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). De la misma manera, 100 µL de la suspensión celular fueron electroporadas con 5 µL de H₂O estéril (control negativo). Para la etapa de selección de transfectantes y de criopreservación de células se procedió de manera idéntica a la descrita más arriba para parásitos de la cepa Adriana.

3.6.3 Infección de líneas celulares de mamífero por *T. cruzi*

Para la generación de los estadios infectivos para estudios por *Western blot* (ver sección 3.7), y estudios de microscopía (ver sección 3.9) se realizaron infecciones de células epiteliales de riñón de mono verde (VERO) y células embrionarias de riñón humano (HEK

293). Estas fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*, Gibco) en presencia de 10% v/v de SFB libre de tetraciclina (PAA) en estufa a 37°C gaseada con 5% CO₂. Veinticuatro horas antes de las infecciones, una placa de cultivo de 6 pocillos para microscopía (presentan un cubreobjeto en el fondo, Corning Inc.) se sembró con 1 mL por pocillo de una suspensión de 1x10⁵ células/mL de cada una de las líneas celulares reporteras. Al próximo día, cuando la monocapa de células alcanzó un 50 % de confluencia (aproximadamente 5x10⁵ células/mL) se procedió a la infección con parásitos. La forma tripomastigota, infectiva, de *T. cruzi* Adriana se obtuvo por diferenciación espontánea de cultivos “envejecidos” o depletados en nutrientes. Las formas epi y tripomastigota fueron identificadas por criterio morfológico. Cultivos en fase estacionaria tardía y con una relación aproximada de tripomastigota: epimastigota > 15%, se centrifugaron a 2.000g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio DMEM con 2% SFB a una densidad de 1x10⁶ células/mL. Tres mL de la suspensión de parásitos se dejaron en contacto con las células Vero durante 24 h en estufa a 37°C, manteniendo una relación 1:100 de exceso de parásitos totales (tripo y epimastigotas) sobre células de mamífero. En el caso de las células HEK 293, éstas se incubaron durante 6 h con los parásitos. Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante del medio, se lavó la monocapa con PBS y se agregó medio DMEM con 2% v/v SFB. Las láminas de microscopía conteniendo adheridas a su superficie células Vero y HEK 293 infectadas con amastigotas de *T. cruzi* se lavaron 3 veces con PBS por pipeteo y luego se fijaron con etanol 95% v/v durante 20 min. A continuación, se realizaron otros tres lavados con amortiguador PBS. Finalmente, las láminas se secaron por evaporación y el cubreobjetos se montó con glicerol 90% v/v en PBS. Los preparados fueron analizados por microscopía de epifluorescencia (ver sección 3.9.1)

Para los estudios de infectividad sobre macrófagos murinos (línea celular J774) se trabajó con cultivos de *T. cruzi* CL-Brener pLew13 pTcINDEX-hGrx-roGFP2 no inducido e inducido con oxitetraciclina (1 µg/mL).

Los macrófagos se sembraron en medio DMEM con SFB 10% v/v a una densidad de 1x10⁵ células/ mL sobre placas de cultivo de 8 pocillos (Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ system) y se cultivaron por 24 h en estufa a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar aproximadamente un 30% de confluencia (aproximadamente 3x10⁵ células totales). Posteriormente una parte de las células (2 pocillos) fueron incubadas con 200 U/mL de interferón gamma (IFN-γ) y lipopolisacárido (LPS) 4 µg/mL durante 4 h 30 min en estufa a 37°C y 5% de CO₂. El resto de las células (2 pocillos) no recibió este tratamiento de activación (control negativo). Además se incluyeron 2 pocillos de macrófagos activados con un inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible, iNOS, (receptor de tiramina, AmTyr, 50 µM final) y 2 pocillos de macrófagos activados con un inhibidor de la NADPH oxidasa (difeniliodonio, DPI, 200 µM final).

Las monocapas de macrófagos activados y sin activar, fueron co-incubadas durante 2 y 24 h con parásitos *T. cruzi* CL-Brener pTcINDEX hGrx-roGFP2 inducidos. Luego de 2 h los cubreobjetos fueron retirados de la placa, fijados por 10 min con 1 mL de

paraformaldehído al 4 % (v/v) a temperatura ambiente y lavados 2 veces con 1 mL de PBS. Luego fueron tratados con tritón 0,3 % por 10 minutos y finalmente lavados 2 veces con 1mL de PBS. Para teñir los ácidos nucleicos se agregó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 5 ug/mL, durante 10 min, y luego se removió el exceso de colorante con 2 lavados, cada uno con 1 mL de PBS. Los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos con medio de montaje (Cristal/Mount, Fisher). Los preparados fueron analizados por microscopía de epifluorescencia (ver sección 3.9.1). Para el preparado de 24 h, luego de las dos primeras horas de incubación se realiza un cambio de medio agregando DMEM fresco con 2% v/v SFB y 1 µg/ml tetraciclina, y se extiende la incubación en estufa a 37°C, 5% CO₂. Al cabo de 24 h totales, las muestras fueron procesadas de manera idéntica a lo descripto para el procedimiento de 2 h.

Para las infecciones realizadas sobre macrófagos murinos, los parásitos *T. cruzi* CL-Brener pTcINDEX hGrx-roGFP2 fueron diferenciados por estrés metabólico (privación de nutrientes; (Alvarez et al., 2011a). Treinta mL de un cultivo de epimastigotas a una densidad celular de 3×10^8 células/mL se centrifugó a 800g durante 10 min a 25°C y se resuspendió en 1mL de medio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM fosfato, pH 6, y 0,035% p/v bicarbonato de sodio). Luego de 2 h de incubación a 28°C en medio TAU el cultivo se diluyó 1/100 mediante agregado de 99 mL de medio TAU 3AAG (TAU, pH 6, suplementado con tres aminoácidos: 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato monosódico, 2 mM L-aspartato monosódico, y 10 mM glucosa) y se incubó a 25°C por 96 h en botella de 75 cm² en posición horizontal para favorecer la adhesión de los epimastigotas a la superficie. Se tomaron muestras del cultivo a los días 0, 1, 2, 3 y 4 para estudiar la expresión del biosensor durante la diferenciación de epimastigota a tripomastigota por técnica de *Western blot*. Durante todo el proceso de diferenciación se agregó 1 µg/mL tetraciclina cada 24 h.

3.6.4 Cultivo de *T. brucei*

En este trabajo se empleó la forma sanguínea de *T. brucei brucei* cepa 427 línea celular 449, la cual tiene integrado en su genoma una copia de la secuencia codificante para la proteína represora de tetraciclina, tanto en su forma salvaje como *knock-out* para la 2CGrx1 citosólica, denominada KO *Tb2CGrx1* o *Tb2CGrx1*^{-/-}.

Las células se cultivan en medio HMI-9 completo (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen), conteniendo 10% v/v de SFB libre de tetraciclina (PAA o Invitrogen) y suplementado por litro con: 3,02 g de NaHCO₃, 28,2 mg batocuproína, 39 mg timidina, 136 mg hipoxantina, 182 mg L-cisteína, 0,2 mM β-mercaptoetanol, 10 U penicilina/estreptomicina (Gibco) y 0,2 mg fleomicina (Invitrogen). Higromicina (Invitrogen), agente de selección para la construcción pHD1700-hGrx-roGFP2, se empleó a una concentración de 5 µg/mL. Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de crecimiento aeróbicas con 5% de CO₂, en atmósfera húmeda y a 37°C.

Rutinariamente los recuentos de células se realizaron en cámara de Neubauer de la misma forma detallada en la sección 3.6.1 excepto por las siguientes modificaciones: i) una alícuota de la suspensión celular se transfirió directamente a una cámara de Neubauer mejorada o se diluyó previamente en PBS 1% p/v glucosa para facilitar el recuento celular ii) las células viables se definen como móviles y morfológicamente normales

3.6.5 Transfecciones de la forma infectiva de *T. brucei brucei*

Para realizar la transfección de parásitos *T. b. brucei* salvaje y KO *Tb2CGrx1* con la construcción pHD1700-hGrx-roGFP2 (ver sección 3.2.2), se cosecharon 30 millones de células en fase de crecimiento exponencial media ($0,8-1 \times 10^6$ parásitos/mL) a 2.000g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y luego se resuspendieron con 100 μ L de solución Amaxa Basic Parasite Nucleofector (Lonza). A éstas se les agregó 10 μ g de la construcción pHD1700-hGrx-roGFP2 en un volumen de 5 μ L, la cual fue previamente linealizada (para favorecer su integración por recombinación homóloga) con 10 U de enzima *NotI* (New England Biolabs) durante toda la noche y esterilizada por precipitación con etanol absoluto (C. Erba). La mezcla ADN/células se colocó en cubetas de electroporación de 0,2 mm (Lonza) y se aplicó el programa de electroporación X-001 del equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). A continuación, los parásitos transfectados se transfirieron a 24 mL de medio de cultivo HMI-9 completo conteniendo fleomicina, y luego se realizaron dos diluciones seriadas 1:10 en un volumen final de 24 mL con el mismo medio de cultivo fresco. Para realizar la selección clonal de los parásitos transfectados, las tres preparaciones se distribuyeron en tres placas de 24 pocillos (1 mL por pocillo) y luego se incubaron bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección 3.6.4. Luego de 24 h, los cultivos fueron llevados a un volumen final de 2 mL mediante el agregado de medio de cultivo fresco suplementado con 2x de higromicina de manera tal de alcanzar una concentración final de 5 μ g/mL. A partir del cuarto o quinto día se comenzaron a detectar parásitos resistentes a higromicina. Se aislaron y amplificaron 16 clones, los cuales fueron sometidos a diferentes estudios. El acondicionamiento de las células para su criopreservación se realizó por cosecha de $1-5 \times 10^7$ parásitos por centrifugación a 2.000g a temperatura ambiente y posterior resuspensión en 1mL de medio de cultivo HMI-9 completo fresco suplementado con los correspondientes antibióticos y glicerol 10% v/v. Los criotubos se almacenaron a -80°C.

3.6.6 Análisis de fenotipo de las líneas reporteras de *T. b. brucei* que expresan el biosensor

Los ensayos de inducción de la expresión del biosensor hGrx-roGFP2 fueron llevados a cabo en modo de crecimiento continuo en botellas de 25 cm². Los parásitos fueron sembrados a una densidad de 1×10^4 células/mL en medio de cultivo HMI-9 completo y cultivados durante un total de 4 días. Cada 24 h se determinó la densidad celular por

recuento en cámara de Neubauer y se agregó oxitetraciclina a una concentración final de 1 µg/mL. Las muestras fueron procesadas para ensayo de *Western blot* (ver sección 3.7). Todos los experimentos incluyeron como control las mismas líneas celulares no inducidas con oxitetraciclina.

3.6.7 Inmovilización de parásitos *T. brucei* y *T. cruzi* en placa para microscopía confocal

Se procedió a preparar un medio semi-sólido mezclando 1 mL de agarosa 4% p/v (Ultra Pure Low Melting Point agarose, Invitrogen) con 1 mL de PBS – glucosa 2% p/v, ambos pre-calentados a 40-42°C. Rápidamente el pellet conteniendo 5×10^6 parásitos es resuspendido en 2 mL de agarosa 2% p/v + glucosa 1% p/v cuando la temperatura de esta se aproxima a los 37°C, y 250 µL de la suspensión celular son transferidos a cada compartimento de una placa de Petri de poliestirerno con aplicaciones para microscopía (presenta un cubreobjeto en la cara inferior, Corning Inc.) compuesta por 4 compartimentos. La placa se deja abierta en cabina de flujo laminar para facilitar la solidificación del medio, luego de lo cual es tapada y transferida a una cámara termostatzada (28°C) del microscopio confocal Leica TCS SP5 (Institut Pasteur de Montevideo).

3.7 Ensayo de Western blot

Para la detección de proteínas específicas en extractos proteicos totales de *T. cruzi* y *T. brucei* así como de proteínas recombinantes, se realizaron ensayos de inmunodetección con anticuerpos anti-GFP.

Entre 10 a 100 millones de parásitos en distintas fase de crecimiento o estadio de diferenciación se cosecharon por centrifugación a 2.000g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con cantidad suficiente de amortiguador PBS 1X. Los *pellets* celulares se resuspendieron en una solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, tritón X-100 0,5% v/v, pH 8). Luego de incubar durante 10 minutos en hielo, el lisado se centrifugó a 18.000g y al sobrenadante se le adicionó amortiguador de carga para electroforesis (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, glicerol 20% v/v, SDS 1% p/v y azul de bromofenol 0,05% p/v con β-mercaptoetanol 5% v/v) suficiente para obtener un equivalente en densidad celular de 1×10^6 parásitos/µL.

A muestras de las proteínas recombinantes, previamente cuantificadas por medidas de absorción a 280 nm o ensayo de BCA, se les adicionó amortiguador de carga para electroforesis hasta llegar a la concentración final deseada en cada caso.

Los extractos proteicos fueron separados por SDS-PAGE 15% utilizando como amortiguador de corrida Tris base 0,25 M, glicina 0,52 M y SDS 35 mM, pH 8,3 y luego se transfirieron a una membrana de PVDF (GE healthcare) pre-tratada por embebido durante

30 seg en EtOH 100% v/v y posteriormente durante 5 min en H₂O y amortiguador de transferencia Tris base 0,25 M, glicina 0,52 M, pH 8,3. La transferencia se realizó a 350 mA durante 4 h en un equipo Mini Trans-Blot (Bio-Rad), en baño de hielo. Terminada ésta, se lavó la membrana con amortiguador PBS en agitación orbital a 200 rpm durante 5 min. El bloqueo de la membrana se realizó en PBS 4% p/v en leche entera de vaca (PBS-L) durante toda la noche a 4°C y en agitación a 80 rpm. Se realizaron 2 lavados con PBS conteniendo 0,1% v/v Tween-20 (PBS-T) de 5 min cada uno y luego se incubó la membrana con una dilución apropiada en PBS-L del anticuerpo primario (1/2000 anti-TXN y 1/1000 anti-GFP, para todos los casos) durante 2 h a temperatura ambiente con agitación a 70 rpm. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-T y se incubó la membrana durante 60 min a temperatura ambiente con una dilución 1/10000 en PBS-L del anticuerpo secundario anti-conejo, conjugado a peroxidasa de rábano (HRP; Invitrogen). Vale la pena recordar que el anticuerpo anti-GFP se haya conjugado a HRP. Finalmente se lavó la membrana 5 veces con PBS-T. La detección de la actividad peroxidasa, y por lo tanto de las correspondientes bandas de proteínas reactivas, se desarrolló por quimioluminiscencia con el *kit Amersham ECL reagents* siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Las láminas radiográficas *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) se revelaron manualmente por inmersión en solución de revelado y de fijación (Kodak) con lavados intermedios y final con agua desionizada.

3.8 Citometría de flujo

Las mediciones de intensidad de fluorescencia de la hGrx-roGFP2 expresada por las líneas transgénicas de *T. brucei* y *T. cruzi* fueron realizadas en un citómetro Cyan (Dako), BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) o FACSaria FUSION (BD Biosciences). El día del ensayo, los parásitos en distintas fases de crecimiento, estadio o provenientes de animales infectados fueron resuspendidos a una densidad final de 1×10^6 células/mL en PBS-glucosa 1% p/v, luego de haber sido centrifugados a 2.000g durante 10 min a temperatura ambiente. Los parásitos se trataron con distintas concentraciones de agentes oxidantes, compuestos químicos y reductor (DTT), y durante diferentes tiempos, tal como se detalla en distintas partes de la sección Resultados. Previo al análisis por citometría, a las suspensiones celulares se les agregó ioduro de propidio (PI, agente intercalante de ácidos nucleicos no permeable que empleamos como marcador de pérdida de integridad de membrana y por lo tanto de viabilidad celular) a una concentración final de 2 µg/mL. Durante las adquisiciones de las muestras en los citómetros, las células se excitaron con láseres de 488 nm. Midiendo la dispersión frontal (*forward-scatter*) en función de la dispersión lateral (*side-scatter*) de la luz para un $\lambda_{ex} = 488$ nm es posible discriminar las células de los detritos celulares en un gráfico de puntos *forward- vs. side-scatter* ambos en escala logarítmica. Con esa misma longitud de onda se excita a la roGFP2 y se colecta la emisión de fluorescencia con filtros de 530 ± 40 nm para el equipo Cyan y 530 ± 30 para el equipo Accuri. Estos datos se grafican como un histograma de eventos vs. fluorescencia de

roGFP2, esta última en escala logarítmica para la línea de reportera de *T. cruzi* o de *T. brucei*. La señal del PI se visualiza con el detector de fluorescencia de 613 ± 20 nm para el equipo Cyan y 670 LP nm (filtro *long pass*), para el equipo Accuri, luego de excitar la muestra a 488 nm, y los datos se grafican en histogramas de eventos vs. fluorescencia de PI, este último en escala logarítmica. Los datos obtenidos con el equipo Cyan fueron procesados con el programa Summit v4.3 (Dako Colorado, Inc) y el análisis de los mismos se realiza en lote con el software FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Inc.), mientras que los datos obtenidos con el equipo Accuri fueron procesados con el programa BD Accuri C6 software.

Para los experimentos de actividad biológica de compuestos químicos sobre la forma no infectiva de *T. cruzi* CL-Brener pTcINDEX hGrx-roGFP2 (ver sección 4.6.3), se utilizó el equipo BD FACSaria™ Fusion. Se procedió con el procesamiento de las muestras y la determinación de parámetros como fue descrito para la adquisición por el citómetro Cyan y para el citómetro Accuri, con la diferencia de que el citómetro FUSION se encuentra equipado con un láser a 405nm (filtro 525/50) y uno a 488nm (filtro 530/30nm), y una cabina de bioseguridad integrada. Presenta como principal ventaja la obtención de medidas ratiométricas.

3.9 Microscopía

3.9.1 Microscopía de epifluorescencia

La visualización de los preparados de las infecciones de células VERO, HEK 293 y macrófagos J-774 con *T. cruzi* CL-Brener hGrx-roGFP2 (sección 3.6.3) se llevó a cabo en un microscopio invertido Olympus IX81 equipado con una cámara CCD (HAMAMATSU ORCA-ER) con lente objetivo de inmersión en aceite UPlanFI 60x 1.25 Oil (Plataforma de Microscopía, Institut Pasteur de Montevideo). Se utilizó campo claro para obtener información sobre la morfología general de los parásitos y/o células de mamíferos, el filtro de fluorescencia para λ_{ex} 360-370 nm / λ_{em} 420-460 nm para la detección de la señal del DAPI (marcado de núcleos y kinetoplasto) y el filtro de fluorescencia para λ_{ex} 470-495 nm / λ_{em} 510-550 nm para la detección de la señal de la roGFP2.

3.9.2 Microscopía confocal

La visualización de los preparados de *T. cruzi* inmovilizados en medio semisólido y viables (sección 3.6.7), se llevó a cabo en un microscopio láser confocal espectral invertido Leica DMI6000, TCS SP5 con lente objetivo de inmersión en aceite 63X (HCXPL APO NA 1.42) (Plataforma de Microscopía, IP-Montevideo). Se empleó un $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 488/510-550 para detectar la señal de la roGFP2 y las adquisiciones se realizaron sobre habitáculo termostatzado a 28°C, agregando H₂O₂ como estímulo oxidante tal como se indica en la sección resultados 4.5.1

Se tomaron imágenes a diferentes tiempos y en distintos planos Z (espesor total: 8µm). Asimismo, se capturaron imágenes de campo claro para obtener información sobre la morfología general de los parásitos y/o células de mamífero. Las imágenes fueron analizadas con el software LASAF v2.0 (Leica Microsystems).

3.10 Infecciones de ratones BALB/cJ por *T. brucei brucei* hGrx-roGFP2

Se empleó un modelo de infección murina aguda por *T. b. brucei* cepa monomórfica para llevar a cabo estudios de validación biológica con la línea reportera *T. brucei brucei* hGrx-roGFP2. La cepa de ratón empleada fue BALB/cJ y las infecciones fueron realizadas en condiciones “libres de patógenos específicos” disponibles en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del IP-Montevideo. El protocolo de experimentación aplicado fue previamente aprobado por la Comisión de Ética de Uso Animal (CEUA; Protocolo 004-11) el cual se ajusta a las normas de éticas vigentes según la ley nacional 18.611.

Cuatro hembras BALB/cJ de 6-8 semanas (peso aproximado entre 15-25 gramos) fueron inoculadas por vía intraperitoneal con 300 µL de PBS-glucosa 1% p/v conteniendo 10^4 *T. brucei brucei* hGrx-roGFP2 crecidos previamente durante 48 h en medio de cultivo. Un grupo (2 hembras) fueron infectadas con parásitos sin inducir y el otro grupo (las restantes 2 hembras) fueron infectadas con parásitos inducidos previamente (24hs) con 1 µg/mL de oxitetraciclina. Dado que la expresión del gen de la hGrx-roGFP2 es inducible por tetraciclina, al grupo de animales problema (n= 2) se les suministró 1 mg/mL oxitetraciclina en el agua de bebida 72 h previas y durante la infección con recambio cada 48 h, mientras que el grupo control (n=2) no recibió este tratamiento.

Cada 72-96 h se controló el peso de los animales y se extrajeron muestras de sangre para analizar el estado redox del biosensor por citometría de flujo como se describió más arriba (sección 3.8). Mediante punción de la vena submandibular se colectaron ~50 µL de sangre en tubos conteniendo 5 µL EDTA tripotasio (3K-EDTA, 360 µL de anticoagulante 3K EDTA Deltalab + 840 µL PBS 1X - EDTA 2 mM, filtrado en esterilidad con filtro de 0,22 µm). La sangre anticoagulada se homogeniza por agitación suave y se diluye 20 veces en solución de lisis de glóbulos rojos estéril 1X (preparada en agua a partir de stock 10X, detallada como 0,8% p/v NH₄Cl, 0,084% p/v NaHCO₃ y 0,038% p/v Na₂-EDTA).

Por razones éticas, aquellos animales con una parasitemia $\geq 10^8$ parásitos/mL o que presentaran un estado de salud deteriorado fueron sacrificados en atmósfera de CO₂.

3.11 Ensayos de actividad biológica de compuestos sobre la forma infectiva de *T. b. brucei* hGrx-roGFP2

Para la evaluación de la actividad biológica de compuestos químicos sobre la forma infectiva de *T. b. brucei* hGrx-roGFP2, se emplearon condiciones de cultivo similares a las detalladas en la sección 3.6.4

Cuarenta y ocho horas antes del día del ensayo se realizan pasajes sucesivos del cultivo de parásitos de la siguiente manera: a tiempo 0 se prepara un cultivo con una densidad celular de $0,5 \times 10^6$ células/mL en 5 mL de medio HMI-9 completo en una botella de cultivo de 25 cm² (Corning Inc.). A las 24 h se realiza un recuento en cámara de Neubauer de dicho cultivo y los parásitos se siembran nuevamente a una densidad celular de $0,5 \times 10^6$ células/mL en dos botellas de cultivo de 25 cm² conteniendo 5 mL de medio HMI-9 completo cada una. Una de las botellas se induce con tetraciclina 1 µg/mL. El día del ensayo la densidad celular del pre-cultivo ($\sim 2 \times 10^6$ células/mL, fase exponencial media de crecimiento) se verifica mediante recuento en cámara de Neubauer y los parásitos se cosechan por centrifugación a 2.000g por 10 min a 25°C. El pellet celular se resuspende en medio de cultivo HMI-9 completo agregado de 1 µg/mL tetraciclina para obtener una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/mL. En una placa de 96 pocillos (Costar 3599, Corning Inc.) se colocan, por pocillo, 2 µL de compuesto disuelto en DMSO o el propio disolvente (control) y 200 µL de la suspensión de parásitos. Las soluciones madre de los compuestos se prepararon a concentraciones finales de 3-24 mM en 100% v/v DMSO de acuerdo a la solubilidad de cada uno. Se realizan las diluciones seriadas correspondientes a las concentraciones que se van a evaluar. Cada condición se ensayó por duplicado o triplicado.

Luego de incubar la placa durante 24 h a 37°C con 5% CO₂, se procede al análisis del estado redox de la roGFP2 y la viabilidad celular por citometría de flujo utilizando el equipo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Al momento de adquirir las muestras, éstas se diluyen al tercio en buffer PBS glucosa 1% p/v (66,4 µL de cultivo: 133,6 µL buffer) y se agregan 2 µL de ioduro de propidio 200 µg/mL en una placa 96 pocillos fondo en U (NUNC) apta para las adquisiciones por el *sampler* del equipo BD ACCURI C6.

Las muestras se analizaron como fue descrito en la sección 3.8. Todas las medidas se realizaron a flujo y tiempo de adquisición constante (60 s/muestra) y las intensidades de fluorescencia o dispersión de luz fueron detectadas en escala logarítmica. Los datos se analizaron con el programa BD Accuri C6 Software.

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

Los valores de CE₅₀ (concentración efectiva 50) se obtuvieron de curvas dosis - respuesta ajustada a la ecuación de Boltzmann para distribuciones de tipo sigmoide. Se expresa el error como la desviación estándar, estimada como σn^{-1} .

3.12 Programas computacionales

3.12.1 Base de datos

Se recurrió a la información disponible en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y las bases de datos específicas sobre tripanosomas (TriTryp, <http://tritrypdb.org/tritrypdb>)

3.12.2 Procesamiento de datos e imágenes

El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia para la cuantificación de infecciones se realizó con el programa Image J.

La cuantificación por densitometría de las bandas obtenidas en ensayos de *Western blot* se realizó utilizando el programa Image J®. Para ello, las láminas radiográficas fueron fotografiadas con un scanner SNAPSCAN 1236 (AGFA). A partir de estas imágenes se determinó la intensidad de cada banda por unidad de área, sustrayendo la señal de fondo, si fuera necesario. Para cuantificar los niveles de hGrx-roGFP2 se siguió el mismo procedimiento ya mencionado, comparando las intensidades de banda obtenidas contra los de las curvas de calibración de proteína recombinante. La curva de calibración se realizó utilizando cantidades conocidas de la proteína recombinante. A partir de la misma y mediante análisis de densitometría se obtuvieron los ng proteína/célula que fueron luego convertidos a concentración molar de enzima teniendo en cuenta el peso molecular de la proteína y el volumen celular correspondiente a un parásito. En la mayoría de los casos los controles de carga se realizaron por estandarización frente a la señal de la tripanotión reductasa (TR).

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

Todas las gráficas fueron realizadas utilizando el programa Origin (OriginLab) mientras que los test estadísticos para los diferentes experimentos se realizaron con el programa GraphPad Prism 7.

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

4. Resultados y Discusión

4.1 Caracterización *in vitro* de los biosensores redox hGrx-roGFP2 y roGFP2

4.1.1 Expresión y purificación de la proteína hGrx-roGFP2

Con el posterior fin de evaluar la capacidad de respuesta de la hGrx-roGFP2 a diferentes agentes reductores y oxidantes bajo condiciones de trabajo *in vitro*, en primer lugar se procedió a la expresión y purificación de su forma recombinante a partir de bacterias *E. coli* XL1 (Fig. 25A) tal como fue descrito en la sección 3.3.1

La expresión y purificación de la hGrx-roGFP2 fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (p/v) y condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE 15%, Fig. 25B). En la fracción soluble del lisado de bacterias auto-inducidas se observa una banda prominente cercana a los 40KDa (Fig. 25B) correspondiente a la hGrx-roGFP2 recombinante. Durante el proceso de purificación por IMAC (del inglés *immobilized metal affinity chromatography*), esta misma banda se encuentra en una proporción minoritaria en muestras de fracción no unida (FNU), lo cual indica una retención eficiente de la proteína etiquetada a la resina de níquel. En la primera fracción del lavado con imidazol 10 mM (L1) se puede apreciar la remoción de proteínas contaminantes que se unieron de manera inespecífica y con menor afinidad a la columna HisTrap, cuyas cantidades disminuyen en la siguiente fracción de lavado (L2). La elución completa de la proteína recombinante se logra a concentraciones de imidazol de 250 mM, fracciones E3A-E3D. Del análisis de las fracciones, se observa que la mayor parte de hGrx-roGFP2 eluyó principalmente en las fracciones E3A-E3C, por lo que se decidió juntar las mismas para proceder con el cambio de buffer y la posterior cuantificación de proteína. Se estimó un rendimiento promedio por preparación de 5 mg de proteína por litro de medio de cultivo, siempre obteniéndose valores de pureza >90%. (Fig. 25B). Muestras hGrx-roGFP2 recombinante con estas características fueron empleadas en los ensayos que se presentan en las próximas secciones.

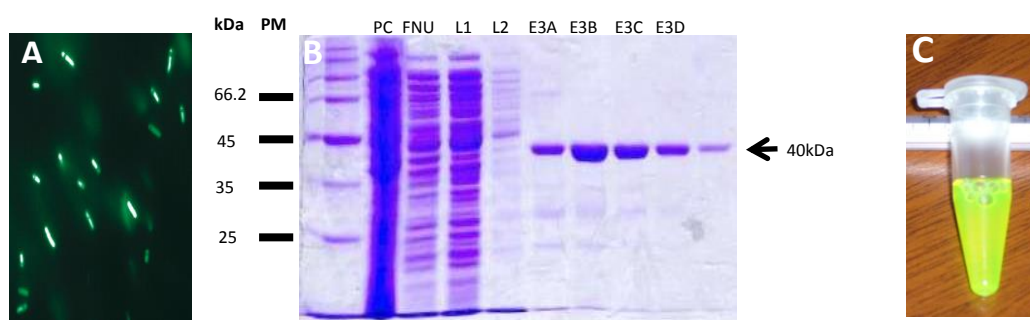


Figura 25. Expresión y purificación de hGrx-roGFP2 recombinante. (A) Imagen tomada en el microscopio de epifluorescencia de bacterias *E. coli* XL1 inducidas 18 hs con IPTG 250 μ M. (B) SDS-PAGE 15% de muestras post cromatografía de afinidad a metales. Donde, PM: marcador de peso molecular (Benchmark Protein Ladder); PC: pre-columna; FNU: fracción no unida; L1 y L2: lavado 1 y lavado 2; E: eluido. (C) Fotografía de muestra proteína recombinante purificada.

4.1.2 Respuesta *in vitro* del biosensor hGrx-roGFP2 a diferentes estímulos redox

Para evaluar la funcionalidad de la hGrx-roGFP2 recombinante frente a diferentes duplas redox y oxidantes se puso a punto un ensayo de cinética en placa de 96 pocillos y lectura en espectrofluorímetro. La proteína es previamente reducida durante 30 min con DTT 5 mM y el exceso de agente reductor es removido mediante filtración en gel sobre una resina de sefarosa G25 (columna PD-10). La proteína reducida es incubada a una concentración final de 1 μ M con diferentes concentraciones de oxidantes durante diferentes tiempos y luego se registran los espectros de excitación para una λ_{em} : 510 nm en un equipo Cary Eclipse. En determinados ensayos se procedió a verificar la reversibilidad de los cambios espectrales originados por oxidación del biosensor mediante el agregado de un exceso de agente reductor.

Las pruebas funcionales iniciales consistieron en ensayos de punto final (no cinéticos) donde la hGrx-roGFP2 fue tratada con distintas concentraciones de GSSG y TS₂ durante diferentes tiempos. Como se observa en la Fig. 26A, en presencia de GSSG el biosensor mostró los cambios espectrales esperados (Gutscher et al., 2008) que incluyen un aumento en la intensidad de fluorescencia (λ_{em} 510 nm) para un λ_{ex} 405 nm (correspondiente a la forma oxidada de la proteína) y una concomitante disminución de la misma para un λ_{ex} 488 nm (correspondiente a la forma reducida de la proteína), y por lo tanto a un incremento en la λ_{em} 510 nm derivada del cociente entre los picos obtenidos a λ_{ex} 405 nm / λ_{ex} 488 nm (ratio 405/488). Además, la magnitud de los cambios espectrales tuvo una relación directa con la concentración de oxidante y fueron totalmente reversibles mediante incubación con DTT 1 mM a diferentes tiempos. Estos resultados permitieron confirmar la integridad funcional del biosensor producido en forma recombinante.

Si bien el tratamiento del biosensor con diferentes concentraciones de TS₂ produjo cambios espectrales compatibles con su oxidación, a diferencia de lo observado con GSSG, la magnitud de los mismos fue significativamente inferior siendo que se emplearon concentraciones de TS₂ 5 veces superiores a las ensayadas para GSSG (Fig. 26B). Por ejemplo, para lograr una oxidación del biosensor similar a la obtenida con 0,1 μ M GSSG en <1 min (ratio 405/488 = 0,28) se debió tratar a éste con 6,15 μ M TS₂ durante al menos 15 min (ratio 405/488 = 0,27), tiempo al cabo del cual se esperaba alcanzar condiciones de equilibrio.

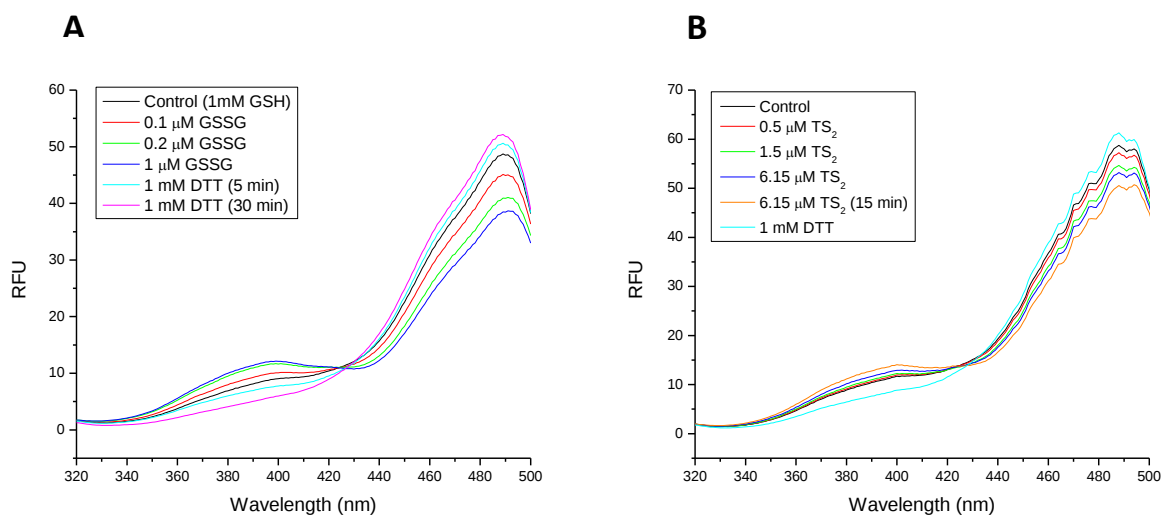


Figura 26. Oxidación de hGrx-roGFP2 por formas oxidadas de glutatión (GSSG) y tripanotión (TS₂). hGrx-roGFP2 (1 μM) pre-reducida con 20 mM DTT es tratada con distintas concentraciones de los disulfuros de glutatión (A) y tripanotión (B) y el espectro de fluorescencia es registrado de manera inmediata o luego de incubación a los tiempos indicados. Las muestras previamente oxidadas con las concentraciones más altas de oxidantes son tratadas con DTT 1 mM y los espectros registrados de manera inmediata o luego de incubación a los tiempos indicados. URF: unidades relativas de fluorescencia.

Un análisis temporal de la oxidación de hGrx-roGFP2 por GSSG y TS₂ muestra claramente la marcada diferencia en la reactividad del biosensor contra estos oxidantes (Fig 27). Mientras el agregado de 100 μM GSSG produjo una rápida ($\geq 0,275$ ox/min) y completa oxidación de la hGrx-roGFP2 (al menos en el orden de los segundos, bajo las condiciones experimentales aquí ensayadas) al cabo de 2 min de exposición, la cinética de reacción con 200 μM TS₂ fue al menos 7,8 veces más lenta (0,035 ox/min), mientras que se observa una segunda fase de oxidación aún más lenta (0,0125 ox/min) a partir de los 18 min de incubación. Vale la pena destacar que estas diferencias son seguramente superiores a las estimadas ya que la medida de la velocidad de oxidación del biosensor por GSSG está siendo subestimada en las condiciones de ensayo aquí empleadas dado que la primera medida se realiza a los 2 min del agregado del oxidante. Al cabo de 60 min de reacción no fue posible alcanzar la oxidación completa del biosensor con 200 μM TS₂.

La caracterización funcional de la forma recombinante del biosensor se completó realizando ensayos cinéticos con diversos agentes oxidantes. Como se muestra en la Fig. 28, el tratamiento con 100 μM diamida produjo una rápida (≤ 2 min) y completa oxidación del biosensor que se asemejó a la inducida por 100 μM GSSG (Fig 28). Este resultado es similar al observado por Hanson y colaboradores (2004) donde para una concentración 10 veces menor (10 μM) a la evaluada en este trabajo ya se obtiene una oxidación de la roGFP2 correspondiente al 100% de oxidación de la sonda. La diamida es un potente oxidante con especificidad por tioles (Kosower et al., 1995). Por el contrario, tanto el hidroperóxido de tert-butilo como la menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) agregados a 100 μM produjeron un pequeño aumento en el ratio 405/488 nm que al cabo de 58 min de incubación alcanzó un máximo de 0,18, lo cual representa un 1,8 % de oxidación del biosensor con respecto a su estado redox basal.

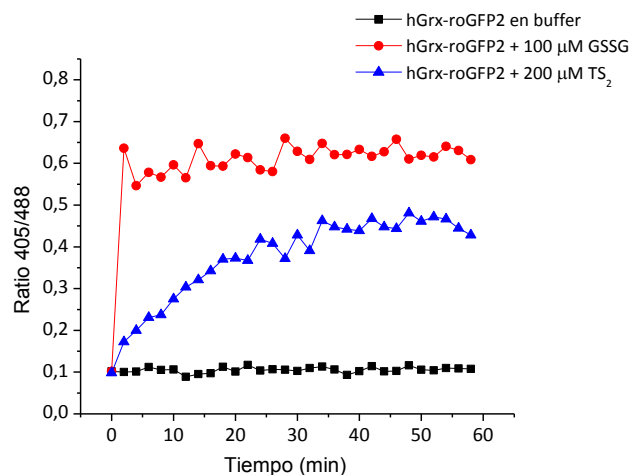


Figura 27. Cursos temporales de oxidación de hGrx-roGFP2 por GSSG y TS₂. hGrx-roGFP2 (2 μM) previamente reducida con 20 mM DTT fue tratada con 100 μM GSSG o 200 μM TS₂. Se realizó un control de oxidación espontánea que consistió en incubar el biosensor en el buffer de reacción. Para todas las muestras se registraron los espectros de excitación durante 60 min midiendo fluorescencia a λ_{em} : 510 nm. Los datos se grafican como la relación entre la intensidad de fluorescencia a 405 nm y 488 nm en función del tiempo. Los valores corresponden a 3 réplicas experimentales donde el procesamiento estadístico indica un error < 10% para todos los casos. No se incluyen las barras de error en el gráfico para simplificar la visualización de los puntos.

Si bien el hidroperóxido de *tert*-butilo es capaz de oxidar tioles proteicos (Myers et al., 2000, Kirk-orthmer encyclopedia of chemical technology), el fuerte carácter hidrofóbico de este compuesto y el entorno polar que rodea a las cisteínas de la roGFP2 pueden explicar la baja reactividad observada. La menadiona tiene el potencial de generar especies reactivas del oxígeno mediante ciclos redox de reducción por un electrón y oxidación espontánea con O₂ (Di Monte et al., 1984). Dado que el sistema de ensayo empleado se realiza en la ausencia de especies capaces de reducir a la naftoquinona por este mecanismo, los resultados obtenidos *in vitro* fueron los esperados. No obstante, en un medio intracelular este compuesto debería exhibir una potente actividad oxidante.

La mayor sensibilidad de hGrx-roGFP2 contra el disulfuro de glutatión se explica por la presencia de la hGrx en el biosensor, una enzima especializada en catalizar la transferencia del estado redox del par GSH/GSSG a diferentes proteínas blanco, en este caso la roGFP2. Como se esquematiza en la Fig. 29 (mecanismo 1), este mecanismo implica la glutationilación de una de las cisteínas de la proteína blanco por parte de hGrx, y a expensas de GSSG, con la consiguiente resolución del disulfuro mixto y la formación de un disulfuro intramolecular en la roGFP2 (Gutscher et al., 2008) y (Björnberg et al., 2006).

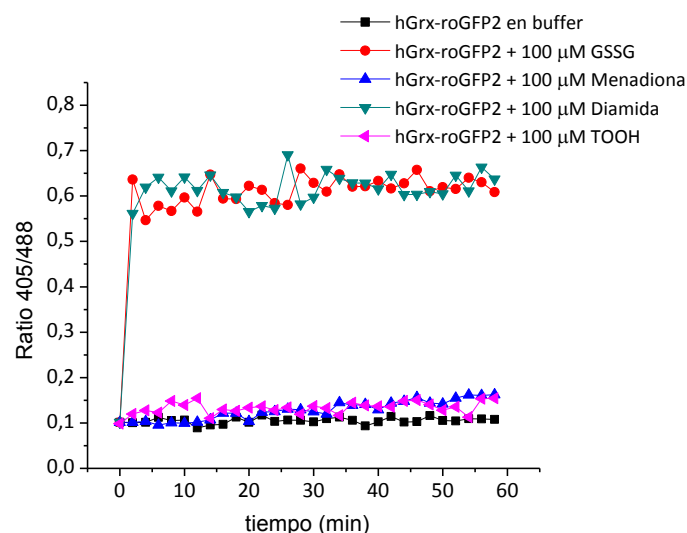


Figura 28. Cursos temporales de oxidación de hGrx-roGFP2 por diamida, menadiona e hidroperóxido de tert-butilo. hGrx-roGFP2 (2 μ M) previamente reducida con 20 mM DTT fue tratada con 100 μ M de diamida, menadiona o hidroperóxido de tert-butilo (TOOH). Se realizó un control de oxidación espontánea que consistió en incubar el biosensor en el buffer de reacción además de un control de reacción que incluyó la oxidación de hGrx-roGFP2 por 100 μ M GSSG. Para todas las muestras se registraron los espectros de excitación durante 60 min a una λ_{em} : 510 nm. Los datos se grafican como la relación entre la intensidad de fluorescencia a 405 nm y a 488 nm en función del tiempo. Cada una de las condiciones y tiempos fueron ensayados por triplicado, el procesamiento estadístico de los datos da un error menor al 10% para todos los casos. No se incluyen las barras de error en el gráfico para simplificar la visualización de los puntos.

Teniendo en cuenta la lenta oxidación del biosensor por el disulfuro de tripanotión y la naturaleza ditiólica de éste último es que planteamos dos modelos alternativos de intercambio tiol/disulfuro entre las especies involucradas (Fig. 29, mecanismo 2 y 3). En el mecanismo 2, el disulfuro del tripanotión estaría oxidando de manera directa, no catalizada, a la roGFP2. Esta reacción suponemos es lenta.

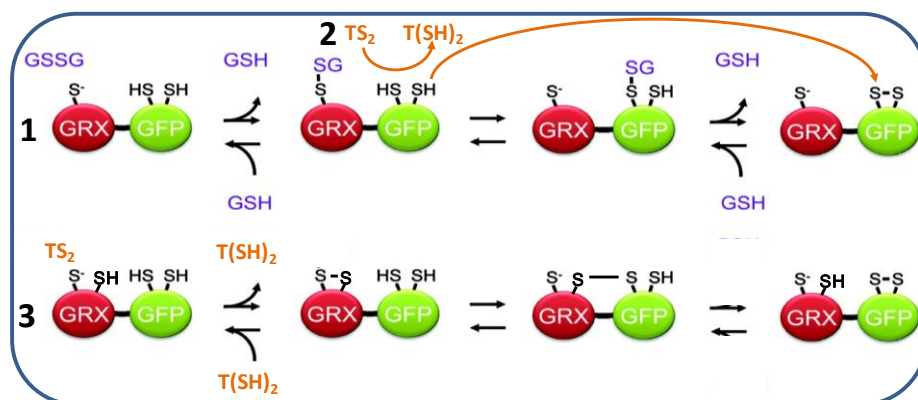


Figura 29. Modelos de intercambio tiol-disulfuro involucrados en la detección de cambios redox por el sensor hGrx-roGFP2. (1) La fusión hGrx-roGFP2 permite un rápido equilibrio entre los pares redox roGFP2_{red}/roGFP2_{ox} y 2GSH/GSSG lo cual es catalizado por la hGrx a través de un mecanismo de reacción monitiólico de intercambio tiol/disulfuro. La cisteína nucleofílica de hGrx reacciona específicamente con GSSG para formar un enlace disulfuro mixto (hGrx-SG). Este intermediario es luego atacado por uno de los tioles de la roGFP2_{red} (roGFP2-(SH)₂) dando lugar a la formación de roGFP2 glutatiónilada (roGFP2-SG), estado que es rápidamente resuelto hacia la formación de un disulfuro intramolecular en roGFP2 (roGFP2-S₂) con liberación de GSH. Para la reacción de TS₂ con este biosensor se plantean dos reacciones posibles: **(2)** la oxidación directa de roGFP2 por TS₂ y/o **(3)** la oxidación de Grx por TS₂ que traslada su estado redox a roGFP2 mediante un mecanismo ditiólico de intercambio tiol/disulfuro. Esquema modificado de (Meyer y Dick, 2010).

En el tercer modelo, el disulfuro del tripanotión oxidaría a la hGrx formando un disulfuro mixto transitorio entre tripanotión y la cisteína nucleofílica de la oxidoreductasa que sería rápidamente resuelto por la segunda cisteína del sitio activo de esta última con la liberación de dehidro-tripantión. Esta reacción implica la participación de ambas cisteínas del sitio activo de la hGrx, lo que da en llamarse mecanismo de intercambio tiol/disulfuro “ditiólico”. Ceylan y col. (2010) demostraron que esta reacción entre el tripanotión y la Grx tiene lugar tanto para una oxidoreductasa de origen eucariota (humana) como procariota (*E. coli*), aunque en ambos casos la eficiencia de la reacción es menor a la observada con una Grx de tripanosomas. En principio, este primer paso de oxidación de la hGrx por TS₂ no sería la etapa limitante de la serie de reacciones que debe tener lugar para permitir la oxidación de la roGFP2. Finalmente, la reacción se completaría a través de un intercambio tiol/disulfuro entre las cisteínas del módulo roGFP2 y el disulfuro de la Grx dando lugar a la especie oxidada de roGFP2 y la reducida de Grx. Si bien es conocida la capacidad de la roGFP2 para reducir otras proteínas blanco oxidadas, como por ejemplo ocurre en el caso del biosensor de H₂O₂ ORP1-roGFP2, no se ha demostrado que la roGFP2 sea capaz de reducir al disulfuro de la Grx. En ese sentido, vale la pena destacar que la tiorredoxina, una oxidoreductasa que cataliza reacciones redox mediante un mecanismo “ditiólico” sobre diferentes blancos proteicos, se ha mostrado refractaria a reaccionar con la roGFP2 (Gutscher et al. 2008). El posterior análisis de las estructuras de estas proteínas y modelado molecular de las interacciones entre ambas ha revelado que debido a impedimento estérico por parte de regiones adyacentes a los residuos de cisteína de la roGFP2 ambas proteínas no logran una interacción adecuada que ubique sus tioles a la distancia y en el alineamiento adecuado para que tenga lugar una sustitución nucleofílica del tipo SN₂, sin la cual no puede tener lugar el intercambio tiol/disulfuro (Meyer et al., 2010). Esto, junto con el alto grado de conservación del plegamiento estructural entre Trx y hGrx (e incluso Tb2CGrx1; Stefani et al., 2016) (Fig. 30), plantea la posibilidad que Grx tampoco sean capaces de llevar a cabo un intercambio tiol-disulfuro directo (es decir glutatión-independiente) con la roGFP2. Sin embargo, ante la falta de evidencia experimental nosotros abordamos dicho interrogante (sección 4.1.4).

Teniendo todo esto en cuenta es que nos inclinamos a pensar que la oxidación del biosensor por tripanotión disulfuro ocurre por reacción directa de este último sobre el módulo roGFP2 (Fig. 29, mecanismo 2). Además, en esta reacción de oxidación estaría compitiendo la hGrx ya que, como se mencionó anteriormente, la misma es capaz de llevar a cabo intercambios tiol-disulfuro con tripanotión (Ceylan et al., 2010) (Fig. 29, primera fase del mecanismo 3). Ambos eventos explicarían la menor capacidad de respuesta observada para el biosensor hGrx-roGFP2, aún en exceso de TS₂ (por ej. relación hGrx-roGFP2:TS₂ en los ensayos fue 1:100).

Frente a este hallazgo y con el fin de poder comprender los resultados de ensayos a nivel celular y contribuir al diseño de biosensores con mejores propiedades para detectar

cambios redox en estos organismos es que procedimos a profundizar en la caracterización del mecanismo de oxidoreducción del módulo roGFP2 por tripanotión y oxidoreductasas de tripanosomas

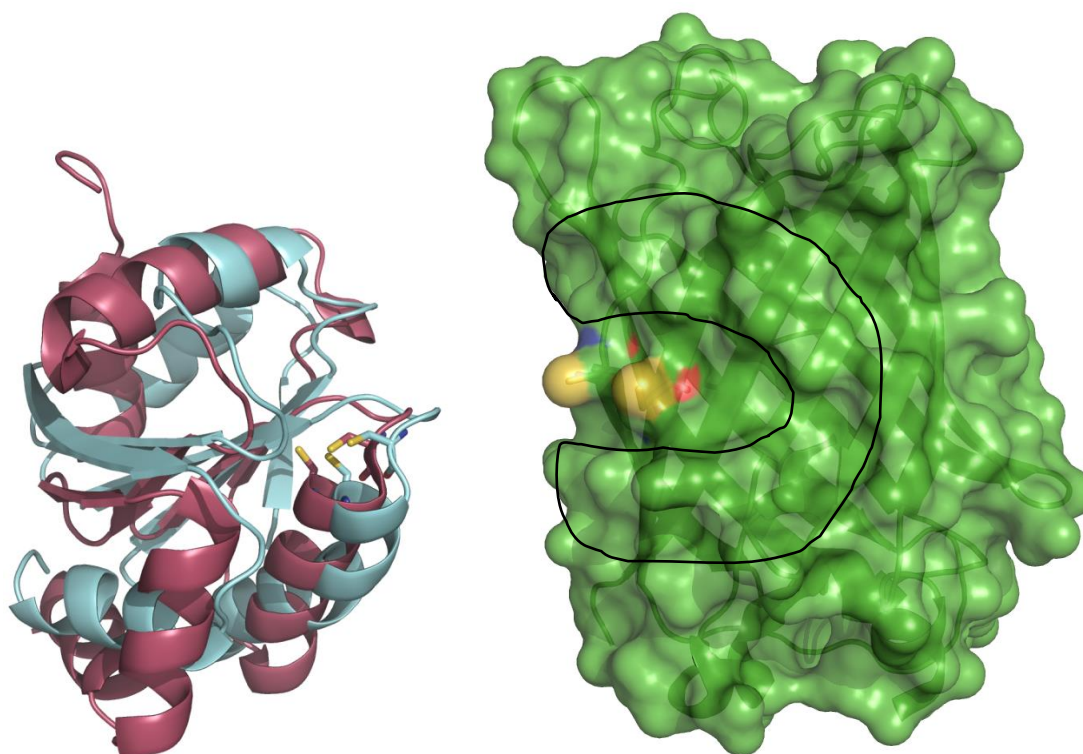


Figura 30. Estructura tridimensional de Grx, Trx y roGFP1. Super-imposición del esqueleto de las estructuras cristalinas correspondientes a las formas reducidas de la Grx (PDB 2HT9, cadena A, celeste) y Trx (PDB 1ERT, rojo ladrillo), y modelo de superficie de la estructura de la roGFP1 (PDB 2AHA, cadena A). Las cisteínas de sitio activo se muestran como palillos o esferas. La zona de la roGFP1 que contribuye al impedimento estérico para la interacción con las oxidoreductasas se señala con trazos negros. Imagen generada con el programa PyMol.

4.1.3 Expresión y purificación de la proteína roGFP2

El vector que codifica para la forma recombinante de la roGFP2 fue gentilmente cedido por el Dr. Tobías Dick (DKFZ, Heildeberg, Alemania). La proteína recombinante con etiqueta N-terminal de 6xHis fue expresada en *E. coli* cepa BL21 (DE3) y purificada en primer lugar por una IMAC (Fig. 31A), donde se utilizaron condiciones similares a la purificación de la proteína hGrx-roGFP2 (sección 4.1.1), seguido por una cromatografía de intercambio iónico (Fig. 31B). La elución completa de la proteína recombinante a partir de esta matriz se logra a concentraciones de NaCl de 400 mM, fracciones D6-D9 (Fig. 31B1 y B2). Se destaca que este último paso cromatográfico permitió eliminar un gran número de proteínas que co-eluyen junto con la roGFP2 de la columna de IMAC y alcanzar un nivel de pureza $\geq 85\%$. El rendimiento de proteína pura por litro de medio de cultivo fue de 8 mg. Esta proteína fue sometida a estudios de caracterización cinética con pares tiol/disulfuro por fluorimetría.

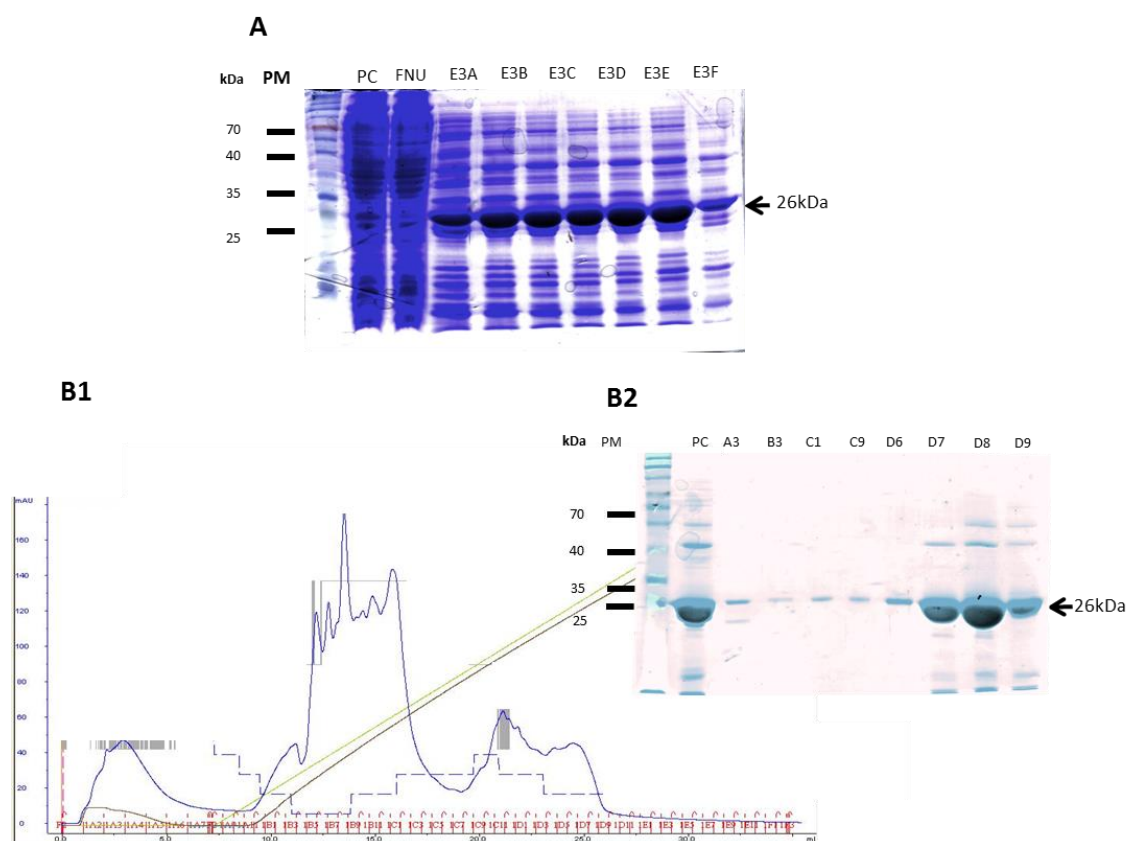


Figura 31. Expresión y purificación de roGFP2. La expresión y purificación de roGFP2 recombinante se analizó por SDS-PAGE al 15%. **(A)** Cromatografía de afinidad con resina HisTrap. PC: 5 μ L de fracción soluble de extractos de bacterias inducidas; FNU: 5 μ L de fracción no unida a la columna; E3A-E3F: 20 μ L de eluciones con amortiguador con 250 mM de imidazol. **(B1)** Cromatografía de intercambio aniónico (resina MonoQ) de la muestra de roGFP2 purificada por IMAC. Durante el gradiente se obtuvieron picos de elución a 0 (fracción A3), 45 (fracción B3), 200 (fracción C1-C9) y 400 mM de NaCl (fracción D6-D9). **(B2)** Análisis por SDS-PAGE 15% de las fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio aniónico. PM: marcador de peso molecular (Page Ruler prestained protein ladder, ThermoFischer). La flecha indica la banda correspondiente a la proteína recombinante roGFP2.

4.1.4 Respuesta de la proteína roGFP2 a diferentes duplas redox. Evaluación de posible fusión con enzimas parásito específico.

La respuesta de la proteína roGFP2 a diferentes componentes del sistema redox de tripanosomátidos se determinó por ensayos de fluorimetría realizados en placa de 96 pocillos en un equipo Cary Eclipse.

El primer ensayo consistió en evaluar la cinética de la reacción de oxidación de 2 μ M del biosensor pre-reducido con DTT 20 mM con diferentes concentraciones de GSSG y TS₂. Tal como se había reportado anteriormente (Hanson et al., 2004), la ausencia del módulo catalítico hGrx produjo un descenso significativo (≥ 180 veces) en la cinética de oxidación de la roGFP2 con GSSG (Fig. 32A, B). Como ejemplo, mientras que la oxidación de roGFP2 por 250 μ M GSSG durante 40 min fue lenta (v_{ox} 0,0015/min, Fig. 32A), el biosensor hGrx-roGFP2 fue rápidamente oxidado (< 2 min) con 100 μ M GSSG (v_{ox} 0,275/min, Fig. 32B). A

diferencia de lo observado para GSSG, TS₂ fue capaz de oxidar de manera directa y eficiente a la roGFP2 (Fig. 32A). La magnitud y cinética de oxidación de la roGFP2 fue proporcional a la concentración del oxidante, alcanzando una velocidad máxima de 0,04/min para 250 μ M TS₂. A modo de ejemplo, la oxidación de la roGFP2 con 10 μ M TS₂ mostró una cinética comparable a la observada para una concentración 25 veces superior de GSSG (v_{ox} 0,0015/min para 10 μ M TS₂ vs. v_{ox} 0,0015/min para 250 μ M GSSG).

Ensayos de oxidación de roGFP2 y hGrx-roGFP2 realizados bajo idénticas condiciones experimentales, mostraron que el primero de estos biosensores es oxidado de manera más eficiente por 100 μ M TS₂ (v_{ox} 0,02/min para roGFP2 vs. v_{ox} 0,01/min para hGrx-roGFP2). Por otro lado, mientras que la oxidación de la roGFP2 por TS₂ procede sin alcanzar un *plateau* al cabo de 40 min de exposición, y se aproxima a los niveles máximos de oxidación alcanzados por hGrx-roGFP2 tratada con 100 μ M GSSG, el nivel de oxidación de la hGrx-roGFP2 por TS₂ es inferior y tiende a alcanzar una situación de equilibrio a los 30 min de reacción.

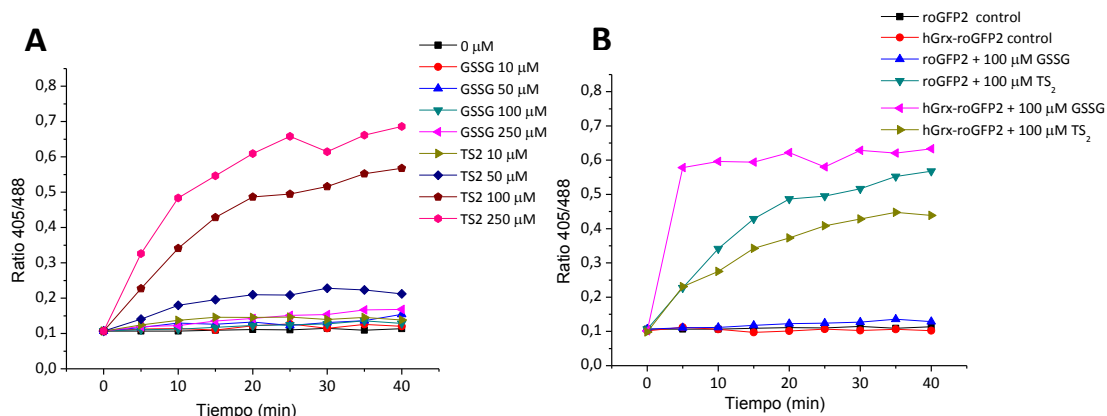


Figura 32. Oxidación de la roGFP2 con diferentes concentraciones de glutatión y tripanotión disulfuro. (A) Se grafica la relación de intensidad de fluorescencia a λ_{ex} 405/488 nm para 2 μ M roGFP2 previamente reducida y tratada luego con 10, 50, 100 y 250 μ M de GSSG o TS₂. **(B)** Se compara la respuesta entre roGFP2 y hGrx-roGFP2 tratadas con la misma concentración final de GSSG o TS₂. Cada una de las condiciones y tiempos fueron ensayados por triplicado, el procesamiento estadístico de los datos da un error menor al 5% para todos los casos. No se incluyen las barras de error en el gráfico para simplificar la visualización de los puntos.

Tal como se había sugerido en secciones anteriores en base a ensayos preliminares así como a la naturaleza y aspectos mecanísticos de las especies involucradas en las reacciones de intercambio tiol/disulfuro, estos resultados demuestran que el TS₂ es capaz de oxidar de manera directa y mucho más eficientemente que el GSSG a la roGFP2 (Fig. 29, mecanismo 2) y que la menor capacidad del biosensor hGrx-roGFP2 a detectar la forma oxidada del tripanotión se debe a la presencia del módulo hGrx que compite con roGFP2 por TS₂ y a la imposibilidad que la forma oxidada a disulfuro de la hGrx sea reducida por la roGFP2 debido a impedimento estérico.

El sistema redox dependiente de tioles de los tripanosomátidos cuenta con oxidoreductasas como la TXN y la 2CGrx1 que presentan características estructurales distintivas que les permiten operar transfiriendo equivalentes de reducción del T(SH)₂ y/o el GSH, a diferentes blancos proteicos (Ceylan et al., 2008); (Marquez et al., 2013); (Piñeyro et al., 2012) ; (Musunda et al., 2016). Con el fin de explorar si alguna de estas redoxinas parásito-específicas es capaz de actuar como módulo catalítico de la roGFP2 y para comprender mejor la interacción de estos sensores con los principales componentes del sistema redox de estos organismos es que se llevaron a cabo ensayos de oxidoreducción de roGFP2 con TXN, 2CGrx1, GSSG, TS₂ y hGrx (control).

Las proteínas recombinantes TXN y 2CGrx1 de *T. brucei*, y hGrx fueron generadas y purificadas por el Dr. Bruno Manta como parte de su proyecto de posdoctorado en nuestro laboratorio. Las mismas fueron gentilmente cedidas para realizar los ensayos que se presentan a continuación. La proteína Tb2CGrx1 fue tratada durante y luego de la purificación con EDTA para eliminar el centro ferrosulfurado y poder llevar a cabo los ensayos redox.

De manera similar a lo observado para la fusión hGrx-roGFP2, el biosensor roGFP2 previamente reducido e incubado con una concentración equimolar de hGrx (2 μM) fue rápidamente oxidado por 50 μM GSSG (Fig. 33A). Por el contrario, pero también de manera similar a lo observado anteriormente (Fig. 33A), la cinética de oxidación de la roGFP2 por 50 μM TS₂ fue inferior en presencia de hGrx (v_{ox} 0,007/min) que en su ausencia (v_{ox} 0,010/min; Fig. 33A).

Cuando estos mismos ensayos fueron realizados reemplazando la hGrx por la 2CGrx1 de *T. brucei* se notaron diferencias importantes. Por un lado la oxidación de la roGFP2 por 50 μM GSSG (Fig. 33B) fue acelerada en presencia de Tb2CGrx1 aunque con una cinética 0,8 veces más lenta (v_{ox} 0,125/min) que la determinada para la hGrx (v_{ox} 0,185/min). Este resultado es en parte esperado dado que la Tb2CGrx1 es menos eficiente que la hGrx en reducir el GSSG debido a que el GSH (producto de reacción) inhibe a la enzima (Manta, Ferrer-Sueta y Comini no publicado).

Por otro lado, y para nuestra sorpresa, en presencia de Tb2CGrx1 se notó un marcado incremento (al menos 7,5 veces) en la tasa de oxidación del biosensor por 50 μM TS₂ (v_{ox} 0,075/min) respecto a la correspondiente para la reacción de oxidación espontánea, no catalizada, con este disulfuro (v_{ox} 0,010/min; Fig. 33B). Esto difiere de los resultados obtenidos anteriormente con la hGrx, donde la oxidoreductasa no solo no cataliza esta reacción sino que compite con la oxidación espontánea del biosensor por TS₂ (Fig. 33A). De todas formas si se compara la tasa de oxidación de la roGFP2 catalizada por la Tb2CGrx1 a expensas de GSSG y TS₂ se nota que la enzima mostró una mayor eficiencia (al menos 1,6 veces) para llevar a cabo esta reacción con el primero de los disulfuros.

Ensayos de oxidación idénticos a los descritos para las duplas Tb2CGrx1/roGFP2 y hGrx/roGFP2 con 50 μM GSSG y 50 μM TS₂ fueron realizados con la TXN/roGFP2 (Fig. 33C).

A diferencia de la Tb2CGrx1, la TXN de *T. brucei* no fue capaz de catalizar la oxidación de la roGFP2 por GSSG ni por TS₂. Sin embargo, al igual que la hGrx, la TXN inhibió la oxidación espontánea de la roGFP2 por TS₂ (v_{ox} 0,007/min vs. v_{ox} 0,011/min en presencia y ausencia de TXN, respectivamente) (Figura 33 C). La falta de actividad catalítica en presencia de GSSG era esperable y se debe a que la TXN, a diferencia de hGrx, presenta un alto grado de selectividad por el sustrato de bajo peso molecular, tripanotión (Gommel et al., 1997), (Nogoceke et al., 1997), (Arias et al., 2013). A pesar de esta mayor preferencia de la TXN por tripanotión, la incapacidad de esta enzima para catalizar la oxidación de la roGFP2 a partir de TS₂ puede explicarse porque la reacción entre ambas moléculas lleva rápidamente a la formación de un disulfuro intramolecular en TXN que, al igual que lo propuesto para la tiorredoxina, permanece inaccesible a los tioles de la roGFP2.

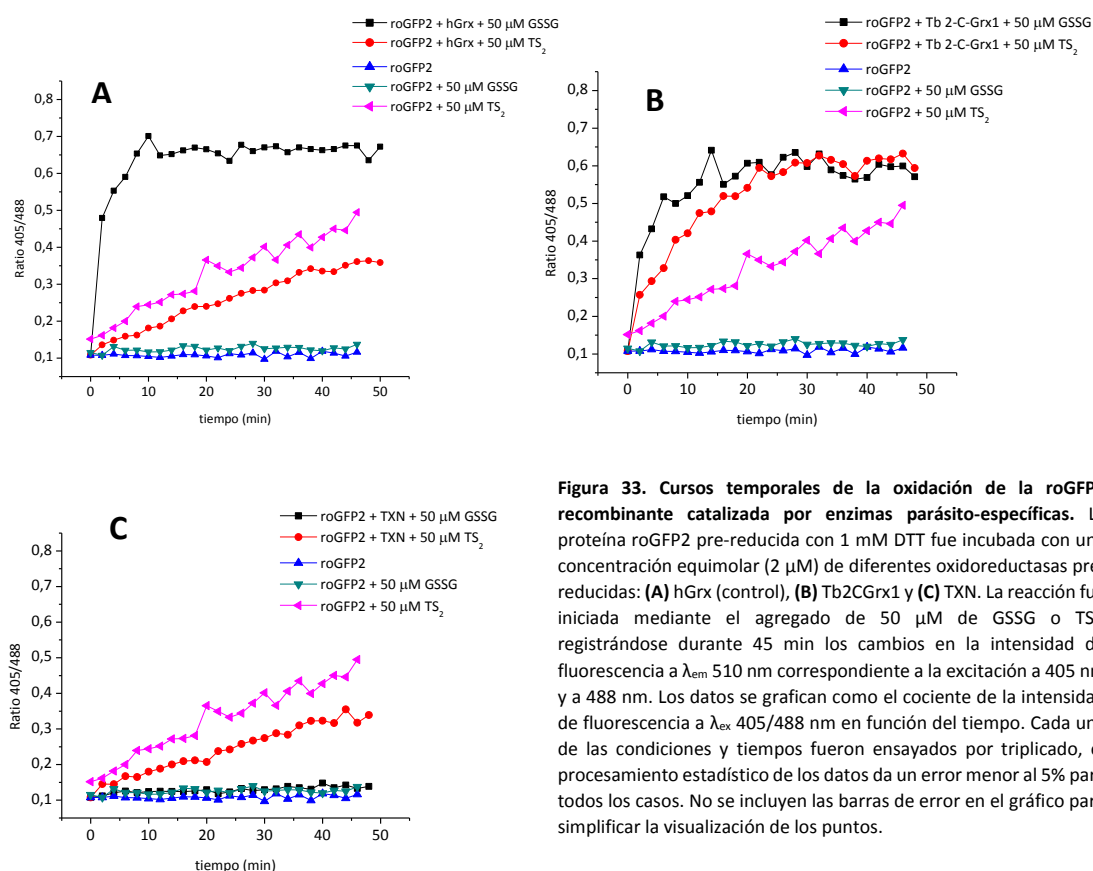


Figura 33. Cursos temporales de la oxidación de la roGFP2 recombinante catalizada por enzimas parásito-específicas. La proteína roGFP2 pre-reducida con 1 mM DTT fue incubada con una concentración equimolar (2 μ M) de diferentes oxidoreductasas pre-reducidas: **(A)** hGrx (control), **(B)** Tb2CGrx1 y **(C)** TXN. La reacción fue iniciada mediante el agregado de 50 μ M de GSSG o TS₂, registrándose durante 45 min los cambios en la intensidad de fluorescencia a λ_{em} 510 nm correspondiente a la excitación a 405 nm y a 488 nm. Los datos se grafican como el cociente de la intensidad de fluorescencia a λ_{ex} 405/488 nm en función del tiempo. Cada una de las condiciones y tiempos fueron ensayados por triplicado, el procesamiento estadístico de los datos da un error menor al 5% para todos los casos. No se incluyen las barras de error en el gráfico para simplificar la visualización de los puntos.

Además se evaluó la capacidad de estas enzimas de catalizar la reacción reversa, es decir la reducción de roGFP2 en ausencia y en presencia de tioles de bajo peso molecular. Para estos ensayos la roGFP2 fue previamente oxidada con GSSG 250 μ M durante 2 h y las especies de bajo peso molecular (e.g. exceso de oxidante y GSH liberado durante la reacción de oxidación) fueron separadas por gel filtración. La roGFP2 oxidada fue luego incubada con la forma reducida de las diferentes oxidoreductasas agregadas a concentración equimolar. Se observa que tanto la hGrx (v_{red} 0,015/min) como Tb2CGrx1 (v_{red} 0,010/min) fueron capaces de reducir a la roGFP2, aunque la primera de ellas mostro

ser 1,5 veces mas eficiente que la segunda. No obstante la cinética de esta reacción es más rápida en presencia de GSH. Como se observa en la figura 34B, en presencia de 100 μM GSH tanto la Tb2CGrx1 como la hGrx son capaces de llevar a cabo la reducción de la roGFP2, aunque la primera de estas enzimas mostró una eficiencia catalítica 1,75 veces superior (v_{red} 0,035 /min para Tb2CGrx1/GSH vs v_{red} 0,020/min para hGrx/GSH). Sin embargo, no se observa reducción de la roGFP2 por hGrx o Tb2CGrx1 en presencia de 100 μM T(SH)₂. La constante de velocidad de segundo orden reportadas para la reducción de la Tb2CGrx1 por T(SH)₂ y GSH difiere significativamente entre los dos tioles de bajo peso molecular, siendo de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Por lo tanto, T(SH)₂ es 1000 veces más eficiente en comparación con GSH (Ceylan et al., 2010). Esto podría explicar la mínima o nula reducción de la roGFP2 oxidada en presencia de T(SH)₂ y Tb2CGrx1, donde la reducción de la Tb2CGrx1 por T(SH)₂ estaría siendo la reacción que predomina.

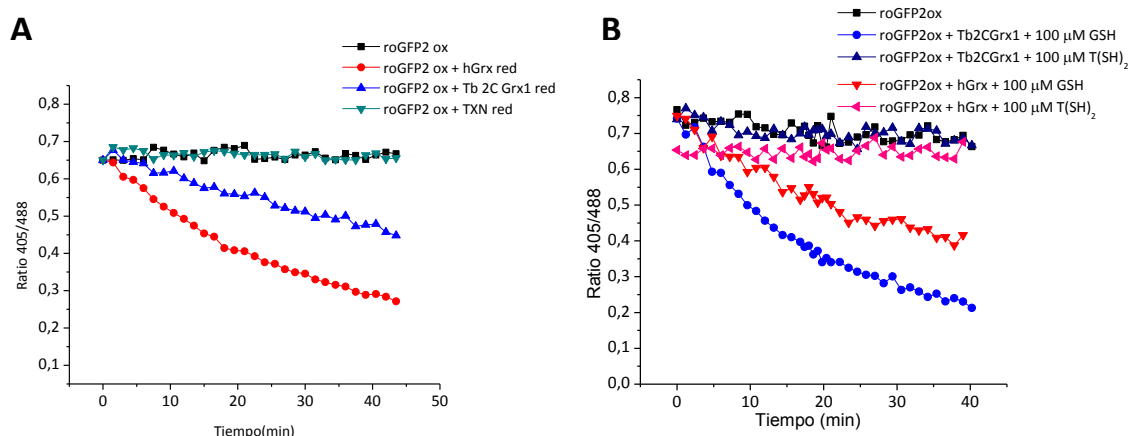


Figura 34. Reducción de la roGFP2 por oxidoreductasas parásito-específicas. La proteína roGFP2 (2 μM) previamente oxidada con 250 μM GSSG fue expuesta a una concentración equimolar de TXN, Tb2CGrx1 y hGrx previamente reducidas **(A)** en ausencia de tioles de bajo peso molecular y **(B)** en presencia de 100 μM GSH o 100 μM de T(SH)₂. Se registraron los espectros de excitación a un λ_{em} : 510 nm. Los datos se grafican como la relación entre la intensidad de fluorescencia a 405/488 nm en función del tiempo. Cada una de las condiciones y tiempos fueron ensayados por triplicado, el procesamiento estadístico de los datos da un error menor al 20% para todos los casos. No se incluyen las barras de error en el gráfico para facilitar la visualización de los puntos.

Por otro lado, y al cabo de 45 min de incubación la TXN no produjo cambios en el estado redox de la roGFP2. La casi nula reactividad de la TXN con la roGFP2 se asemeja al comportamiento reportado para la oxidoreductasa ditiólica Trx (Gutscher et al. 2008). *In vitro* la TXN es una proteína reductora de disulfuros proteicos más potente que la Tb2CGrx1, mientras que su actividad frente a proteínas glutationiladas es muy baja (M. A. Comini et al., 2012); (Arias et al., 2013). Por el contrario, la Tb2CGrx1 presenta un comportamiento totalmente opuesto.

El modelo de reducción del biosensor implicaría el ataque nucleofílico por parte de la cisteína N-terminal del sitio activo de la Grx sobre el disulfuro de la roGFP2, y la eventual resolución del disulfuro mixto entre Grx y roGFP2 por la segunda cisteína del sitio activo de

la oxidoreductasa (Fig. 35A). Nuestros experimentos no permiten determinar si este último paso tiene lugar, y si lo tuviera, si este o el anterior constituyen la etapa limitante de la reacción. Para responder a estas preguntas sería necesario realizar ensayos adicionales con mutantes de sitio activo de Grx y análisis de espectrometría de masa para detectar la formación de complejos estables de esta reacción. En presencia de GSH, el modelo propuesto implicaría la glutatiónilación de una de las cisteínas redox sensibles de la roGFP2 con posterior resolución del disulfuro mixto por transferencia de una molécula de GSH a la cisteína nucleofílica de la glutarredoxina humana (M. A. Comini et al., 2012). La presencia de otra molécula de GSH permitiría la resolución de este disulfuro con la formación de una molécula de GSSG (Fig. 35B). De manera análoga se propone un mecanismo de reducción de la roGFP2 con la Tb2CGrx1 en ausencia y en presencia de GSH.

Es destacar que nuestros resultados muestran por primera vez que Grx de clase I (por ej. hGrx y Tb2CGrx1), a diferencia de proteínas Trx (Trx y TXN), son capaces de reducir de manera directa la roGFP2 aunque con una cinética significativamente inferior a la reacción que tiene lugar en presencia de un mono- (GSH) o di-tiol $[T(SH)_2]$ de bajo peso molecular. Esto implica que a pesar de compartir plegamiento estructural con Trx, las Grx poseen otros determinantes estructurales que facilitan el acceso al disulfuro del biosensor.

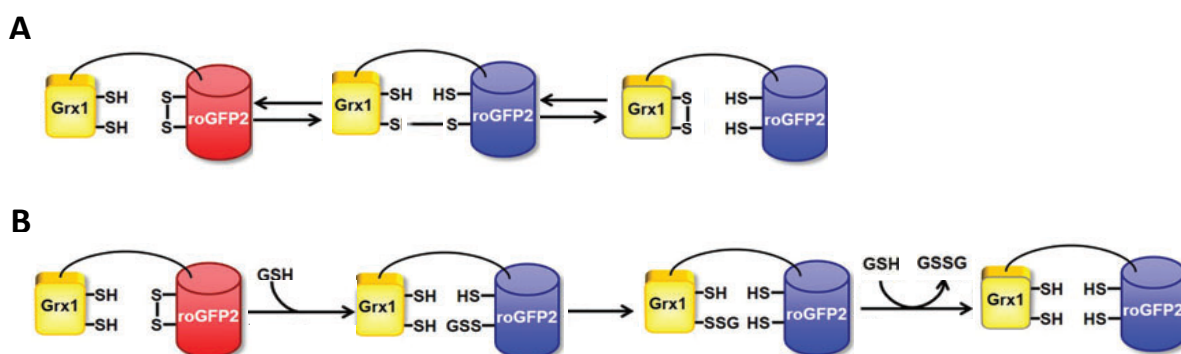


Figura 35. Modelos de intercambio tiol-disulfuro involucrados en la reducción de la roGFP2 catalizada por la hGrx. (A) Reducción directa: la cisteína nucleofílica de hGrx reacciona con el disulfuro de la roGFP2, formando un enlace disulfuro mixto entre ambas proteínas que luego se resuelve permitiendo la reducción de la roGFP2. **(B)** Reducción indirecta: en presencia de GSH/GSSG la hGrx cataliza el equilibrio entre este par redox y la roGFP2_{ox}/roGFP2_{red}, donde el GSH ataca el disulfuro de la roGFP2_{ox} dando lugar a un intermediario glutatiónilado (roGFP2-SG), luego la hGrx cataliza la reducción de este disulfuro mixto por un mecanismo de reacción monotiólico que produce la forma glutatiónilada hGrx-SG. Este intermediario es luego rápidamente resuelto hacia la formación de una molécula de GSSG y hGrx reducida por la acción de una segunda molécula de GSH.

Con respecto a la fase oxidativa del ciclo de óxido-reducción de la roGFP2 en presencia de Tb2CGrx1 y tripanotión disulfuro, nuestros datos muestran que si bien la roGFP2 es susceptible de oxidación directa por parte de TS₂ esta reacción es acelerada en presencia de Tb2CGrx1. En principio se plantean dos posibles mecanismos por los cuales tendría lugar esta reacción (Fig. 36): (1) oxidación de la Tb2CGrx1 a su forma disulfuro por parte del TS₂ seguido de reducción de la forma oxidada de la oxidoreductasa por los tioles de la roGFP2 la cual culminaría oxidada a su forma disulfuro (esto es la reacción reversa a la

mostrada en la Fig. 35A), o (2) oxidación de la Tb2CGrx1 por TS₂ con formación de un disulfuro mixto el cual es atacado por un tiol de la roGFP2 dando lugar a la forma tripanotionilada del biosensor la cual es rápidamente resuelta hacia la formación del disulfuro intramolecular de la roGFP2 y el tripanotión reducido. Dado que no se ha detectado la formación de disulfuros mixtos estables entre tripanotión y proteínas, lo que daría en llamarse “tripanotionilación”, es poco probable que el segundo mecanismo tenga lugar. No obstante, ya que no hemos realizado ensayos de oxidación directa de roGFP2 por Tb2CGrx1 no podemos concluir si el primero de los mecanismos prevalecería.

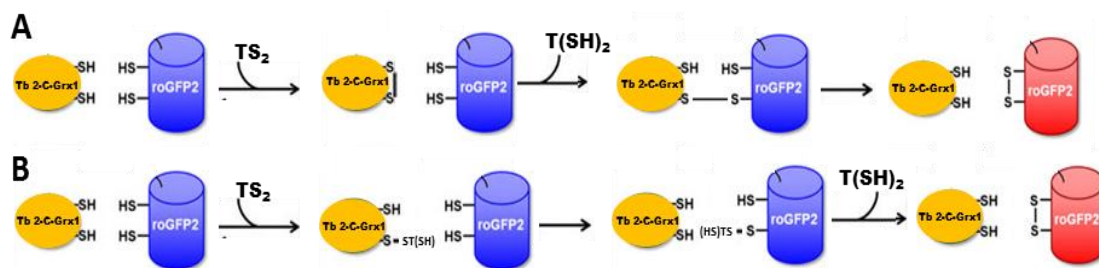


Figura 36. Modelos de intercambio tiol-disulfuro que median la oxidación de la roGFP2 por Tb2CGrx1 y TS₂. (A) La cisteína nucleofílica de la Tb2CGrx1 reacciona específicamente con el disulfuro del tripanotión, formando un enlace disulfuro mixto entre ambos que induce la oxidación a un disulfuro intramolecular de las Cys de sitio activo de la Tb2CGrx1 y la liberación de una molécula de T(SH)₂. El disulfuro intramolecular de la Tb2CGrx1 luego es reducido a expensas de los tioles de la roGFP2 que culminara oxidada. (B) La cisteína nucleofílica de la Tb2CGrx1 reacciona específicamente con el disulfuro del tripanotión, formando un enlace disulfuro mixto entre ambos que es reducido a expensas de uno de los tioles de la roGFP2. El disulfuro mixto de la Cys tripanotionilada de la roGFP2 se resuelve rápidamente a un disulfuro intramolecular de la roGFP2 con la liberación de una molécula de T(SH)₂.

En base al conjunto de resultados aquí presentados, es que consideramos que la incorporación de la Tb2CGrx1 como módulo catalítico de la roGFP2 puede conferir ventajas cinéticas y de selectividad al biosensor permitiendo la detección de la forma oxidada tanto del tripanotión, principal cosustrato redox de bajo peso molecular en los tripanosomátidos, así como del glutatión.

4.2 Expresión, purificación y caracterización bioquímica de la proteína mutante Tb2CGrx1 R53F.

4.2.1 Alineamiento de secuencia y mutagénesis de la Tb2CGrx1

Dado que uno de los objetivos de esta tesis era generar un biosensor redox más versátil (capaz de reaccionar tanto con GSH como T(SH)₂) y, por lo tanto, adecuado a la complejidad del sistema redox de estos organismos, se planteó fusionar la Grx1 ditiólica de *T. brucei* a la roGFP2 y proceder a su caracterización *in vitro*.

En su forma reducida la Tb2CGrx1 es capaz de coordinar centros ferrosulfurados (Fe/S), lo cual anula su actividad redox ya que la cisteína nucleofílica de la Grx está comprometida

en la unión del complejo inorgánico. Este comportamiento es poco común para Grx de clase I, como lo es la Tb2CGrx1, tal como queda ejemplificado con la hGrx. Por lo tanto se realizó un análisis múltiple de secuencias y estructuras de Grx clase I con el fin de poder identificar el o los residuos responsables de conferir dicha actividad a la Tb2CGrx1 que luego nos permitan generar mutantes incapaces de unir centros Fe/S pero redox activos. Dada la baja identidad de secuencia de la Tb2CGrx1 con Grx de otras especies (40%) no fue posible identificar, al margen de la Cys de sitio activo, residuos no conservados que podrían estar directa o indirectamente implicados en la unión del centro Fe/S. Uno de los residuos que aparecía como distintivo entre la 2CGrx1 (y otras Grx clase I) y la proteína homóloga *T. brucei* 2CGrx2 que localiza en la mitocondria del parásito y posee actividad redox pero no une centros Fe/S (Ceylan et al., 2010), fue una arginina ocupando la posición 53 (R53) de la primera proteína. Este residuo se halla altamente conservado en Grx clase I donde participa en el anclaje del GSH al sitio activo de la proteína mediante interacción electrostática de su cadena lateral con el grupo carboxilo del γ -glutamato (Li et al., 2010), (L. Wang et al., 2012), (Haunhorst et al., 2010), (Johansson et al., 2011), (Iwema et al., 2009), (Jeremy Couturier et al., 2009), (Jérémy Couturier et al., 2011). Dado que el GSH actúa como ligando tiólico adicional para la unión de centros Fe/S en ciertas Grx de clase I, es de esperar que este residuo participe en la estabilización del holo-complejo. De hecho, en la 2CGrx2 de *T. brucei* y otros tripanosomátidos esta posición es ocupada por una fenilalanina (F) (Fig. 37), un residuo hidrofóbico y voluminoso que no ofrece características fisicoquímicas adecuadas para interactuar con grupos polares del GSH.

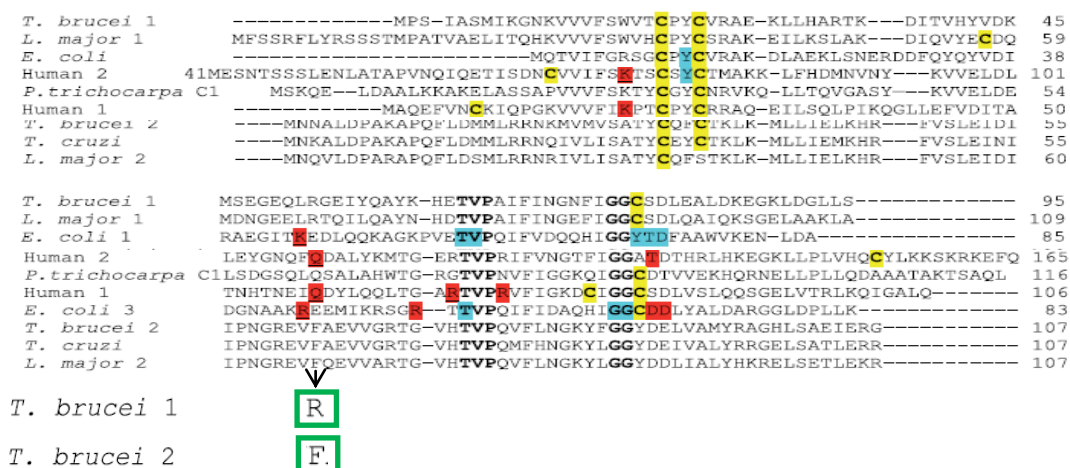


Figura 37. Alineamiento múltiple de secuencias de Grx clase I de tripanosomátidos. En negritas se muestran las Cys de sitio activo, y los residuos de dos motivos altamente conservados (TVP y GG) en Grx que forman un surco para la unión de GSH en la superficie de la proteína (Nordstrand K 1999, J Mol Biol; Johansson 2007 JBC). Todas las cisteínas están resaltadas con un fondo amarillo. Residuos cargados y polares involucrados en interacciones con GSH son resaltados con un fondo rojo donde aquellos que interactúan con el carboxilato de la glicina del GSH en varias Grx se subrayan. Se amplía y se recuadra la posición 53 en Tb2CGrx1 que es ocupado por una arginina (R) o una fenilalanina (F) en Tb2CGrx2.

En base al análisis anterior se planteó reemplazar la R53 de Tb2CGrx1 por una fenilalanina, esperando que esta mutación afecte negativamente la unión de centros Fe/S no así su actividad redox, tal como ocurre con la 2CGrx2 de *T. brucei*.

4.2.2 Expresión y purificación de la Tb 2CGrx1 R53F

El mutante R53F Tb2CGrx1 se generó por técnica de mutagénesis sitio dirigida utilizando como templado la secuencia de la forma salvaje de la proteína y oligonucleótidos conteniendo la secuencia mutada. La incorporación de la mutación se confirmó mediante secuenciación de la doble hebra de la construcción de ADN y la proteína fue expresada en *E. coli* BL21 DE3 como fusión a la Trx de *E. coli* la cual fue removida por clivaje con la proteasa TEV. La proteína en su versión WT y R53F fue purificada mediante dos pasos sucesivos de IMAC, el segundo posterior a la proteólisis con TEV que permitió recuperar la versión no etiquetada de la Tb2CGrx1 en el material unido mientras que las versiones con His-tag de la proteína de fusión y la TEV permanecieron unidas a la resina de His-Trap, y uno final por gel filtración sobre resina Sephadex G75 (ver sección 3.3.2 por detalles sobre la expresión y purificación; Fig. 38). Las proteínas se obtuvieron con una pureza superior al 90% y un rendimiento de 4 mg por litro de medio de cultivo. Sobre las muestras de Tb2CGrx1 WT y R53F purificadas se realizaron ensayos bioquímicos para determinar actividad redox (ensayo de reducción de insulina) y presencia/estabilidad de centro Fe/S (análisis espectrofotométrico).

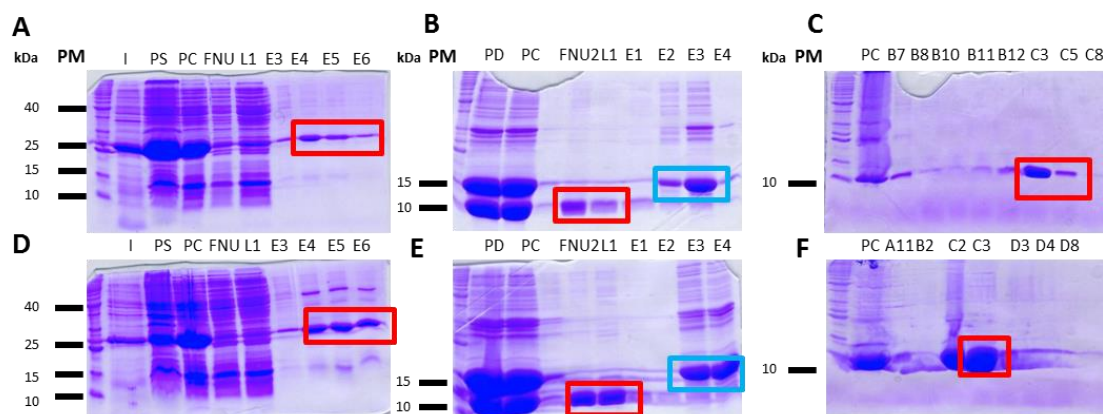


Figura 38. Análisis de la purificación de Tb2CGrx1 salvaje y mutante R53F. Análisis por SDS-PAGE al 15% y 17% de diferentes muestras correspondientes a la purificación de la forma recombinante de Tb2CGrx1 WT y R53F. **(A)** y **(D)** corresponden a distintas fracciones de la primera IMAC (gel 15%) para Tb2CGrx1 WT y R53F, respectivamente. **(B)** y **(E)** corresponden a distintas fracciones de la segunda IMAC (tras proteólisis con la proteasa TEV, gel 15%) para Tb2CGrx1 WT y R53F, respectivamente. En el recuadro celeste se puede apreciar a la proteína de fusión, EcTrx, eluida de la columna con 200 mM imidazol. **(C)** y **(F)** corresponden a distintas fracciones de la cromatografía de exclusión molecular (SEC, gel 17%) para Tb2CGrx1 WT y R53F, respectivamente. Se marcan con recuadros rojos las fracciones conteniendo a la proteína de interés que fue empleada en los sucesivos pasos de purificación y en su caracterización bioquímica. I: fracción de bacterias inducidas; PS: post sonicado; PC: precolumna; FNU: fracción no unida; L1: lavado 1; E1-E6: eluido 1 a 6, correspondiente a cada cromatografía; Ax-Dx: fracciones de elución de la columna de SEC.

4.2.3 Caracterización bioquímica de la proteína Tb2CGrx1 R53F

4.2.3.1 Actividad reductora de insulina

Dado que la pérdida de actividad redox en el mutante R53F no nos permitiría seguir adelante con la generación de un biosensor redox adecuado para la complejidad del sistema redox de estos organismos, en primer lugar se evaluó la actividad oxidorreductasa de este mutante mediante el ensayo de reducción de insulina. En este ensayo la reducción del disulfuro que une las cadenas α y β de la insulina conlleva a la agregación de la última lo cual se evidencia por un aumento en la turbidez del medio medida a 620 nm. La inespecificidad de este ensayo es a la vez su mayor desventaja y su mayor virtud. El hecho de no ser específico permite que pueda utilizarse para comparar de manera global la actividad redox de enzimas que a nivel fisiológico pueden tener especificidad por sustrato(s) totalmente diferente. Como datos importantes debe prestarse atención a la fase *lag*, previa a la aparición de turbidez, y a las pendientes de cada curva. En este ensayo se utilizaron las apo-formas (sin complejo Fe/S) de ambas proteínas, lo cual fue confirmado por espectrofotometría (ausencia de pico a absorción a 420 nm). En la Figura 39 se muestran las curvas de agregación (reducción) de insulina obtenidas para la Tb2CGrx1 salvaje y mutante R53F y el respectivo control con Trx de *E. coli*. Como puede apreciarse, ensayadas a una misma concentración (40 μ M) tanto la forma WT como la mutante de la Tb2CGrx1 presentan actividad reductora de insulina casi idéntica. En este tipo de ensayo la actividad redox de la Tb2CGrx1 es significativamente inferior a la mostrada por la Trx de *E. coli*, lo cual se explica porque el mecanismo que opera en la reducción del disulfuro intermolecular de la insulina es ditiólico. Tal como se mencionó anteriormente, mientras las Trx están especializadas en catalizar reacciones de oxidoreducción empleando ambos tioles del sitio activo, las Grx lo emplean como un mecanismo secundario y poco eficiente ya que las mismas están diseñadas para operar por un mecanismo monotiólico y empleando GSH como sustrato reductor (Deponte, 2013), como lo verificamos en los ensayos de reducción de la roGFP2 (Fig. 34). Estos resultados confirman que la mutación en la posición R53 no afecta la actividad reductasa de esta proteína. No obstante, como se menciona más adelante, la caracterización redox de esta mutante debería ser completada con ensayos de HEDS (actividad reductora del disulfuro de β -mercaptoetanol en presencia de GSH) y/o de reducción de roGFP2 en presencia de GSH.

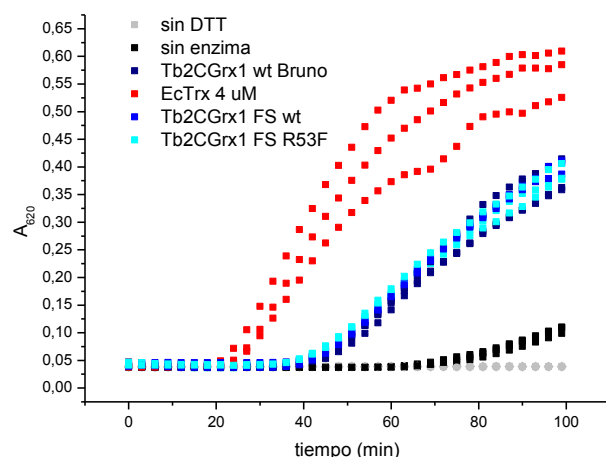


Figura 39. Ensayo de reducción de la insulina. La actividad reductora de insulina (130 µM) por parte de Tb2CGrx1 salvaje (wt) y mutante R53F (40 µM cada una) se midió de manera indirecta monitoreando el incremento de turbidez a 620 nm (agregación de la cadena β) en un lector de placas. Todos los ensayos fueron realizados en presencia de DTT 1,5 mM y a una temperatura de 25 °C, incluyéndose como control positivo a la Trx1 de *E. coli* (EcTrx 4 µM). Como control adicional, se incluyó una muestra de Tb2CGrx1 wt recombinante previamente obtenida por el Dr. Bruno Manta.

4.2.3.2 Determinación de presencia y estabilidad centros ferrosulfurados en Tb2CGrx1 WT y R53F

Tal como se mencionó anteriormente, la unión de centros Fe/S por parte de la Tb2CGrx1 anula su actividad redox dado que la cisteína N-terminal del sitio activo se encuentra formando parte del complejo (Ceylan et al., 2010). A nivel fisiológico, la formación de dicho complejo depende en parte de la abundancia de centros ferrosulfurados a nivel citosólico, un interrogante aún no develado para tripanosomátidos, y del estado redox intracelular de la 2CGrx1 ya que el holo-complejo es destruido en condiciones oxidantes. Para independizarnos de estos factores y poder contar con un módulo Grx con sus cisteínas disponibles para transferir el estado redox de los pares GSH/GSSG y T(SH)₂/TS₂ al biosensor roGFP2 es que se planteó la generación de un mutante carente de capacidad para ensamblar centros Fe/S.

Una característica que distingue a las proteínas que unen centros ferrosulfurados del tipo 2Fe/2S es la presencia de picos de absorción a 320 y 420 nm (Berndt et al., 2007). El análisis espectrofotométrico reveló la presencia de ambos picos tanto para la versión WT como la mutante R53F de Tb2CGrx1 (Fig. X A y B), indicando que la forma recombinante de estas proteínas fue obtenida en su forma holo y que la coordinación del *cluster* fue en ambos casos lo suficientemente estable como para resistir los sucesivos pasos de purificación realizados en condiciones aeróbicas. Este resultado indica claramente que la R53 no juega un rol importante en la unión del centro ferrosulfurado en la Tb2CGrx1. Sin embargo la unión de este tipo de complejos por las Grx es sensible a la presencia de oxidantes (Lillig et al., 2005); (Mittra et al., 2009).

Con el fin de descartar o confirmar una función estabilizadora de la R53 en la unión del *cluster* Fe/S es que se llevó a cabo un ensayo de estabilidad de la holoforma de Tb2CGrx1 WT y R53F expuesta a un tratamiento con 5 mM de H₂O₂ durante 30 min (Fig. 40A y B).

Como se puede apreciar en la Fig. 40C, el oxidante produjo una leve pero sostenida conversión de la forma holo a la apo de ambas versiones de la Tb2CGrx1. Si bien a tiempo inicial (≤ 2 min) la cinética de desensamblaje del *cluster* parecería mayor en el mutante R53F que en la forma WT, inmediatamente se alcanza una tasa de destrucción del complejo muy similar para ambas proteínas. Estos resultados confirman que la R53 tampoco participa en la estabilización del centro Fe/S en condiciones de estrés oxidativo.

Debido a la incapacidad de generar una 2CGrx1 carente de actividad ligadora de centros ferrosulfurados es que decidimos no continuar adelante con esta estrategia. De todas formas los resultados obtenidos para el mutante R53F aportan al entendimiento de la relación estructura-función para Grx específicas de tripanosomátidos. Estudios futuros deberían incluir ensayos de actividad Grx dependiente de GSH de manera de completar la caracterización bioquímica de este mutante.

Como estrategia alternativa, no abordada en este trabajo de maestría, es que nos planteamos trabajar a futuro sobre la generación de un biosensor roGFP2 que contenga a la Tb2CGrx2 como módulo catalítico dado que esta proteína posee actividad redox dependiente de GSH y TSH₂ pero a diferencia de Tb2CGrx1 no es capaz de unir un centro Fe/S (Ceylan et al., 2010). Sin embargo, dado que esta proteína presenta una localización subcelular en el espacio intermembrana de *T. brucei* es que deberá realizarse un cuidadoso análisis de su secuencia para determinar la presencia de una señal de localización putativa en este compartimento ya que búsquedas en programas predictores no han logrado identificar la presencia de la misma (Ceylan et al., 2010).

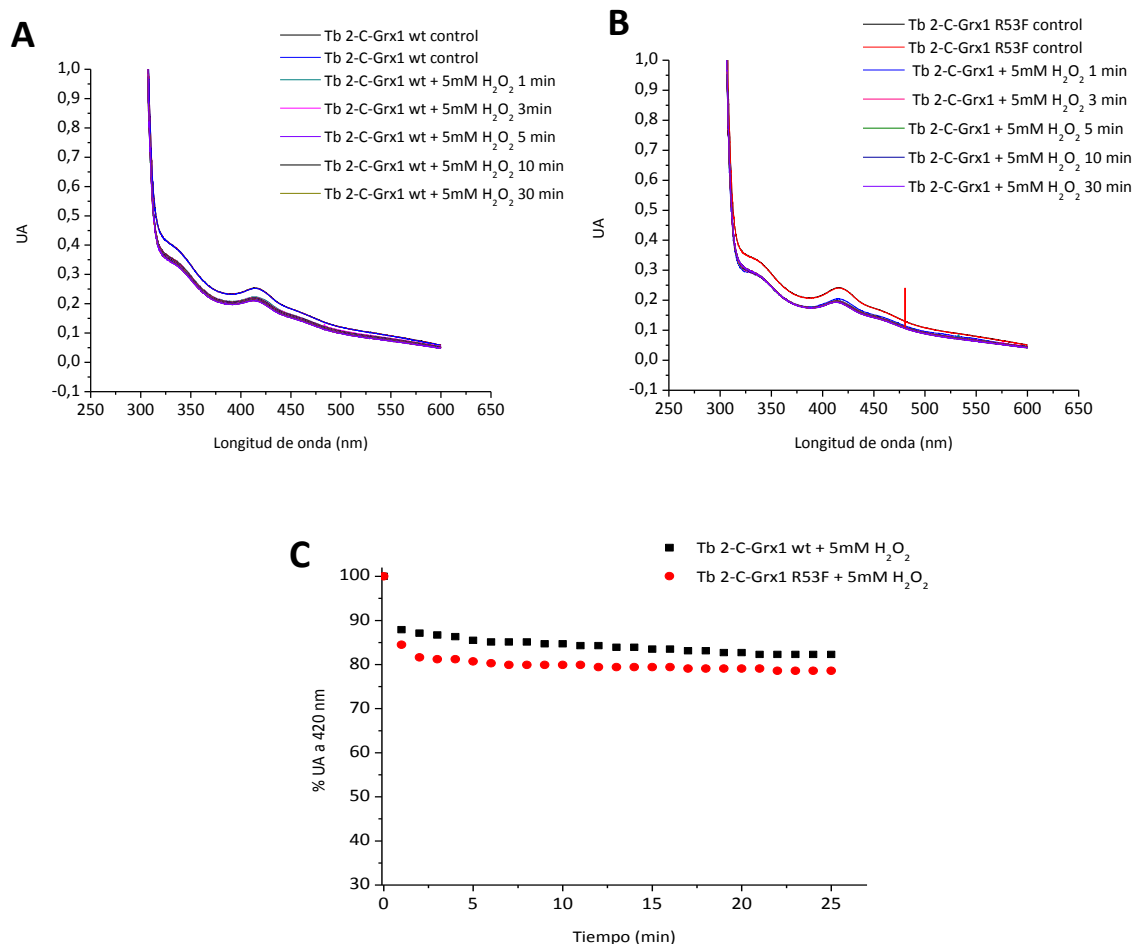


Figura 40. Espectro UV-visible de la Tb2CGrx1 salvaje y mutante R53F y ensayos de estabilidad del holo-complejo. Estos ensayos fueron realizados con iguales concentraciones de la proteína salvaje y el mutante R53F determinadas por el valor de absorción a 280 nm. El espectro UV-vis de estas proteínas se registra durante 30 min de incubación a 25°C y la estabilidad de la unión del *cluster* Fe/S es monitoreada luego del agregado de 5mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). **(A)** Ensayos correspondientes a la proteína salvaje y **(B)** mutante R53F. Los datos se grafican (para ambos casos) como unidad de absorción (UA) vs. longitud de onda (nm) a los diferentes tiempo de adquisición. **(C)** Comparación de la absorción relativa a 420 nm de la Tb2CGrx1 WT y R53F frente al agregado de H_2O_2 . Los valores se relativizan al 100% de absorción a tiempo 0 (no tratado) para cada una de las proteínas.

4.3 Generación de las líneas celulares de *T. b. brucei* y *T. cruzi* reporteras de cambios redox

4.3.1 Generación de la línea celular de la forma infectiva y salvaje de *T. brucei* que expresa el biosensor hGrx-roGFP2.

La forma infectiva de la cepa 427, línea celular 449 (que codifica una copia del gen de la proteína represora de tetraciclina), fue transfectada con el plásmido pH1700-hGrxroGFP2, el cual presenta, en el siguiente orden 5'-3': a) una secuencia de integración al locus de la secuencia de *splicing* del RNA ribosomal (spRRNA), b) una secuencia promotora de la expresión de la proteína de superficie prociclina 1 (EP1) seguida de un operón de tetraciclina que permite la expresión inducible del gen de interés (tOp), c) la secuencia codificante para hGrx-roGFP2, d) la secuencia no traducible 3'(3'UTR) de la actina de *T. brucei* y e) un casete de selección para el antibiótico higromicina (Hyg) (Fig. 41).

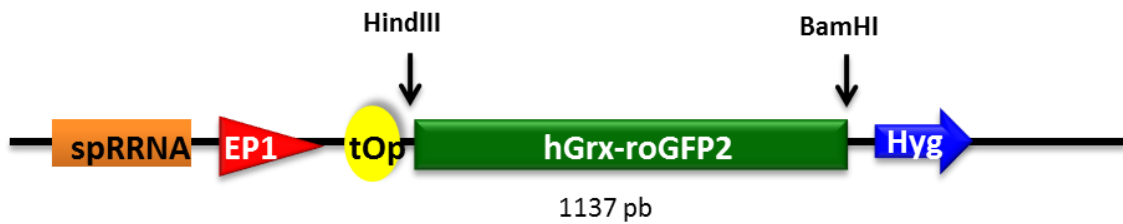


Figura 41. Esquema del clonado del gen hGrx-roGFP2 en el vector de expresión pHD1700 para *T. brucei*

Luego de la transfección por nucleofección (sistema Amaxa), clones individuales de parásitos transfectantes fueron seleccionados por el método de dilución límite y con higromicina, para forzar la integración de la secuencia del plásmido pHD1700-hGrx-roGFP2 al genoma de *T. brucei*. Se obtuvo un total de 14 clones en todos los cuales se evaluó la expresión de la proteína fluorescente roGFP2 por citometría de flujo (Fig 42.). Cada clon fue crecido durante 24 h en ausencia o presencia de 1 µg/mL de oxitetraciclina y las respectivas gráficas de intensidad de fluorescencia a $\lambda_{Ex/Em}$ 488/500-570 nm comparadas.

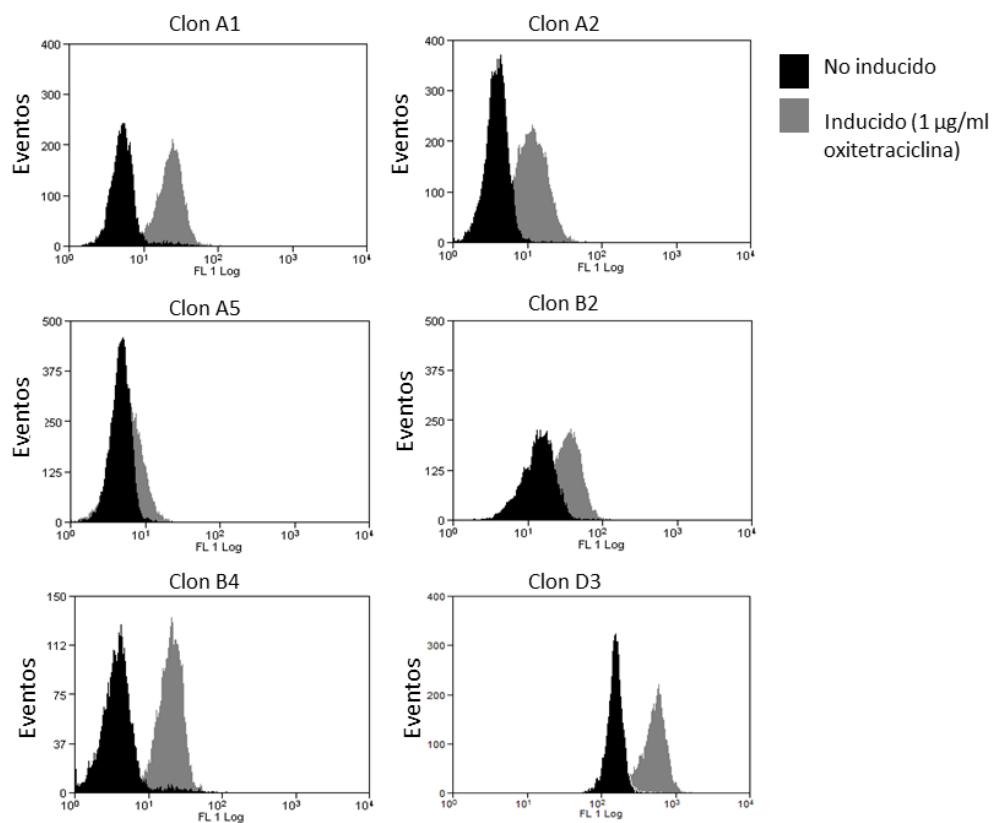


Figura 42. Análisis de la expresión de hGrx-roGFP2 en diferentes clones de la forma sanguínea de *T. brucei* (línea 449, cepa 427). Los datos corresponden a adquisiciones realizadas en citómetro de flujo CyanADP (Dako) para Ex/Em 488/500-570 nm y se grafican como histogramas del número de eventos celulares en función de la intensidad de fluorescencia (expresada en unidades logarítmicas) para cultivos no inducidos (negro) e inducidos (gris) con 1 µg/mL oxitetraciclina. En la figura se muestra solamente el análisis de 6 de los clones obtenidos a modo de representación de la caracterización realizada para los restantes 8 clones.

Excepto por el clon A5 (Fig. 42), el resto de los clones mostraron expresión del biosensor a niveles que estuvieron por debajo del Log_{10} de diferencia respecto del estado (basal) no inducido. En base a este análisis se seleccionaron clones que presentaban una *intensidad de fluorescencia en el estado inducido del doble respecto a la del estado no inducido*. Los clones A1, B4 y D3 (Fig. 42) cumplían con este requerimiento, siendo este último el empleado para completar la caracterización de la línea reportera transgénica de *T. brucei* (ver sección 4.4.2).

Se realizaron ensayos control con diferentes concentraciones de oxitetraciclina (0-5 $\mu\text{g/mL}$) (Fig 43), donde se observa que la baja expresión del biosensor no está causada por una deficiencia en la concentración del inductor del sistema sino que la limitante es el sistema de expresión en sí. El procedimiento para estos experimentos control fue similar a los realizados y ya explicados para la caracterización preliminar de los clones.

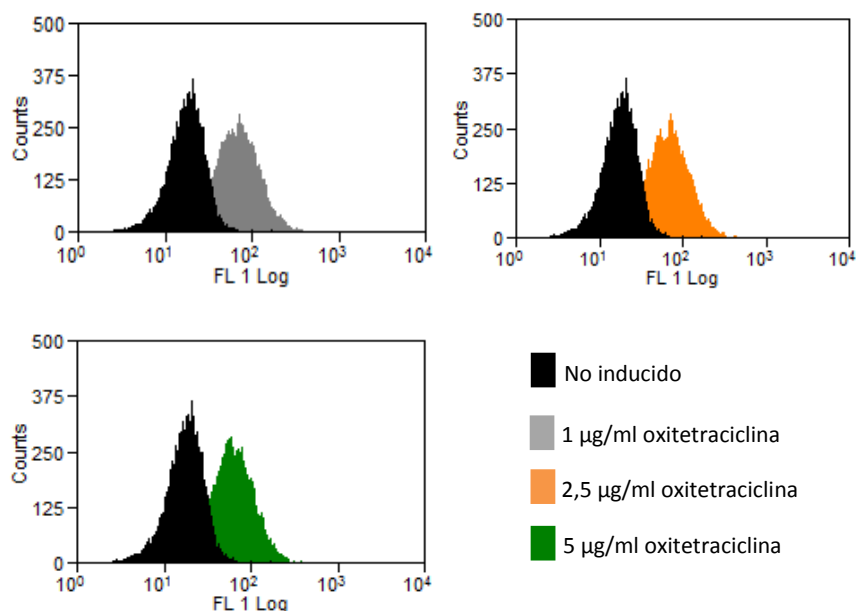


Figura 43. Análisis de la expresión de la hGrx-roGFP2 del clon D3 de la forma sanguínea de *T. brucei* (línea 449, cepa 427) frente a diferentes concentraciones de oxitetraciclina. Los datos corresponden a adquisiciones realizadas en citómetro de flujo CyanADP (Dako) para Ex/Em 488/500-570 nm y se grafican como histogramas del número de eventos celulares en función de la intensidad de fluorescencia (expresada en unidades logarítmicas) para cultivos no inducidos (negro) e inducidos por 24 h con 1 $\mu\text{g/mL}$ (gris), 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (naranja) y 5 $\mu\text{g/mL}$ (verde) de oxitetraciclina.

La baja intensidad de fluorescencia y/o expresión de este biosensor en *T. brucei* fue confirmada por análisis de células vivas y fijadas en el microscopio de epifluorescencia y confocal, donde no fue posible observar fluorescencia de GFP por encima de la señal de autofluorescencia de fondo (no mostrado).

4.3.2 Generación de *T. cruzi* cepa CL-Brener y cepa Adriana que expresa la hGrx-roGFP2

La forma no infectiva, epimastigota, de *T. cruzi* cepa CL-Brener y cepa Adriana que poseen integrado en su genoma una copia del gen de la proteína represora de tetraciclina (TeTR) con un casete de selección para el antibiótico neomicina (plásmido pLew13, Fig. 44A) fue transfectada con el plásmido pTcINDEX-hGrxroGFP2, el cual presenta, en el siguiente orden 5'-3': (a) secuencia de ADN para el ARN ribosomal no traducible (R-NTS/P) que media su integración al genoma de los parásitos, (b) un casete de selección para el antibiótico higromicina (Higro: gen de resistencia a higromicina) bajo el control de un promotor de fago T7 (pT7), (c) un pT7 que guía la expresión del gen de interés, (d) secuencia del operón de tetraciclina (tOp) que permite el control inducible de la expresión inducible del gen ectópico, (e) la secuencia codificante para hGrx-roGFP2, (f) la secuencia epítipo myc (Myc) y la secuencia del terminador de la transcripción (T) (Fig. 44B). El gen de interés fue insertado en el vector pTcINDEX pero previo a su transfección, la construcción debió ser linealizada con la enzima de restricción *SpeI* (Fig. 44B). El pTcINDEX presenta un único sitio de corte para esta endonucleasa que se ubica en la región media de la secuencia ribosomal no traducida (R-NTS/P), secuencias que luego direccionarán su integración al genoma del parásito por recombinación homóloga. El vector linealizado fue luego transfectado en parásitos de la línea *T. cruzi* CL-Brener pLew13 y Adriana pLew13 y su integración fue seleccionada por resistencia a higromicina.

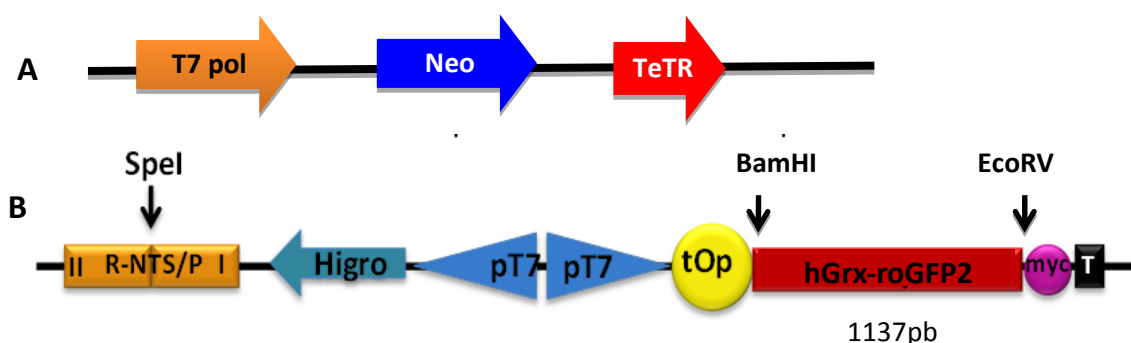


Figura 44. Esquema del clonado del gen hGrx-roGFP2 en el vector de expresión pTcINDEX para *T. cruzi*. (A) Esquema del plásmido pLew 13. (B) Esquema del vector pTcINDEX hGrx-roGFP2.

Debido a que este estadio de *T. cruzi* es incapaz de proliferar a densidades celulares bajas (ej. $<10^4$ células/mL) no fue posible llevar a cabo la selección clonal de líneas celulares y por lo tanto se trabajó con una población celular para la cual las condiciones de expresión del biosensor fueron optimizadas de manera tal de lograr una expresión homogénea y elevada del mismo (por ej. mediante ajuste de las concentraciones de antibióticos que controlan el sistema de expresión inducible). Para ello se evaluó la expresión de hGrx-roGFP2 en cultivos crecidos en presencia de 200 μ g/mL de gentamicina e higromicina (Fig. 45A y B) y 200 μ g/mL gentamicina con 300 μ g/mL higromicina (Figura 45C y D). La Fig. 45 muestra todas las condiciones evaluadas para la expresión de hGrx-roGFP2 en *T. cruzi* cepa

Adriana y donde se puede apreciar que las concentraciones óptimas de antibióticos que controlan la expresión del represor de tetraciclina y polimerasa de fago T7 resultaron ser 200 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina y 200 $\mu\text{g/ml}$ higromicina, respectivamente. Un gran porcentaje de células (Fig. 45B) presenta intensidades de fluorescencia 3 órdenes de magnitud superiores a las que se detectan en condiciones basales (no inducción, Fig. 45A) a diferencia de Fig. 45D donde la diferencia en la intensidad de fluorescencia entre la población no inducida y la inducida es de solo dos ordenes de magnitud.

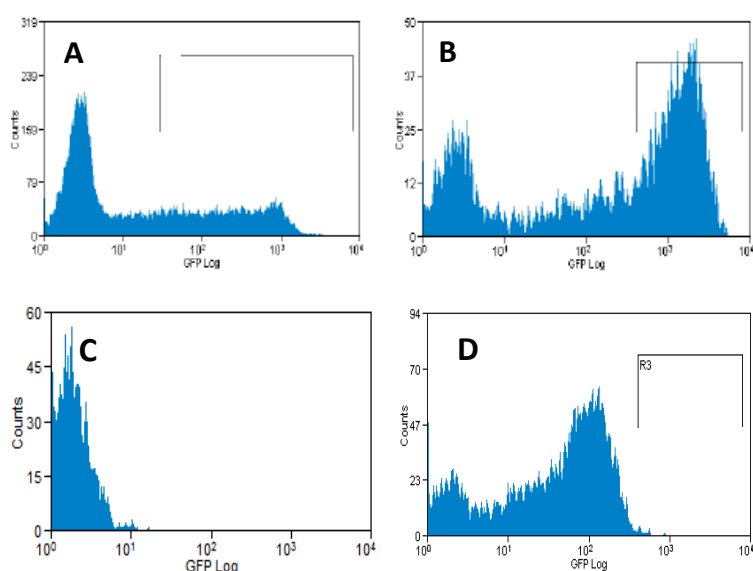


Figura 45. Expresión inducible de hGrx-roGFP2 en la forma no infectiva de *T. cruzi* cepa Adriana. Los datos corresponden a adquisiciones realizadas en citómetro de flujo Cyan-ADP (Dako) para Ex/Em 488/500-570nm y se grafican como histogramas del número de eventos celulares en función de la intensidad de fluorescencia (expresada en unidades logarítmicas) para cultivos crecidos en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina e higromicina no tratados (A) o tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$ tetraciclina (B) y para cultivos crecidos en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina y 300 $\mu\text{g/ml}$ higromicina no tratados (C) o tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$ tetraciclina (D).

La expresión del biosensor fue confirmada además por microscopía de epifluorescencia, donde se detecta una alta intensidad de fluorescencia proveniente del interior de parásitos inducidos con 1 $\mu\text{g/ml}$ tetraciclina (Fig. 46). Es de destacar que la intensidad de fluorescencia del biosensor expresado en parásitos *T. cruzi* alcanzó niveles al menos 100 veces superiores respecto a los observados para *T. brucei*, como se aprecia al comparar los histogramas para los estados inducidos (Fig. 45B y Fig. 43). Esta marcada diferencia entre una especie y otra de tripanosomátido posiblemente puede deberse a limitaciones y ventajas propias de cada sistema de expresión y/o a fenómenos epigenéticos de regulación de la expresión de secuencias exógenas. Con respecto al primero, el sistema pTcINDEX/pLew13 de *T. cruzi* asegura una expresión alta de la hGrx-roGFP2 ya que la transcripción está a cargo de un pT7 y la RNA polimerasa del fago T7, los cuales son reconocidos por ofrecer tasas altas de transcripción (Taylor et al., 2006).

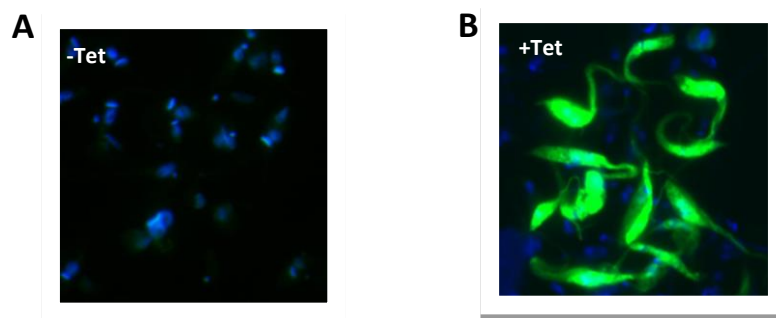


Figura 46. Expresión del biosensor hGrx-roGFP2 en epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Adriana). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 usando filtro de fluorescencia para λ_{ex} 360-370 nm / λ_{em} 420-460 nm para detección de la señal del DAPI y el filtro de fluorescencia para λ_{ex} para 470-495 nm / λ_{em} 510-550 nm para detección de la señal de la GFP. Se usó DAPI (azul) para la tinción del núcleo y kinetoplasto. Parásitos no inducidos (**A**) e inducidos con 1 μ g/mL tetraciclina (**B**).

En el caso del vector pH1700 de *T. brucei* la transcripción del gen ectópico está bajo el control de un promotor de EP1 y una RNA polimerasa I que presenta tasas transcripcionales significativamente inferiores a las del par promotor T7/RNAPol T7 (Wirtz et al., 1994). Teniendo esto en cuenta, en el futuro sería interesante explorar el sistema de expresión T7/RNAPol T7 de *T. brucei* con el fin de mejorar los niveles de expresión del biosensor redox.

Además de los diferentes niveles de expresión que puedan ofrecer los vectores de *T. brucei* y *T. cruzi*, otro aspecto distintivo entre ambos sistemas es la heterogeneidad en los niveles de intensidad de fluorescencia dentro de la misma población celular. Por ejemplo mientras que *T. brucei* mostró un comportamiento más uniforme con más del 90% de las células presentando niveles de intensidad de fluorescencia similares, los parásitos *T. cruzi* mostraron una distribución mucho más heterogénea con cerca del 60 % de las células mostrando niveles de fluorescencia elevados y similares ($>IF \ 6 \times 10^2$) mientras que el 40% restante se repartía entre células con nula intensidad de fluorescencia (20 %) y un rango de IF de $0-6 \times 10^2$. Una de las principales razones de estas diferencias puede deberse a la característica clonal de las líneas reporteras obtenidas para *T. brucei* mientras que en el caso de *T. cruzi* se trabajó con una población celular debido a la imposibilidad de seleccionar clones por métodos convencionales. Otra posibilidad para explicar este comportamiento radica en la robustez del sistema de expresión empleado, el cual se analiza en la sección 4.3.4.

La expresión del biosensor por la línea *T. cruzi* cepa CL-Brener también fue caracterizada por citometría de flujo (Fig. 47) y por microscopía (Fig. 48). Dado que ya se habían establecido condiciones óptimas de expresión del biosensor para parásitos de la cepa Adriana, se optó por trabajar con idénticas concentraciones de antibióticos de selección (200 μ g/ml gentamicina e higromicina) para la línea reportera de la cepa CL-Brener. A diferencia de lo observado en condiciones de no inducción para la línea redox reportera de la cepa Adriana, los parásitos transgénicos CL-Brener mostraron la presencia de dos poblaciones celulares una de ellas minoritaria y con intensidad de fluorescencia nula ($\log_{10} IF \leq 1$) y otra mayoritaria que emite fluorescencia en el rango de IF $\log_{10} 1-3$ con un máximo próximo a $\log_{10} 2$ (Fig. 47A). Esto estaría indicando que el sistema de represión de

la expresión del transgen no es lo suficientemente robusto, promoviendo una transcripción basal baja del gen de la hGrx-roGFP2. Esto fue verificado por análisis de imágenes de microscopia de epifluorescencia de cultivos no inducidos que mostraron parásitos con señal de GFP (Fig. 48).

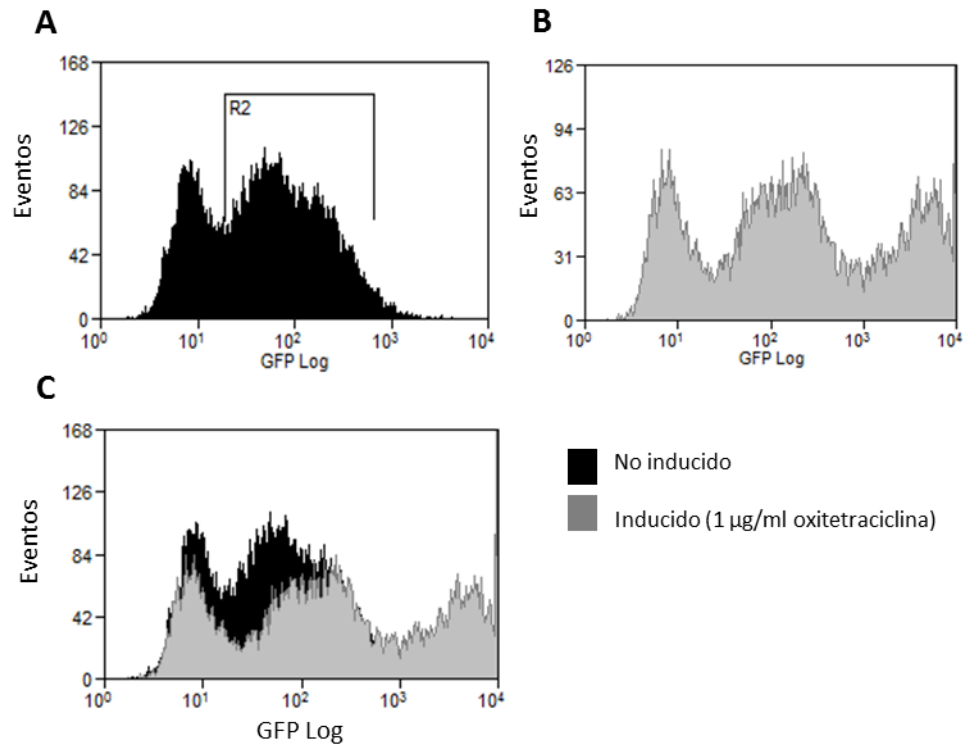


Figura 47. Expresión inducible de hGrx-roGFP2 en la forma no infectiva de *T. cruzi* cepa CL-Brener. Los datos corresponden a adquisiciones realizadas en citómetro de flujo Cyan-ADP (Dako) para $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ 488/500-570nm y se grafican como histogramas del número de eventos celulares en función de la intensidad de fluorescencia (expresada en unidades logarítmicas) para cultivos crecidos en presencia de 200 µg/mL gentamicina e higromicina no tratados (A) o tratados con 1 µg/mL tetraciclina (B). Se grafica la superposición de ambos histogramas (C).

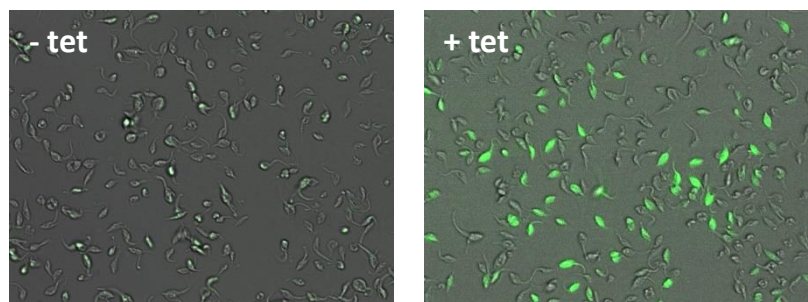


Figura 48. Expresión del biosensor hGrx-roGFP2 en epimastigotas de *T. cruzi* (cepa CL-Brener). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 usando filtro de fluorescencia de $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ 470-495 nm / 510-550 nm para la detección de la señal de la GFP.

No obstante, se pudo observar que el agregado de inductor produjo la aparición de una nueva población celular con una elevada IF (con un máximo de intensidad ligeramente inferior a $\text{Log}_{10} 4$) y otra mayoritaria con un máximo de IF ligeramente superior a $\text{Log}_{10} 2$. Una población minoritaria de estos cultivos fue refractaria a la inducción mostrando niveles de $\text{IF} \leq \text{Log}_{10} 1$ (Fig. 47B y C). Comparando con los resultados obtenidos para la cepa Adriana podemos concluir que la línea reportera generada sobre la cepa CL-Brener presenta una mayor heterogeneidad en cuanto a la expresión del biosensor, incluyendo una baja represión de la expresión del biosensor hasta niveles de IF (o expresión) un orden de magnitud superiores a los de la primera.

4.3.3 Generación de la línea celular que expresa la hGrx-roGFP2 en la forma infectiva y *knock-out* para la enzima 2CGrx1 de *T. brucei*.

La forma infectiva de *T. brucei* KO para la 2CGrx1 fue generada como se describe en Musunda y col. (Musunda et al., 2015). Tal como fue reportado recientemente, la 2CGrx1 no es una proteína indispensable para la forma infectiva del parásito y su ausencia solo confiere termotolerancia y una menor capacidad de reducir disulfuros mixtos entre glutatión y cisteínas de proteínas (Musunda et al., 2015). El clon 1 fue transfectado por nucleofección (sistema Amaxa) con el plásmido pHD1700-hGrx-roGFP2 y los transfectantes seleccionados con higromicina por dilución límite.

Luego del proceso de selección se lograron recuperar 16 clones resistentes a la higromicina los cuales fueron evaluados por citometría de flujo para determinar los niveles de expresión del biosensor al cabo de 24 h de inducción con 1 $\mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina.

En la Fig. 49 se muestra un experimento representativo para 6 del total de 16 clones. Los histogramas de eventos vs. intensidad de fluorescencia de la GFP muestran que solo uno de estos 6 clones, el C5, presentó una señal de fluorescencia en el estado inducido que duplicó a la determinada en el estado basal. En el resto de los clones esta diferencia fue marginal debido, probablemente a los bajos niveles de expresión del biosensor. Como se muestra más adelante, varios de estos clones fueron caracterizados en su respuesta a diferentes estímulos redox (ver sección 4.4.2).

Si bien las técnicas basadas en detección de fluorescencia permiten evaluar la funcionalidad de la proteína fluorescente que forma parte del biosensor, una intensidad de fluorescencia baja no necesariamente se debe a niveles de expresión bajos sino que podría tener su origen en problemas de plegamiento y/o proteólisis de la GFP o bien por inactivación del cromóforo (*quenching* o conformación estructural inadecuada). En la sección siguiente se muestran resultados de análisis de expresión de hGrx-roGFP2 por *Western blot* que permiten determinar, en gran medida, la causa de la baja intensidad de fluorescencia observada para las líneas celulares reporteras generadas en *T. brucei* WT y KO 2CGrx1.

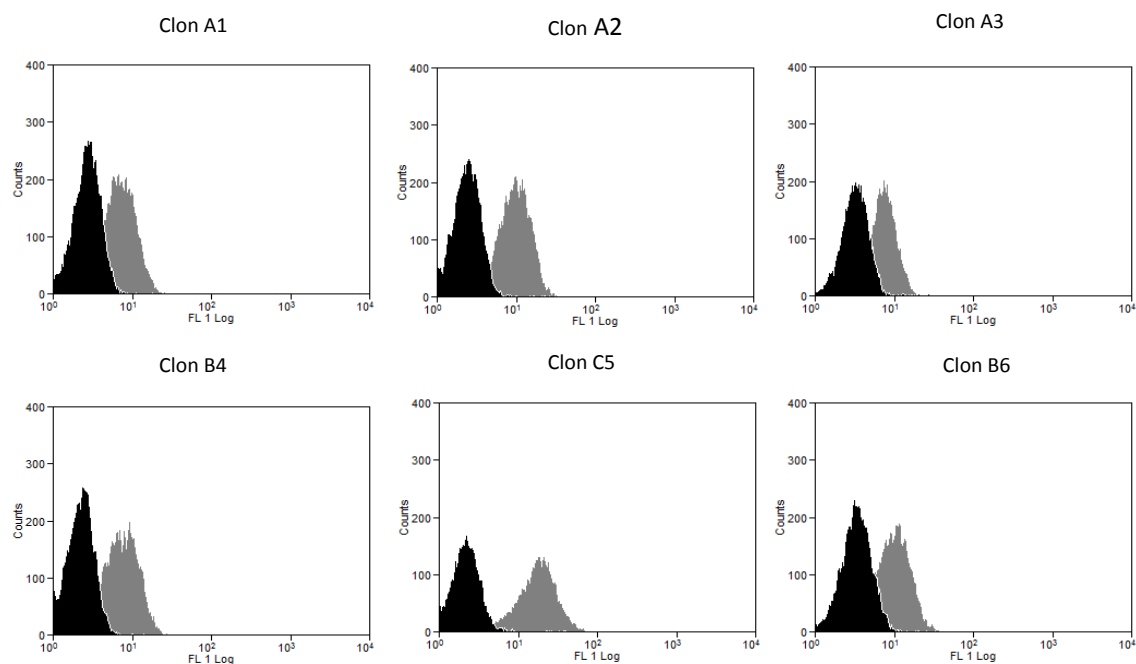


Figura 49. Análisis de la expresión hGrx-roGFP2 en la línea celular KO para Tb2CGrx1 correspondiente a la forma infectiva de *T. brucei*. Análisis representativo de 6 clones empleando un citómetro de flujo CyanADP (Dako) y par láser/filtro de λ_{ex} / λ_{em} 488nm/500-570 nm. Se muestran histogramas del número de eventos celulares en función de la intensidad de fluorescencia (expresada en unidades Log_{10}) para cultivos no inducidos (negro) e inducidos (gris) con 1 µg/ml tetraciclina durante 24 h.

4.3.4 Análisis de la expresión de hGrx-roGFP2 en líneas transgénicas de tripanosomas

Los niveles de expresión de la hGrx-roGFP2 en clones de las líneas celulares reporteras de *T. brucei* y *T. cruzi* fueron estudiados mediante ensayos de *Western blot* que emplearon un anticuerpo anti-GFP conjugado a peroxidasa de rábano (Life Sciences, Invitrogen). En extractos de parásitos correspondientes a las líneas reporteras de *T. brucei* WT y KO 2CGrx1 inducidas con tetraciclina se logra identificar una banda con un peso molecular aproximado de 40 kDa (Fig. 50 TbGFP +, TbKO +) y cercano al valor teórico de la fusión hGrx-roGFP2 (41 kDa). La forma recombinante del biosensor purificado de *E. coli* presentó una movilidad electroforética similar al de la banda en cuestión (Fig. 50 Ctrl) lo cual nos permite confirmar la identidad de esta última. Por otro lado, esta banda no se logra detectar, o bien su nivel es muy bajo, en extractos de parásitos correspondientes a las mismas líneas celulares que no fueron tratadas con tetraciclina (Fig. 50 TbGFP -, TbKO -). En el frente de corrida de las muestras de *T. brucei* se puede apreciar una banda que corresponde a la proteína TXN, la cual se utilizó como control de carga (ver sección 3.7).

En el caso de las muestras correspondientes a la línea celular de *T. cruzi* (Fig. 52; CLB – y CLB +), se logra detectar una banda intensa que se corresponde en peso molecular con la hGrx-roGFP2 recombinante (Fig. 52 Ctrl). Si bien en la condición inducida el anticuerpo logra reconocer una mayor cantidad de la GFP que en el extracto correspondiente a parásitos no inducidos, los altos niveles de expresión en este último indican que el sistema es deficiente en la represión de la expresión del biosensor, tal como lo indicaban los

resultados de citometría de flujo (Fig. 47) y microscopía de epifluorescencia (Fig. 48). La expresión no uniforme de la hGrx-roGFP2 en *T. cruzi* solo permite realizar una aproximación, y no una estimación precisa, al contenido intracelular de esta proteína. Mediante análisis densitométrico con asistencia del programa ImageJ se cuantificaron las bandas de hGrx-roGFP2, y se transformaron en valores de concentración intracelular tomando como referencia la señal detectada para distintas concentraciones de hGrx-roGFP2 presentes en la misma membrana, el peso molecular del biosensor (41 kDa), y el dato de los volúmenes celulares reportados para el estadio epimastigota y la forma sanguínea de *T. brucei* (R. L. Krauth-Siegel et al., 2008).

Con estos datos se estimó que la cantidad de biosensor presente en muestras de extractos de 5×10^6 parásitos *T. cruzi* CL Brener inducidos es de aproximadamente 12 ng, lo cual equivale a una concentración intracelular de $\sim 1 \mu\text{M}$ (el volumen celular de la forma epimastigotes de *T. cruzi* es de 30 fL) y cerca de un 40% menos en los no inducidos. Vale la pena destacar que estos valores representan solo un promedio del contenido intracelular del biosensor en la población celular ya que mostramos anteriormente que la expresión del biosensor no es en absoluto homogénea entre las células.

El correspondiente análisis de densitometría aplicado a la banda de hGrx-roGFP2 presente en los extractos de las líneas reporteras de *T. brucei* WT y KO 2CGrx1 inducidos (Fig. 50 Tb GFP + y Tb KO +) con tetraciclina indica que el nivel de proteína es 10 veces inferior al detectado en la línea reportera de *T. cruzi* sin inducir (CLB -). Por lo tanto, considerando un volumen celular de 58 fL para la forma infectiva de *T. brucei* podemos estimar que la concentración intracelular del biosensor es al menos de 172 nM en la línea WT y 215 nM en la línea KO 2CGrx1. Estas diferencias en los niveles de expresión del biosensor en *T. brucei* y *T. cruzi* se encuentran en el mismo orden de magnitud que las obtenidas para las lecturas de intensidad de fluorescencia realizadas por citometría de flujo (sección 4.3.1 y 4.3.2, Fig. 42 y 45B, respectivamente). Si bien estos resultados nos llevan a concluir que los sistemas de expresión empleados para cada especie de tripanosoma serían los responsables de estas diferencias, no podemos descartar que factores adicionales, incluyendo mecanismos de regulación epigenético, post-transcripcionales y/o codones de traducción no óptimos, contribuyan también a los bajos niveles de expresión del biosensor en *T. brucei*. Esta consideración se hace ya que este mismo sistema de expresión ha rendido niveles de expresión altos de diferentes proteínas de *T. brucei* u otros organismos (Comini et al., 2008); (Manta et al., 2013), (Alibu et al., 2006), (Voncken et al., 2003).

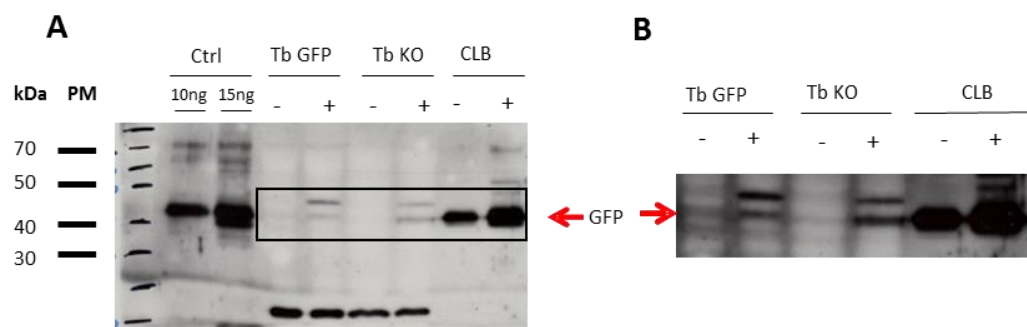


Figura 50. Nivel de expresión de hGrx-roGFP2 en las líneas celulares de *T. brucei* y *T. cruzi*. (A) Western-blot a partir de extractos solubles de 5×10^6 (CLB) y 1×10^7 (Tb GFP y Tb KO) células/carril de cultivos no inducidos (-) o inducidos (+) con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oxitetraciclina por 24 h. A la izquierda se incluyó la hGrx-roGFP2 recombinante a diferentes concentraciones (Ctrl). Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-GFP conjugado a HRP (Life Sciences) en una dilución de 1/1000 y la detección de TXN como referencia de carga (anticuerpo de conejo anti-TXN 1/10000). (B) Ampliación de la región de la membrana recuadrada en A. Con flecha roja se indica la banda correspondiente a la hGrx-roGFP2 (aproximadamente 40kDa). Tb GFP, Tb KO y CLB, refieren a muestras de las líneas redox reporteras generadas sobre *T. brucei* WT, *T. brucei* KO 2CGrx1 y *T. cruzi* CL-Brener, respectivamente.

Para profundizar en la caracterización fenotípica de estas líneas reporteras se determinó la expresión de la hGrx-roGFP2 en parásitos *T. brucei* WT sometidos a un régimen de cultivo continuo (96 h). Durante la curva de crecimiento se observa una disminución progresiva de la intensidad de fluorescencia del biosensor (Fig. 51B) que alcanza un mínimo (40% respecto a las primeras 24 h, fase de crecimiento exponencial) en la fase estacionaria del crecimiento (72 h). En principio, dicha caída en la intensidad de fluorescencia no pudo asociarse con una menor expresión del biosensor ya que las imágenes de *W. blot* muestran niveles de hGrx-roGFP2 similares o superiores a los observados a las 24 h de iniciar el experimento de inducción (Fig. 51A).

Para determinar si este efecto es debido a un fenómeno redox las muestras de cultivo fueron tratadas con DTT 5 mM durante 5 min y las células analizadas por citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 51B (barras negras) el tratamiento con el agente reductor incrementó un 15% y 7% la intensidad de fluorescencia del biosensor en muestras correspondientes a cultivos de 24 y 48 h, respectivamente, no así en células en fase estacionaria de crecimiento (72 h). Esta reversión del estado redox del biosensor estaría sugiriendo que las células en fase de crecimiento exponencial presentan un mayor estado oxidado. Por otro lado, estos resultados muestran claramente que la marcada caída en la intensidad de fluorescencia de la hGrx-roGFP2 para las 48 y 72 h no guarda relación directa con los fenómenos redox y que por lo tanto gran parte de la misma debería atribuirse a otras causas, por el momento desconocidas.

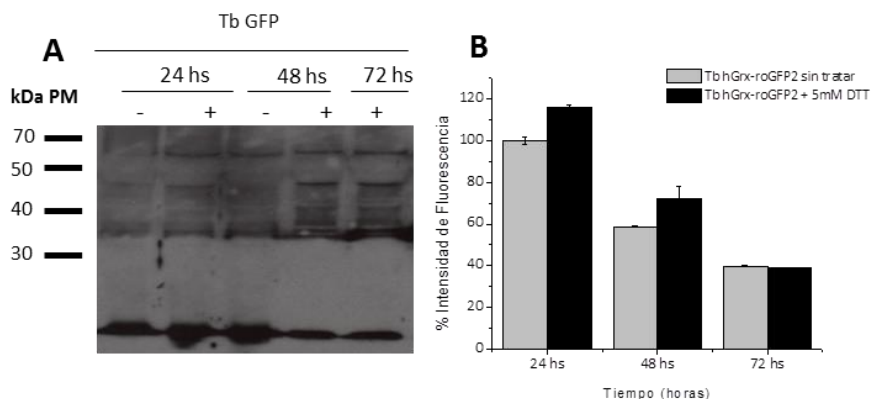


Figura 51. Análisis de expresión de hGrx-roGFP2 en *T. brucei* WT. (A) Western blot correspondiente a extractos totales de 1×10^7 parásitos/carril de cultivos de la línea reportera redox de la cepa WT no inducida (-) o inducida (+) a diferentes tiempos con 1 µg/mL oxitetraciclina. PM: marcador de peso molecular. La hGrx-roGFP2 fue detectada con el anticuerpo de conejo anti-GFP conjugado a HRP (dilución 1/1000). Se usó como referencia de carga la TXN detectada con un anticuerpo de conejo específico (dilución 1/10000). (B) Los datos corresponden a adquisiciones realizadas en citómetro de flujo Accuri C6 (BD) para $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ de 488nm/500-560 nm y se grafican como porcentaje de intensidad de fluorescencia normalizada al valor de IF de la muestra sin tratar de 24 h. El tratamiento con DTT 5 mM se extendió durante 5 min previos al análisis de las muestras. Cada 24 h, se determinó la densidad celular de los cultivos agregando oxitetraciclina (1 µg/mL) fresca al medio. Los resultados corresponden a ensayos triplicados, donde los valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar.

A diferencia de lo observado para las líneas reporteras de *T. brucei* (Fig. 50 y 51), comprobamos que el nivel de expresión del biosensor en la línea celular de *T. cruzi* cepa CL Brener incrementa de manera proporcional al tiempo de inducción (Fig. 52). A partir del análisis de densitometría determinamos que la cantidad de hGrx-roGFP2 aumenta 1,5, 1,75 y 2 veces para el día 1, 2 y 4 de inducción, respectivamente, respecto al contenido en estado basal (no inducción, Fig 52 Día 1 -). No se observó que la sobreexpresión de la hGrx-roGFP2 afectara la tasa de crecimiento de la línea reportera respecto de la condición no inducida o cepa parental, siendo el valor del tiempo de duplicación de 5 h 40 min y 5 h 38 min, respectivamente (Figura 52C).

En el caso de la cepa Adriana, es notoria la pérdida del control de la expresión de la hGrx-roGFP2, ya que para muestras no inducidas se detectan niveles elevados del biosensor, que corresponden a 9 ng de proteína al realizar el cálculo por densitometría con el control de la proteína recombinante. Con el agregado de tetraciclina se produce un incremento de al menos 1,5 veces en el contenido del biosensor. En términos generales los niveles máximos de expresión del biosensor para 24 h de inducción son similares en ambas cepas (concentración intracelular estimada de hGrx-roGFP2 de 2,5 µM vs. 3 µM para la cepa CL-Brener y Adriana, respectivamente).

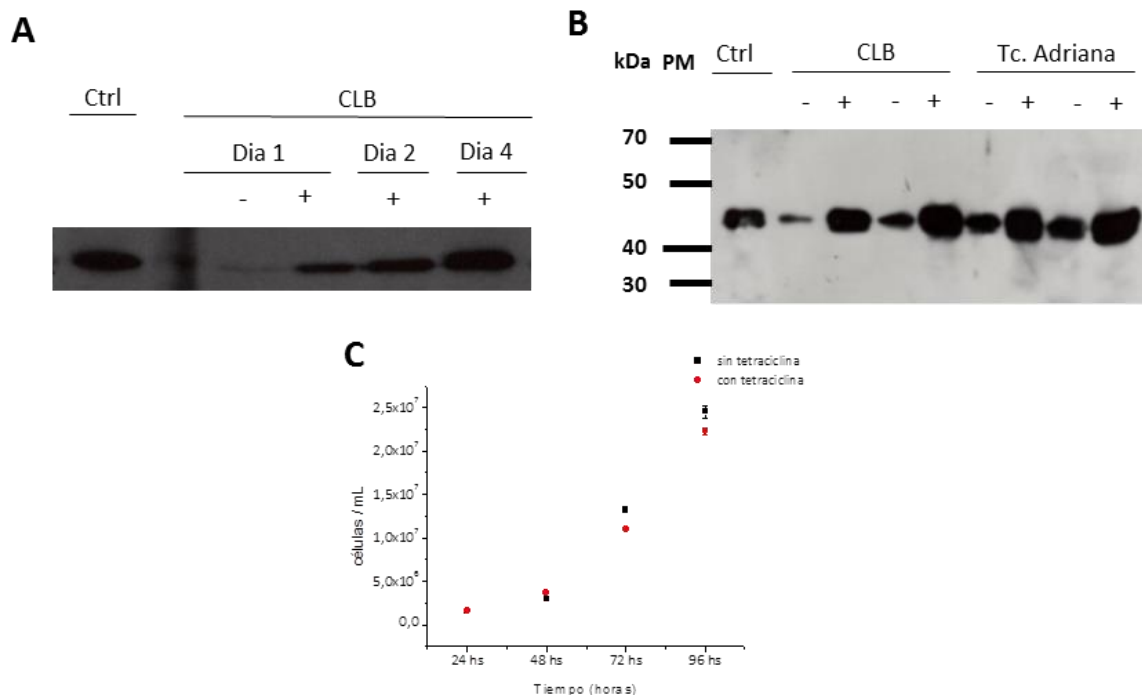


Figura 52. Análisis de expresión de hGrx-roGFP2 en diferentes líneas reporteras de *T. cruzi*. Extractos totales de parásitos de las líneas reporteras redox de *T. cruzi* fueron separados por SDS-PAGE al 15% y el biosensor detectado por *W. blot* con el anticuerpo de conejo anti-GFP conjugado a HRP (dilución 1/1000). Como control se cargaron 10 ng de hGrx-roGFP2 recombinante (Ctrl). **(A)** *W. blot* correspondiente a extractos totales de 5×10^6 (par de carriles de la izquierda) y 1×10^7 parásitos/carril (par de carriles de la derecha) de cultivos no inducidos (-) o inducidos (+) con 1 $\mu\text{g/mL}$ tetraciclina. PM: marcador de peso molecular. **(B)** *W. blot* correspondiente a extractos totales de 5×10^6 (par de carriles de la izquierda) y 1×10^7 parásitos/carril (par de carriles de la derecha) de cultivos no inducidos (-) o inducidos (+) con 1 $\mu\text{g/mL}$ tetraciclina. **(C)** Curvas de crecimiento continuo, donde se grafica la densidad celular (parásitos/mL) en función de los días. Parásitos de la línea *T. cruzi* CL Brener hGrx-roGFP2 fueron sembrados inicialmente a una densidad de 5×10^5 parásitos/mL y cultivados durante un total de 4 días sin (-tet) o con (+ tet) 1 $\mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina. Cada 24 h se realizó el recuento celular y el agregado de oxitetraciclina fresca al cultivo + tet.

Los resultados más destacados de esta caracterización preliminar de las líneas reporteras permitieron determinar que es posible obtener líneas reporteras estables de *T. brucei* y *T. cruzi* capaces de expresar el biosensor redox hGrx-roGFP2, aunque con diferencias notorias en cuanto a los niveles de expresión alcanzados en cada caso y la robustez de los sistemas en el estado no inducido. En las siguientes secciones se profundizó en la caracterización de estas herramientas biológicas.

4.4 Validación biológica de las líneas reporteras de cambios redox de *T. b. brucei* y *T. cruzi*

4.4.1 Caracterización de la línea celular sanguínea de *T. brucei* hGrx-roGFP2

Como parte de la caracterización fenotípica de la línea reportera de *T. brucei* hGrx-roGFP2, en primer lugar se evaluó si la expresión del biosensor afecta el crecimiento de los parásitos y se realizaron estudios dosis/respuesta para diferentes concentraciones de oxitetraciclina. Para el clon B4 se observa que parásitos inducidos con oxitetraciclina presentan una tasa de crecimiento ligeramente inferior respecto al control no inducido

(Fig. 53A), la cual no es estadísticamente significativa ($p < 0,182$), y que la expresión del biosensor no es dosis-dependiente con respecto al inductor en el rango de concentraciones aquí ensayados (1-5 $\mu\text{g/mL}$), siendo la concentración óptima de oxitetraciclina de 1 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 53B).

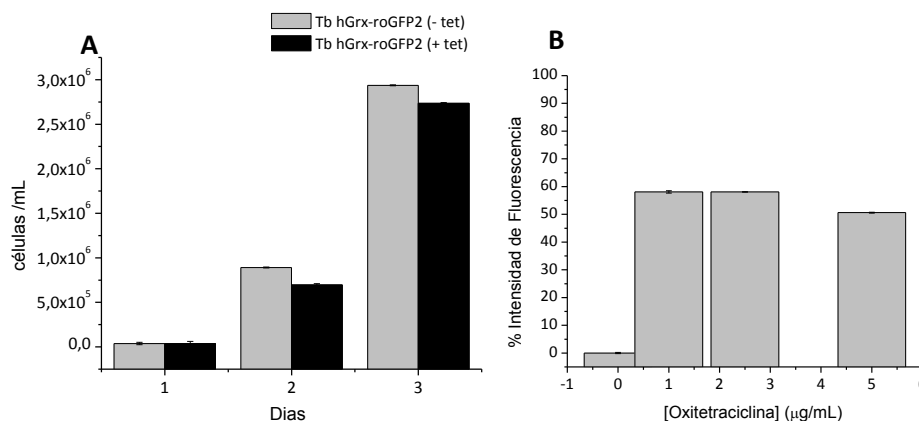


Figura 53. Caracterización fenotípica de la línea reportera *T. brucei* WT hGrx-roGFP2. (A) Curvas de crecimiento continuo, donde se grafica la densidad celular (parásitos/mL) en función de los días. Parásitos de la línea *T. brucei* WT hGrx-roGFP2 fueron sembrados inicialmente a una densidad de 1×10^4 parásitos/mL y cultivados durante un total de 3 días en ausencia (-tet) o en presencia (+ tet) de 1 $\mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina. Cada 24 h se realizó el recuento celular y el agregado de oxitetraciclina fresca al cultivo + tet. El tiempo de duplicación es de 3.5 hs y 3 hs para la línea -tet y la línea +tet, respectivamente. (B) Evaluación de la expresión del biosensor a diferentes concentraciones de inductor. Las células fueron inducidas con 0, 1, 2,5 y 5 $\mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina por 24 h y 1×10^6 eventos/muestra fueron analizados por citometría de flujo (CyAn ADP, Dako) empleando $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 488/500-570$ nm. Los valores se expresan como unidad porcentual de la intensidad de fluorescencia relativa a células no tratadas.

Por otro lado se evaluó la respuesta de dos de los clones de la línea *T. brucei* hGrx-roGFP2 (clon B4 y D3) a diferentes estímulos redox. Los parásitos fueron expuestos a H_2O_2 1mM, *tert*-butilo 1mM o DTT 5mM durante 10 min, y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (Fig. 54). Los tratamientos con ambos oxidantes produjeron un descenso en la intensidad de fluorescencia del biosensor que fue similar para ambos clones aunque mucho más marcado para el hidropéroxido orgánico (35% y 45% para el clon B4 y D3, respectivamente) respecto del peróxido de hidrógeno (20% y 15% para el clon B4 y D3, respectivamente). Para ambos clones y oxidantes la oxidación sufrida por el biosensor fue estadísticamente significativa ($p < 0,0050$ para el *tert*-butilo y $p < 0,011$ para el peróxido de hidrógeno) con respecto a su estado en la condición de no tratamiento. Vale la pena recordar que ninguno de estos hidropéroxidos fue capaz de oxidar *in vitro* y de manera apreciable al biosensor (Fig. 28 y Hanson et al., 2004; Gutscher et al., 2008), lo cual indica que el tratamiento con estos oxidantes induce un desbalance en el pool GSH/GSSG y $\text{T(SH)}_2/\text{TS}_2$ que termina siendo detectado por hGrx-roGFP2. Por otro lado, el tratamiento de parásitos con DTT conllevó a un marcado aumento de la intensidad de fluorescencia de la hGrx-roGFP2 en ambos clones (40% y 28% para el clon B4 y D3, respectivamente; $p < 0,03$), respecto al nivel presente en células no tratadas, lo cual es indicativo de un fenómeno de reducción. Es importante destacar que al tiempo de

exposición ensayado (10 min) ninguno de estos tratamientos indujo un efecto citotóxico, estimado por pérdida de integridad de membrana (Fig. 54B), comprobándose así la especificidad y el origen intracelular del cambio redox detectado por el biosensor. En resumen, estos resultados muestran la gran capacidad del biosensor expresado por *T. brucei* WT para reaccionar de manera rápida a estímulos redox, e indican que, en su estado basal, las células presentan cierto grado de oxidación del *pool* de tioles de bajo peso molecular, posiblemente del GSH por la ausencia de actividad GR.

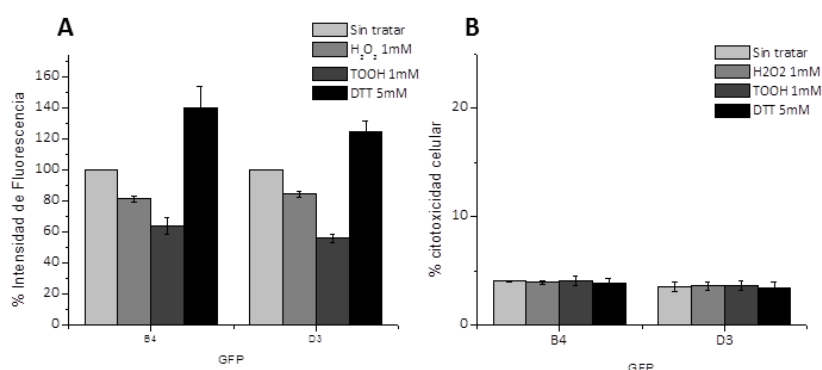


Figura 54. Caracterización bioquímica de los clones B4 y D3 de la línea *T. brucei* WT hGrx-roGFP2. Parásitos de la forma sanguínea de *T. brucei* WT hGrx-roGFP2 en fase exponencial de crecimiento y pre-inducidos con 1 µg/mL tet durante 24 h fueron expuestos a 1 mM de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), 1 mM de hidropéroxido de *tert*-butilo (TOOH) y 5 mM de DTT durante 10 minutos. Se analizaron por citometría de flujo (CyAn ADP, Dako) 1 x 10⁶ eventos/muestra empleando $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 488/500-570$ nm. **(A)** Los valores se expresan como unidad porcentual de la intensidad de fluorescencia relativa a células no tratadas. **(B)** Los valores se expresan como porcentaje de células muertas (IP positivas) en las muestras.

Para profundizar en la capacidad de respuesta del biosensor hGrx-roGFP2 expresado por la forma infectiva de *T. brucei* (clon B4), estas células fueron expuestas durante 10 minutos a diversos agentes oxidantes (H₂O₂, diamida y menadiona) agregados a diferentes concentraciones (20, 50, 100, 250 y 500 µM). Vale la pena destacar que, de acuerdo a los resultados de la caracterización cinética de la hGrx-roGFP2, bajo estas condiciones de ensayo (tiempos cortos) el biosensor estaría reportando principalmente cambios en la relación GSH/GSSG. Como se puede apreciar en la Fig. 55, la línea reportera fue capaz de detectar cambios redox originados por el tratamiento con agentes oxidantes fuertes como la diamida y la menadiona, y en menor medida con peróxido de hidrógeno. Llamativamente, la magnitud de estos cambios no guardó relación con la concentración del oxidante alcanzándose para todas las concentraciones testeadas un *plateau* de oxidación del biosensor que correspondió a ~12%, ~23% y ~52% para H₂O₂, diamida y menadiona, respectivamente. Estas diferencias en la respuesta del biosensor a diferentes oxidantes puede explicarse por el potencial oxidante y el mecanismo de acción que presenta cada uno de ellos así como por los sistemas encargados de contrarrestar a los mismos o a sus efectos. Por ejemplo, el H₂O₂ será rápidamente neutralizado por peroxidasas altamente eficientes y presentes en elevadas concentraciones intracelulares en la forma infectiva del parásito (10-100 µM, (R. L. Krauth-Siegel et al., 2008); (M. D. Piñeyro et al., 2008)), mientras que los xenobióticos ensayados ejercen un efecto más

potente ya que son capaces de actuar directamente sobre el *pool* de tioles de bajo peso molecular y proteínas, como es el caso de la diamida (Kosower et al., 1969) y/o, como el ciclador redox menadiona, amplificar su efecto oxidante mediante la generación de diversas especies reactivas del oxígeno y el consumo de poder reductor bajo la forma de NADPH (Criddle et al., 2006).

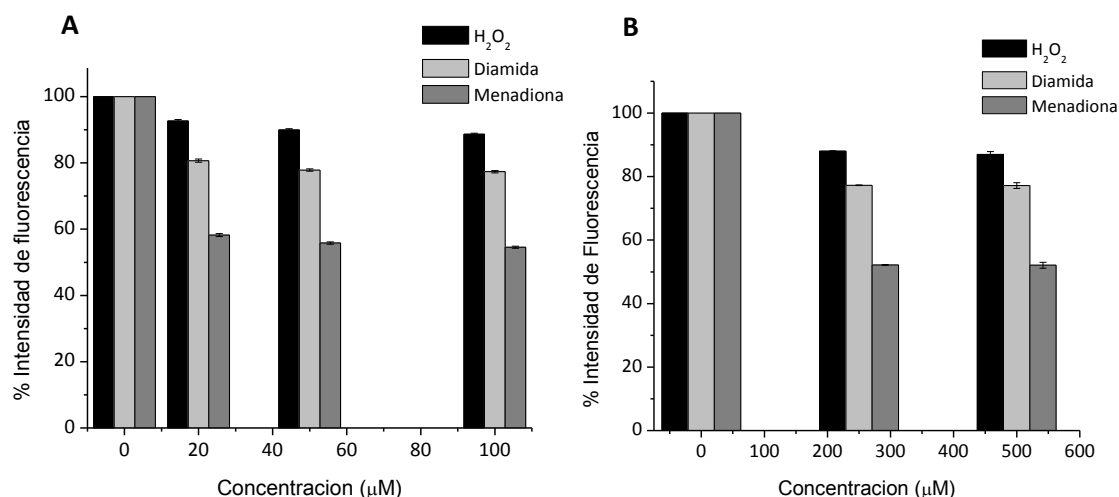


Figura 55. Respuesta a oxidantes del biosensor hGrx-roGFP2 expresado en la forma infectiva de *T. brucei*. Parásitos de la forma sanguínea de *T. brucei* WT hGrx-roGFP2 en fase exponencial de crecimiento y pre-inducidos con 1 μg/mL tet durante 24 h fueron expuestos a distintas concentraciones (20-500 μM) de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), diamida y menadiona durante 10 minutos. Se analizaron por citometría de flujo (CyAn ADP, Dako) 1 x 10⁶ eventos/muestra empleando λ_{ex} / λ_{em} = 488/500-570 nm. Los valores se expresan como unidad porcentual de la intensidad de fluorescencia relativa a células no tratadas. Tratamientos con concentraciones de (A) 0, 20, 50 y 100 μM, y (B) 0, 250 y 500 μM de los respectivos oxidantes.

4.4.2 Caracterización de la línea celular sanguínea de *T. brucei* 2CGrx1^{-/-}-hGrx-roGFP2

Los estudios de respuesta a estímulos redox se realizó sobre un total de 6 clones que habían sido previamente seleccionados por su nivel de expresión del biosensor (sección 4.3.3). Los tratamientos se extendieron por 10 min y fueron realizados a concentraciones fijas de 1 mM para H₂O₂ y peróxido de *tert*-butilo, y de 5 mM para el agente reductor DTT (Fig. 56). En 3 clones (B4, B6 y C5) se pudo observar que el tratamiento con oxidantes indujo una disminución en la intensidad de fluorescencia del biosensor (oxidación) que estuvo directamente relacionada a su toxicidad contra la forma infectiva del parásito (Comini et al., 2004 FRBM). Por ejemplo, 1 mM H₂O₂ redujo entre un 5-18% (p< 0,005) la intensidad de fluorescencia del biosensor mientras que la misma concentración del peróxido orgánico de *tert*-butilo disminuyó este parámetro cerca de un 40% (p< 0,002) respecto de los niveles presentes en células no tratadas (Fig. 56A). Para estos 3 clones, el tratamiento con DTT sobre parásitos sin tratar produjo un incremento de alrededor de un 15% (p< 0,004) en la intensidad de fluorescencia, demostrando que en el estado basal el biosensor presenta un ligero (aprox. <15%) nivel de oxidación en el medio intracelular. Por el contrario, las restantes 3 líneas reporteras (clones A1, A2 y A3), en general, se mostraron refractarias a los desafíos con agentes oxidantes. El H₂O₂ solo redujo marginalmente (<4%) la intensidad de fluorescencia en los 3 clones, mientras que el

hidroperóxido de *tert*-butilo la redujo en un ~12% ($p < 0,043$) y 40% ($p < 0,005$) para el clon A1 y A2, respectivamente. Llamativamente, este mismo tratamiento realizado sobre el clon A3 incrementó un 18% la intensidad de fluorescencia. A diferencia de lo observado para los clones B4, B6 y C5, el tratamiento con DTT incrementó significativamente la intensidad de fluorescencia (40-90%, $p < 0,0014$), lo cual sugiere que estas líneas celulares presentan un estado redox basal marcadamente oxidado. Esto explicaría la baja sensibilidad del biosensor para detectar un incremento adicional en la relación GSSG/GSH producto del tratamiento con oxidantes. En ese sentido, los clones de este grupo que fueron capaces de responder al insulto oxidativo con peróxido de *tert*-butilo fueron los que presentaron un menor estado oxidado del biosensor (clones A1 y A2).

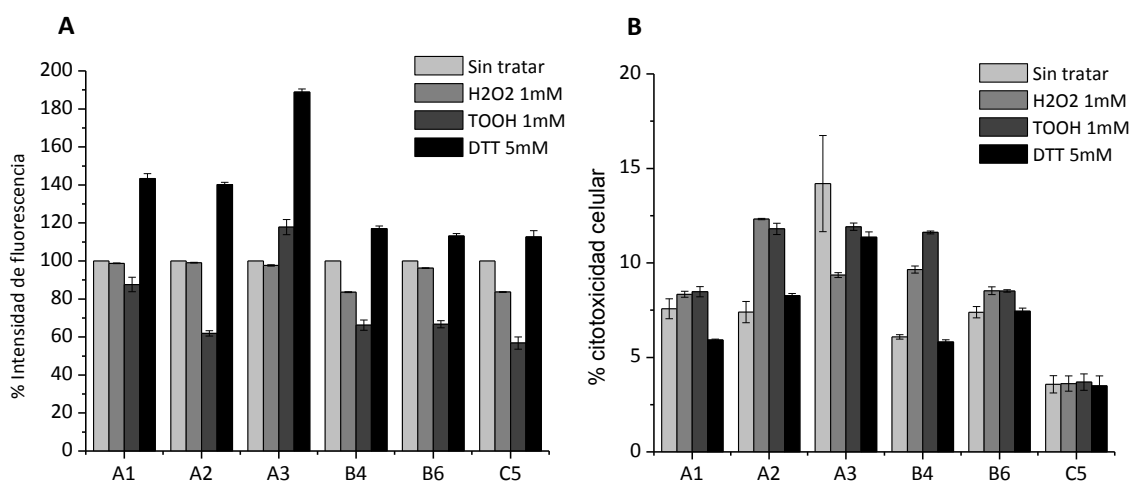


Figura 56. Respuesta a estímulos redox de distintos clones de la línea reportera de *T. brucei* 2CGrx1^{-/-} que expresa el biosensor hGrx-roGFP2. Parásitos *T. brucei* 2CGrx1^{-/-} - hGrx-roGFP2 en fase exponencial del crecimiento y pre-inducidos con 1 µg/mL tet durante 24 hs fueron tratados con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o hidroperóxido de *tert*-butilo 1 mM, o bien DTT 5 mM por 10 minutos. Las células (1 x 10⁶ eventos/muestra) fueron analizadas por citometría de flujo (CyAn ADP, Dako) empleando λ Ex/Em 488/500-570 nm. **(A)** Los valores se expresan como unidad porcentual de la intensidad de fluorescencia relativa a células no tratadas. **(B)** Los valores se expresan como porcentaje de células muertas en las muestras.

Dado que los tripanosomátidos carecen de actividad GR y las Grx clase I con las cuales cuentan son capaces de catalizar la reducción de GSSG a partir de los equivalentes de reducción provistos por T(SH)₂, se ha planteado la hipótesis que las 2CGrx de tripanosomas sustituyen a la actividad de GR y contribuyen así a mantener baja la relación GSSG/GSH (Comini et al., 2013). Al verse afectada esta función en la línea KO para 2-C-Grx1 y debido a que la reacción de la hGrx con T(SH)₂ es lenta, es probable que el incremento en la tasa GSSG/GSH observado en 3 de las líneas reporteras sea consecuencia de la pérdida de esta función. De ser así, el comportamiento de las otras 3 líneas reporteras sugiere que estos parásitos han logrado compensar la función de la 2CGrx1 ya que logran conservar un índice bajo para la relación GSSG/GSH.

Si se comparan las Figuras 54 y 56A se puede observar que los clones B4 y D3 de la línea Tb WT hGrx-roGFP2 muestran un comportamiento similar al B4, B6 y C5 de la línea *T. brucei*

2CGrx1^{-/-}-hGrx-roGFP2. Ambas líneas muestran una disminución de la intensidad de fluorescencia en un 20% y en un 40% frente al agregado de H₂O₂ y *tert*-butilo, respectivamente. Mientras que el tratamiento con DTT 5mM para el clon B4 de la línea WT indica que este clon presentaba, al momento de efectuar el experimento, un estado basal más oxidado que los clones de la línea KO (B4, B6 y C5) y que el clon D3 de la línea WT, en base a diferencias del 25% en la intensidad de fluorescencia de la hGrx-roGFP2.

De manera complementaria se analizó la citotoxicidad generada por estos tratamientos sobre los 6 clones de la línea *T. brucei* 2CGrx1^{-/-}-hGrx-roGFP2 (Fig. 56B). Donde se observa que los clones A1, A2 y A3 que presentaban un estado basal mayormente oxidado en comparación a los clones B4, B6 y C5, resultan más sensibles a los tratamientos con los oxidantes aunque no de manera significativa si se los compara a los resultados obtenidos para los clones B4 y B6. Sin embargo esas diferencias pasan a ser significativas ($p < 0,001$) si se tienen en cuenta los bajos valores de citotoxicidad obtenidos para el clon C5.

En base a estos estudios funcionales, se decidió continuar trabajando con el clon C5, el cual presentó un estado redox intracelular y una respuesta a estímulos redox adecuados.

4.4.3 Análisis funcional comparativo entre la línea reportera hGrx-roGFP2 de *T. brucei* cepa salvaje y cepa Tb2CGrx1^{-/-}.

De acuerdo a la caracterización realizada *in vitro* del biosensor roGFP2 con diferentes oxidoreductasas y disulfuros de bajo peso molecular (ej. GSSG y TS₂), la roGFP2 es capaz de reaccionar en forma directa con TS₂, aunque con una cinética lenta pero significativamente superior a la observada para GSSG, y dicha reacción es acelerada por Tb2CGrx1 no así por la hGrx. Por el contrario, ambas Grx son capaces de catalizar con gran eficiencia la oxidación de la roGFP2 a expensas de GSSG.

Con el fin de investigar el posible rol de la Tb2CGrx1 endógena en la respuesta del biosensor hGrx-roGFP2 en un contexto experimental fisiológico, se comparó la respuesta a estímulos oxidantes de las líneas reporteras hGrx-roGFP2 generadas en la forma infectiva de *T. brucei* cepa salvaje (WT, clon D3) y cepa Tb2CGrx1^{-/-} (clon B5). Las células fueron expuestas a los oxidantes durante diferentes tiempos (3, 9 y 15 min y 24 h) y los cambios en intensidad de fluorescencia del biosensor así como la citotoxicidad de los tratamientos fue evaluada por citometría de flujo.

En primer lugar se ensayaron menadiona y diamida a 500 μ M y DTT 2 mM, dos oxidantes que presentan diferentes modos de acción y que indujeron una marcada oxidación del biosensor en experimentos anteriores realizados sobre la línea reportera WT (Fig. 55). Estos resultados fueron nuevamente confirmados para esta línea reportera, donde al cabo de 3 min diamida redujo cerca de un 20% la intensidad de fluorescencia del biosensor observándose a partir de ese tiempo una tendencia a recuperar el estado redox basal debido al progresivo y leve incremento en la intensidad de fluorescencia a los 9 y 15 min

(Fig. 57A). En el caso de menadiona, este ciclador redox indujo una marcada y sostenida reducción de la intensidad de fluorescencia del biosensor que alcanzó un valor máximo del 40% al cabo de 15 min (Fig. 57A). Si bien ambos oxidantes incrementaron el número de células con daño de membrana, a igual concentración y tiempo de exposición menadiona presentó una mayor citotoxicidad que diamida (Fig. 57B).

Estos mismos estímulos aplicados sobre la línea reportera Tb2CGrx1^{-/-} (clon B5) produjeron efectos diferentes en el estado redox del biosensor (Fig. 57C) y la toxicidad celular (Fig. 57D). Por ejemplo, si bien el tratamiento con diamida causó un incremento de 2,5% en el número de células IP positivas, mayor al observado en la línea reportera WT, esto no se acompañó de una oxidación del biosensor a nivel intracelular como si se observó para la línea reportera WT.

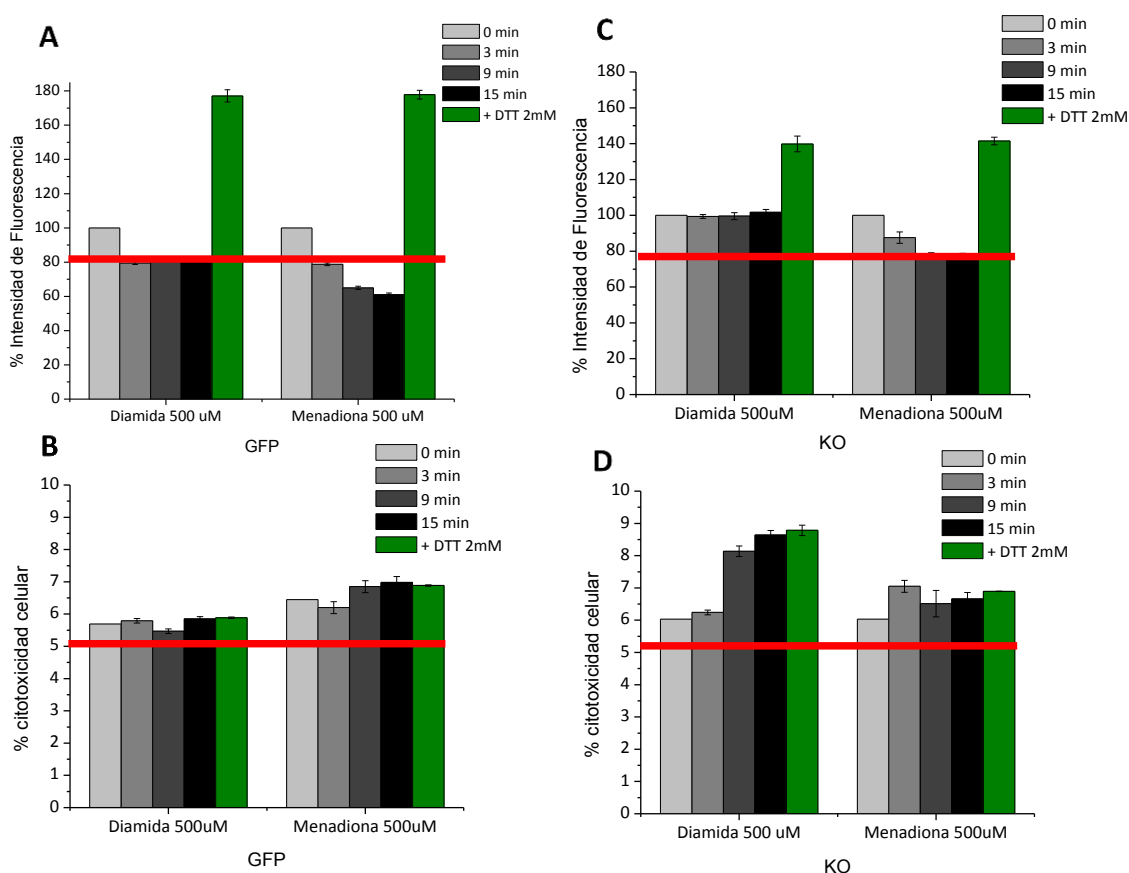


Figura 57. Respuesta comparativa a estímulos redox de las líneas redox reporteras de *T. brucei* WT y 2CGrx1 KO. Un millón de parásitos/mL de la línea de *T. brucei* WT (clon D3) y KO Tb2CGrx1 (clon C5) que expresan la hGrx-roGFP2 fueron tratados con 500 μ M de diamida o menadiona. Se adquirieron por citometría de flujo (equipo Accuri, λ Ex/Em 488/500-560 nm) los histogramas de eventos vs. Log₁₀ intensidad de fluorescencia de GFP. La intensidad de fluorescencia promedio de la muestra sin tratar se fija como 100% para la línea WT GFP (**A**) y la línea KO GFP (**B**). Gráfico de porcentaje de citotoxicidad a partir de los datos biparamétricos de SSC vs. FSC para la línea WT GFP (**C**) y para la línea KO GFP (**D**). Al cabo de 15 min de tratamiento con los oxidantes se agrega DTT a una concentración final de 2mM (+ DTT 2mM) durante 5 min y se procede a adquirir las muestras como se describió anteriormente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Por otro lado, a diferencia de lo observado para la línea reportera WT, el tratamiento con menadiona de la línea reportera Tb2CGrx1^{-/-} se acompañó de una oxidación de menor magnitud del biosensor (máximo de 25%) y sin cambios significativos en la viabilidad celular.

Luego de 15 min de exposición a diamida o menadiona, ambas líneas reporteras fueron tratadas con DTT a una concentración final de 2 mM (Fig. 57A y B y 57C y D). La línea WT presentó una recuperación de la intensidad de fluorescencia del biosensor de un 100% para diamida y de un 150% para menadiona mientras que la línea KO presentó una recuperación de un 40% para diamida y de un 65% para menadiona.

Para completar la caracterización de las líneas reporteras, estas fueron expuestas a 500 μ M H₂O₂ durante 3, 9 y 15 min (Fig. 58). El tratamiento con 500 μ M H₂O₂ al cabo de los 15 minutos produjo una oxidación del biosensor redox en la cepa Tb2CGrx1^{-/-} (4,5% oxidación) de magnitud similar a la causada sobre la cepa WT (6,5% oxidación). No obstante, la primera de estas cepas mostró una sensibilidad incrementada contra el oxidante, siendo que a los diferentes tiempos de exposición la citotoxicidad sobre la línea Tb2CGrx1^{-/-} fue un 20% superior a la determinada en la línea WT.

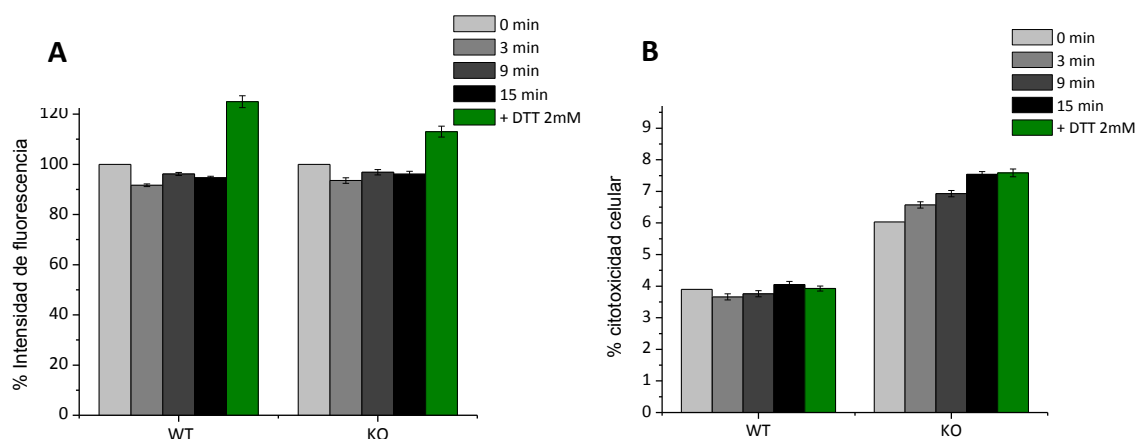


Figura 58. Respuesta comparativa a H₂O₂ y reversión con DTT de las líneas redox reporteras de *T. brucei* WT y 2CGrx1 KO. Un millón de parásitos/mL de la línea de *T. brucei* WT (clon D3) y KO Tb2CGrx1 (clon C5) que expresan la hGrx-roGFP2 fueron tratados con 500 μ M de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). **(A)** Se adquirieron por citometría de flujo (equipo Accuri, λ Ex/Em 488/500-560 nm) los histogramas de eventos vs. Log₁₀ intensidad de fluorescencia de GFP. La intensidad de fluorescencia promedio de las muestras sin tratar de las líneas WT GFP y KO GFP se fija como 100%. **(B)** Grafico de porcentaje de citotoxicidad a partir de los datos biparamétricos de SSC vs. FSC para la línea WT GFP y para la línea KO GFP. Al cabo de 15 min de tratamiento con los oxidantes se agrega DTT a una concentración final de 2mM (+ DTT 2mM) durante 5 min y se procede a adquirir las muestras como se describió anteriormente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

De manera adicional, se evaluó el estado redox intracelular y sensibilidad de ambas líneas reporteras a tratamientos con H₂O₂, diamida y menadiona a concentraciones de 250 y 500 μ M aplicados durante 24 h (Fig. 59). Tal como se observó en tratamientos cortos (15 min) con H₂O₂ o diamida a 500 μ M (Fig. 57 y 58), el biosensor expresado en la línea reportera generada sobre la cepa 2CGrx1^{-/-} no reportó cambios significativos en el estado redox

intracelular a pesar que dichos oxidantes indujeron una marcada citotoxicidad (45-90%, Fig. 59). Por el contrario, estos mismos estímulos aplicados sobre la línea redox reportera de la cepa WT produjeron una marcada oxidación (20-50%) del biosensor que guardo una relación directa con el nivel de citotoxicidad provocado por las distintas concentraciones de oxidante que fueron testadas. Sin embargo, a diferencia de lo observado durante desafíos de 15 min, no se hallaron diferencias significativas en la sensibilidad a H_2O_2 y diamida por parte de ambas líneas celulares, excepto para el tratamiento con 250 μM H_2O_2 ($p < 0,001$). El notorio aumento en la intensidad de fluorescencia del biosensor en parásitos tratados con menadiona lo asociamos al marcado incremento del fenómeno de autofluorescencia, y no a un efecto redox, ya que este oxidante produjo una marcada muerte celular ($>80\%$).

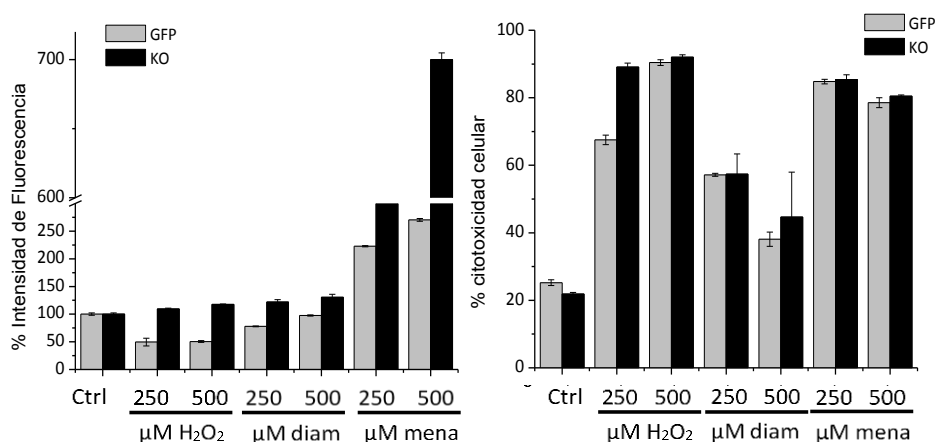


Figura 59. Respuesta comparativa al tratamiento con oxidantes durante 24 h de las líneas redox reporteras de *T. brucei* WT y 2CGrx1 KO. Un millón de parásitos/mL de la línea de *T. brucei* WT (clon D3) y KO Tb2CGrx1 (clon C5) que expresan la hGrx-roGFP2 fueron tratados con 250 o 500 μM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), diamida (diam) o menadiona (mena). **(A)** Se adquirieron por citometría de flujo (equipo Accuri, λ Ex/Em 488/500-560 nm) los histogramas de eventos vs. $\log_{10}$ intensidad de fluorescencia de GFP. La intensidad de fluorescencia promedio de las muestras sin tratar de las líneas WT GFP y KO GFP (Ctrl) se fija como 100%. **(B)** Gráfico de porcentaje de citotoxicidad a partir de los datos biparamétricos de SSC vs. FSC para la línea WT GFP y para la línea KO GFP. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Las diferencias en la sensibilidad a estrés oxidativo y el estado redox intracelular del pool GSH/GSSG entre las líneas WT (clon D3) y Tb2CGrx1^{-/-} (clon B5) nos permiten especular sobre el potencial rol de la 2CGrx1 citosólica en el metabolismo redox del parásito. Recientemente se ha demostrado que la 2CGrx1 aporta cerca de un 45% de la actividad reductora de disulfuros mixtos de GSH en la forma infectiva de *T. brucei* y que el tratamiento de la forma procíclica del mutante Tb2CGrx1^{-/-} con diamida (20 μM), un agente que incrementa la relación GSSG/GSH, durante 3, 6 y 24 h no provoca ningún fenotipo adverso (Musunda et al., 2016). Desafíos similares no fueron realizados sobre la forma sanguínea del parásito. De acuerdo a nuestros datos, la ausencia de 2CGrx1 incrementa la sensibilidad de la forma infectiva de *T. brucei* a la oxidación por H_2O_2 y diamida a concentraciones elevadas (500 μM) y tiempos cortos (<15 min), si bien este efecto no se traduce en un incremento significativo en la relación GSSG/GSH, detectada

por la hGrx-roGFP2. En principio esto estaría indicando que bajo estas condiciones de ensayo el oxidante no tiene por blanco directo al GSH y que la 2CGrx1 contribuiría a equilibrar el estado de oxidación de otros blancos parásito-específicos con el *pool* GSH/GSSG, algo que la hGrx (oxidoreductasa presente en el biosensor) no puede llevar a cabo. Esto explicaría también el menor incremento en la relación GSSG/GSH detectado por el biosensor en parásitos deficientes en 2CGrx1 tratados con el potente cicladoredox menadiona (500 μ M, 15 min), respecto de la cepa WT. Los tratamientos prolongados (24 h) con H₂O₂ y diamida coinciden con estas interpretaciones acerca del comportamiento redox de la línea celular 2CGrx1^{-/-} y como la ausencia de esta proteína “desconecta” el estado redox intracelular del par GSSG/GSH y por lo tanto de la respuesta del biosensor redox. No obstante, las células 2CGrx1^{-/-} muestran cierta actividad adaptativa al efecto de los oxidantes ya que durante incubaciones prolongadas fueron capaces de contrarrestar su toxicidad. A diferencia de lo observado con diamida, y en menor medida con H₂O₂, la cepa KO mostró una mayor resistencia al efecto citotóxico de la menadiona a tiempos cortos de tratamiento (<15 min). Si bien este resultado resulta contradictorio, vale la pena destacar que comportamientos de igual complejidad han sido reportados para levaduras deficientes en Grx de clase I (Grx1 y Grx2). Por ejemplo, cepas de *Sacharomyces cerevisiae* KO para Grx1 o Grx2 mostraron una alta sensibilidad contra el cicladoredox paraquat, selenito y H₂O₂ respecto de la cepa WT, mientras que se observó un efecto totalmente opuesto contra la diamida (Eckers et al., 2009).

4.4.4 Caracterización de la línea reportera *T. cruzi* hGrx-roGFP2

Para evaluar la funcionalidad de la hGrx-roGFP2 expresada por epimastigotas de *T. cruzi* cepa CL-Brener, los parásitos fueron expuestos durante 15 y 60 min a diferentes concentraciones (0-500 μ M) de distintos oxidantes (H₂O₂, diamida y menadiona).

Tal como se muestra en la Fig. 60, el biosensor fue capaz de detectar un incremento en la relación GSSG/GSH producto de la oxidación intracelular mediada por H₂O₂, diamida y menadiona exhibiendo una buena respuesta dosis-dependiente tanto a tiempos de exposición cortos (15 min; Fig. 60A) como largos (60 min; Fig. 60B).

Para los tratamientos realizados con H₂O₂ y diamida a concentraciones por debajo de 100 μ M, a los 60 min se pudo observar una tendencia a revertir el estado oxidado del biosensor alcanzado luego de 15 min de exposición. Por ejemplo, a los 15 min de exposición a H₂O₂ y diamida la intensidad de fluorescencia del biosensor disminuyó ~50% y en los siguientes 45 min de incubación (60 min en total de exposición) retornó a un valor superior al 75%. Un comportamiento similar, aunque de menor magnitud, fue observado para los tratamientos realizados a concentraciones de 20 y 50 μ M de estos oxidantes (comparar valores de IF en Fig. 60A y 60B). La clara tendencia a re-establecer el estado redox intracelular del par GSSG/GSH estaría demostrando la capacidad del sistema anti-

oxidante del parásito para rápidamente neutralizar las especies oxidadas que se han generado durante el estrés oxidativo.

Por otro lado, el tratamiento con 20 μM menadiona durante 15 min produjo una marcada oxidación del biosensor (70% oxidación respecto del estado basal: no tratado) que fue superior a la inducida por concentraciones ≥ 10 veces superiores de diamida o H_2O_2 en el mismo lapso de tiempo (por ej. $\sim 60\%$ oxidación para 500 μM diamida y 200 μM H_2O_2). Concentraciones superiores de menadiona disminuyeron aún más la intensidad de fluorescencia del biosensor, hasta alcanzar un mínimo de 20% para 500 μM del oxidante. A diferencia de lo observado para los tratamientos durante 60 min con diamida o H_2O_2 , solo parásitos expuestos a la concentración más baja de menadiona (20 μM) mostraron una ligera pero no significativa, desde el punto de vista estadístico, reversión espontánea del estado oxidado del biosensor. A concentraciones >20 μM menadiona la intensidad de fluorescencia del biosensor continuó decayendo entre los 15 y 60 min de incubación con el oxidante. La respuesta del biosensor frente menadiona es compatible con el mayor potencial oxidante que presenta este compuesto.

En resumen, estos experimentos permitieron validar la funcionalidad del biosensor hGrx-roGFP2 expresado por la forma epimastigota de *T. cruzi* ya que fue posible detectar cambios redox dinámicos a nivel intracelular frente al desafío con distintos oxidantes. Por otro lado, la reversión del estado oxidado del biosensor a nivel intracelular durante la exposición a determinados oxidantes (≤ 100 μM diamida o H_2O_2) durante tiempos cortos (1 h) pone en evidencia la gran capacidad de estos organismos por restablecer su homeostasis redox.

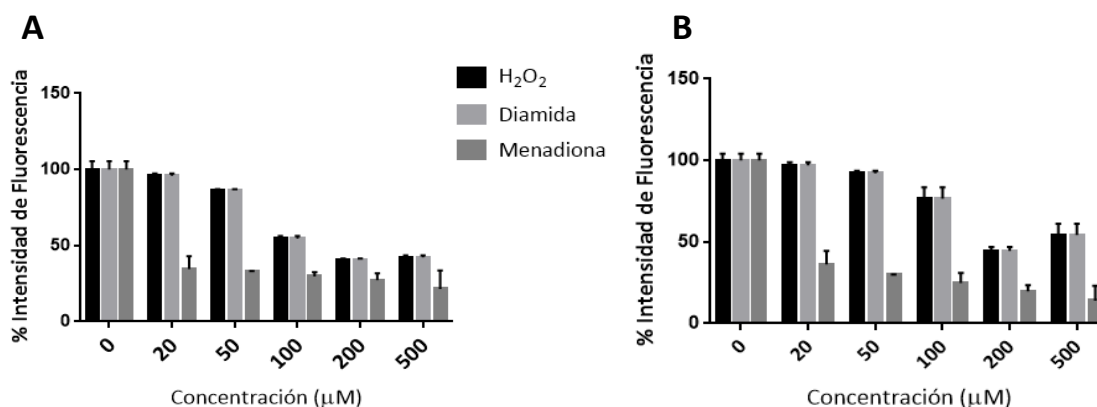


Figura 60. Respuesta a oxidantes del biosensor hGrx-roGFP2 expresado en la forma no infectiva de *T. cruzi*. Epimastigotas de *T. cruzi* hGrx-roGFP2 cepa CL-Brener en fase exponencial de crecimiento fueron expuestos a distintas concentraciones (20, 50, 100, 200 y 500 μM) de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), diamida y menadiona durante (A) 15 min y (B) 60 min. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (CyAn ADP, Dako) empleando $\lambda_{\text{Ex/Em}}$ 488/500-570 nm. Los valores se expresan como unidad porcentual de la intensidad de fluorescencia (% IF) relativa a células no tratadas (0).

Se evaluó la capacidad del biosensor en las muestras de parásitos *T. cruzi* hGrx-roGFP2 luego del tratamiento con los diferentes oxidantes por 60 min (Fig. 60) de revertir su

estado oxidado. Frente al agregado de 2 mM de DTT por 5 min, se observó para todas las condiciones, una recuperación de los valores de intensidad de fluorescencia a los niveles iniciales de la muestra control no expuesta a oxidantes (0 μ M de oxidante, Fig. 61 A-C). Esto confirma el origen redox de los cambios de fluorescencia en el biosensor.

Dado los buenos niveles de expresión alcanzados por la hGrx-roGFP2 en epimastigotas de *T. cruzi* y el rol propuesto para peroxinitrito en el control de la proliferación de este parásito por parte de macrófagos (Prolo et al., 2014), (Alvarez et al., 2011a) es que se decidió investigar la capacidad de este biosensor para responder a este oxidante fisiológico. Además de ONOOH, los ensayos con oxidantes incluyeron a GSSG y H_2O_2 como control y se llevaron a cabo tanto sobre parásitos intactos como sobre extractos totales de los mismos, realizando mediciones de fluorescencia en fluorímetro. La cuantificación del ONOOH previo a los tratamientos se llevó a cabo como se describe en (Denicola et al., 1993).

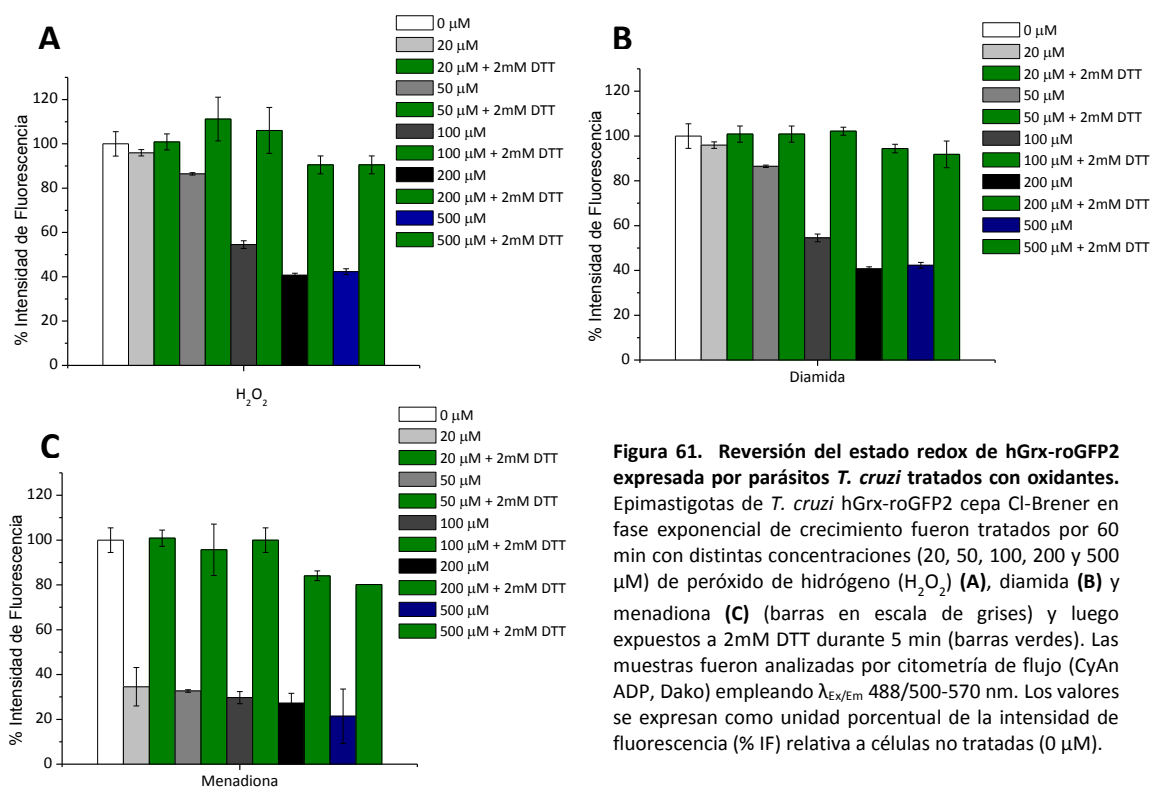


Figura 61. Reversión del estado redox de hGrx-roGFP2 expresada por parásitos *T. cruzi* tratados con oxidantes. Epimastigotas de *T. cruzi* hGrx-roGFP2 cepa CI-Brener en fase exponencial de crecimiento fueron tratados por 60 min con distintas concentraciones (20, 50, 100, 200 y 500 μ M) de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (A), diamida (B) y menadiona (C) (barras en escala de grises) y luego expuestos a 2mM DTT durante 5 min (barras verdes). Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (CyAn ADP, Dako) empleando $\lambda_{Ex/Em}$ 488/500-570 nm. Los valores se expresan como unidad porcentual de la intensidad de fluorescencia (% IF) relativa a células no tratadas (0 μ M).

Respecto del estado basal que presentaba el biosensor en extractos de *T. cruzi*, el agregado de 10 μ M ONOOH produjo una oxidación de 35% de la hGrx-roGFP2 al cabo de 2 min, la cual se incrementó a un 100% al cabo de 15 min de exposición al oxidante (Fig. 62A). El agregado de 1 mM DTT revirtió rápidamente (1 min incubación) la oxidación de la hGrx-roGFP2 inducida por ONOOH, lo cual indica que los cambios redox detectados por el biosensor involucraron la oxidoreducción de tioles. Experimentos control realizados con GSSG permitieron validar la funcionalidad del biosensor en estas condiciones de ensayo,

detectándose una oxidación de la hGrx-roGFP2 que fue concentración-dependiente respecto del oxidante (35% y 100% oxidación del biosensor a 1 y 10 μM GSSG durante 1 min, respectivamente, respecto del estado basal) así como una reversión tiempo-dependiente de este fenómeno frente al agregado de 1 mM DTT (Fig. 62B).

Tal como se mencionara y mostrara anteriormente (sección 4.1.2), la incorporación de la hGrx al biosensor redox roGFP2 le confirió a éste una gran sensibilidad y especificidad para reaccionar con GSSG. Por lo tanto resulta llamativo que tratamientos idénticos con ONOOH y GSSG (10 μM durante 1 min) arrojaron niveles similares de oxidación del biosensor en extractos de parásitos (100%). Si bien ONOOH es un potente agente oxidante de tioles (Radi R. et al., 2000) ; (Thomson et al., 2003b) y que en los tiempos del ensayo su agregado al lisado de *T. cruzi* podría inducir una rápida y completa oxidación equimolar de GSH a GSSG (Thomson et al., 2003b), no podemos descartar que el ONOOH pueda estar oxidando de manera directa a la hGrx-roGFP2. Unos párrafos más adelante se presentan los resultados de los estudios *in vitro* que abordaron este interrogante.

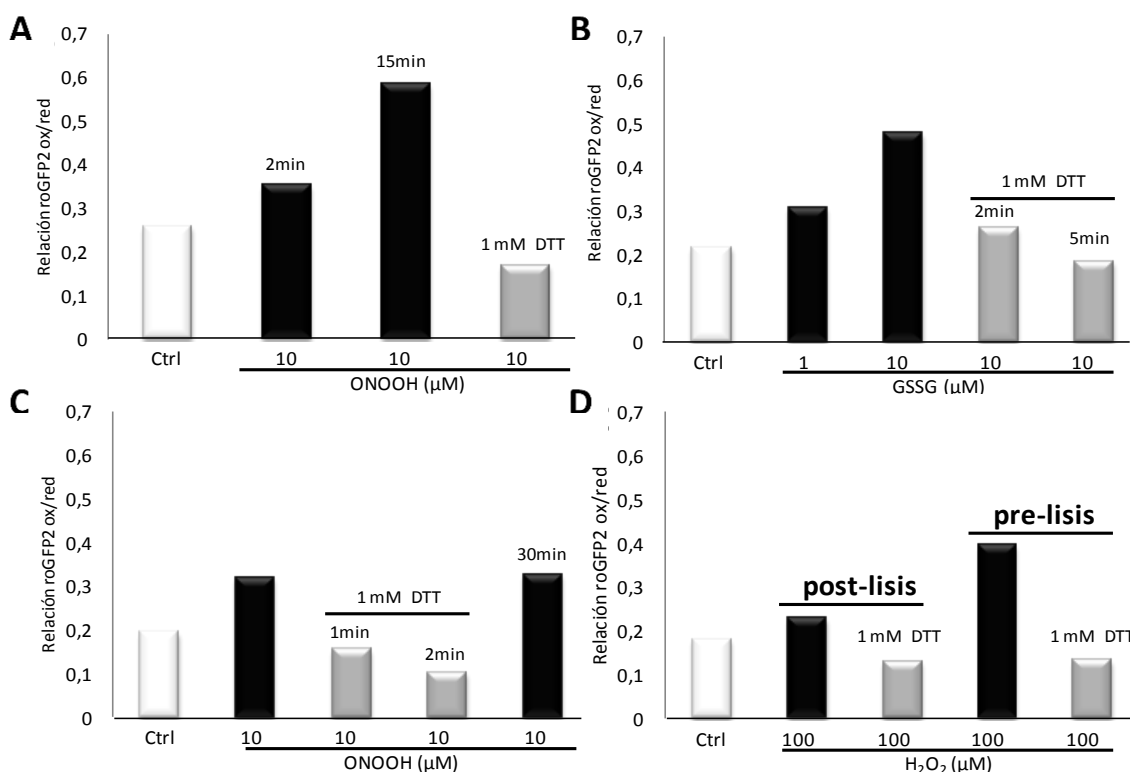


Figura 62. Respuesta a diferentes estímulos redox de la hGrx-roGFP2 expresada por la forma no infectiva de *T. cruzi*. Epimastigotes de *T. cruzi* cepa Adriana hGrx-roGFP2 en fase exponencial tardía fueron resuspendidos a una densidad de 2×10^8 células/ml en tampón de fosfato. Los estímulos con oxidantes (GSSG, ONOOH y H_2O_2) y reductor (DTT) se realizaron tanto sobre extractos celulares totales lisados (post-lisis), como parásitos intactos (pre-lisis). Los valores se expresan como la relación roGFP2 ox/red que se obtiene a partir del cociente de la intensidad de fluorescencia (λ_{em} 512 nm) a λ_{ex} 396 nm (máxima absorción de la forma oxidada de roGFP2) sobre el valor obtenido a λ_{ex} 492 nm (máxima absorción de la forma reducida de la roGFP2). La lisis celular instantánea se llevó a cabo con digitonina 1 mg/ml. Excepto se indique de otra forma los tratamientos se realizaron por aprox. 1 min. **(A)** Extractos de parásitos expuestos a 10 μM ONOOH y reversión de la oxidación con 1 mM DTT. **(B)** Extractos de parásitos expuestos a 1 y 10 μM GSSG y reversión tiempo dependiente de la oxidación con 1 mM DTT. **(C)** Parásitos intactos tratados con 10 μM ONOOH durante ~1 y 30 min y reversión tiempo dependiente de la oxidación con 1 mM DTT. **(D)** Parásitos expuestos a 100 μM H_2O_2 post- y pre-lisis (células intactas) y reversión de la oxidación con 1 mM DTT. Ctrl: control no tratado.

Paso seguido se evaluó el efecto del tratamiento con 10 μM ONOOH a diferentes tiempos sobre parásitos intactos (no lisados) que expresan la hGrx-roGFP2. Si bien a 1 min de exposición al oxidante el biosensor sufrió una oxidación del 30% (Fig. 62C), la magnitud de la misma fue ligeramente inferior a la observada en las muestras de lisados celulares para las mismas condiciones de oxidación (35% oxidación a 10 μM ONOOH durante 2 min para una misma cantidad de células; Fig. 62A). Incluso extendiendo por 30 min el tiempo de exposición de los parásitos a ONOOH produjo un incremento marginal en la oxidación del biosensor (38% oxidación) respecto al aumento de 2,3 veces en el ratio 405/488 observado para el tratamiento de parásitos lisados con 10 μM ONOOH durante la mitad de este tiempo (comparar Fig. 62A con 62C). Probablemente esto se deba a una rápida descomposición del ONOOH a nivel intracelular, con la consecuente disminución de su concentración activa. Por otro lado esto destaca la importancia de conservar la integridad celular para mantener la correcta funcionalidad de los sistemas anti-oxidantes. A pesar de la menor oxidación del biosensor redox provocada por ONOOH en parásitos intactos, frente al agregado de 1 mM DTT la misma fue revertida en un modo tiempo dependiente (Fig. 62C), demostrando el origen redox de dicho cambio.

La funcionalidad del biosensor en las condiciones de ensayo empleadas (alta densidad celular y fluorimetría) fue verificada exponiendo los parásitos (extractos: post-lisis o células completas: pre-lisis) a 100 μM H_2O_2 durante 1 min seguido del agregado de 1 mM DTT (Fig. 62D). A diferencia de lo observado para los tratamientos con ONOOH y GSSG a concentraciones 10 veces inferiores (Fig. 62A y B), el H_2O_2 produjo un 30% de oxidación del biosensor en muestras de parásitos lisados (ratio 405/488 = 0,22) respecto del hallado en células no tratadas (ratio 405/488 = 0,17) (Fig. 62D, ctrl.). De manera similar a lo observado en ensayos de oxidación realizados sobre células intactas y cuantificados por citometría de flujo (Fig. 62D), la exposición a 100 μM H_2O_2 produjo una marcada oxidación del biosensor en parásitos no lisados (pre-lisis ratio 405/488 = 0,44), la cual fue además 2 veces superior a la determinada en los extractos celulares (post-lisis ratio 405/488 = 0,22). La oxidación de la hGrx-roGFP2 tanto en parásitos lisados como no lisados fue revertida completamente mediante el agregado del agente reductor DTT a 1 mM. La mayor capacidad de respuesta de la hGrx-roGFP2 a la oxidación mediada por H_2O_2 en células intactas se debe a que estas condiciones, es decir de integridad celular, permiten una generación eficiente de GSSG, especie oxidante detectada con gran selectividad por este biosensor (Gutscher et al., 2008 y sección 4.1.2). Otro dato interesante que surge de comparar el estado redox basal del biosensor en células intactas y lisadas es que en estas últimas la hGrx-roGFP2 presenta un nivel de oxidación ~ 2 veces mayor (ratio 405/488 = 0,32) al de las primeras (ratio 405/488 = 0,15). Distintos factores directamente asociados con la ruptura de la integridad celular podrían explicar este incremento en el estado de oxidación del biosensor en extractos celulares, como por ejemplo: la alteración de vías metabólicas generadoras de poder reductor y la contribución de organelas, como el

retículo endoplasmático, la mitocondria o el lisosoma, con predominio de especies oxidadas o capaces de generar EROS (Hiller et al., 2013); (Schaffroth et al., 2016).

El conjunto de estos resultados indica que la hGrx-roGFP2 es capaz de detectar de manera sensible y dinámica cambios redox en el interior de *T. cruzi*, los cuales son producidos por distintos oxidantes, en particular por aquellos que cumplen roles importantes en la fisiología celular como el H_2O_2 y el ONOOH. Además, y tal como era de esperar, los resultados aquí obtenidos revalidan la importancia de conservar la integridad celular para no alterar las funciones metabólicas de la célula y poder realizar medidas confiables del estado redox intracelular.

4.4.5 Oxidación de hGrx-roGFP2 por peroxinitrito

Como se mostró en la sección anterior, tanto en células de *T. cruzi* intactas como lisadas la hGrx-roGFP2 fue oxidada de manera reversible por peroxinitrito. Las condiciones bajo las cuales se realizaron dichos ensayos no permiten distinguir si el $ONOO^-$ oxida de manera directa alguna de las cisteínas del biosensor o si bien este potente oxidante genera GSSG, a partir de la oxidación del GSH, el cual será detectado de manera muy específica y sensible por la hGrx-roGFP2. Con el fin de elucidar dicho interrogante, se realizaron cursos temporales de tratamiento de la forma recombinante de hGrx-roGFP2 con diferentes concentraciones de $ONOO^-$ (0,01-1 mM) durante 15 min, seguido del agregado de DTT (2 mM). A todas las concentraciones ensayadas, el $ONOO^-$ produjo una rápida (<1 min) y marcada oxidación (ratio 405/488 >0,4) del biosensor la cual en todos los casos fue revertida mediante agregado de agente reductor (Fig. 63). Sin embargo para las diferentes concentraciones de oxidante se observaron distintos comportamientos en la oxidación del biosensor luego del primer minuto de tratamiento. Por ejemplo, a la menor concentración de $ONOO^-$ (10 μ M) se pudo observar una segunda fase de oxidación más lenta que alcanzó un valor máximo de oxidación de la hGrx-roGFP2 al cabo de 10 min (ratio 405/488 ~ 0,51). A concentraciones intermedias del oxidante (50-100 μ M $ONOO^-$), la oxidación del biosensor alcanzó rápidamente una meseta (ratio 405/488 ~ 0,52). Mientras que la marcada oxidación del biosensor expuesto a 0,5 y 1 mM $ONOO^-$ por 30 seg (ratio 405/488 ~ 0,5) fue seguida por una rápida (30 seg) y abrupta caída de 0,1 unidad en el ratio 405/488. Para la condición de 0,5 mM $ONOO^-$ este aparente “rebote” en la reducción del biosensor cambió de tendencia al cabo de 1 min llevando a una leve pero continua oxidación del biosensor hasta llegar a un valor de ratio 405/488 de 0,46 a los 15 min. Por el contrario, la caída en el ratio 405/488 fue progresiva durante los posteriores 14 min de tratamiento con 1 mM $ONOO^-$ llegando hasta un valor mínimo de 0,34.

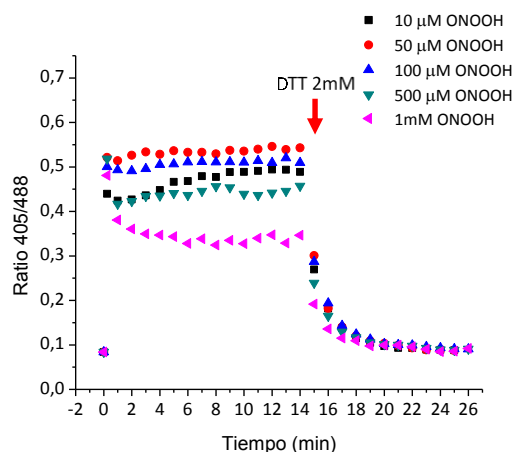


Figura 63. Oxidación de hGrx-roGFP2 recombinante por ONOOH. Se registra la intensidad de fluorescencia del biosensor luego del agregado de diferentes concentraciones de ONOOH durante 15 min a temperatura ambiente. El ONOO⁻ se prepara en una solución de NaOH 500 mM y se cuantifica la concentración del stock a 302 nm ($\epsilon = 1,67 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Al cabo de los 15 min se evalúa la reversibilidad de la oxidación mediante agregado de 2 mM DTT (indicado con flecha roja).

En caso de existir un *quenching* o apagamiento de la fluorescencia por reacción directa del ONOOH con el cromóforo ambos picos de excitación deberían verse afectados (disminuidos) y por lo tanto el ratio 405/488 se mantendría constante. Como se observa en la Figura 63, los espectros de excitación normalizados con el valor de intensidad de fluorescencia de la muestra control a 430 nm (punto isosbético), los picos de excitación a 405 y 488 nm de la hGrx-roGFP2 tratada con diferentes concentraciones de ONOOH no se ven disminuidos por igual respecto a la muestra control. Sino que en todos los casos se observa una disminución del pico 488 nm y un aumento correlativo del pico 405 nm. Los espectros correspondientes a las muestras tratadas con ONOOH y posteriormente con 2 mM DTT muestran la reducción del biosensor y la recuperación de la intensidad de fluorescencia del pico a 488 nm hasta un valor similar al de la muestra control (Fig. 64).

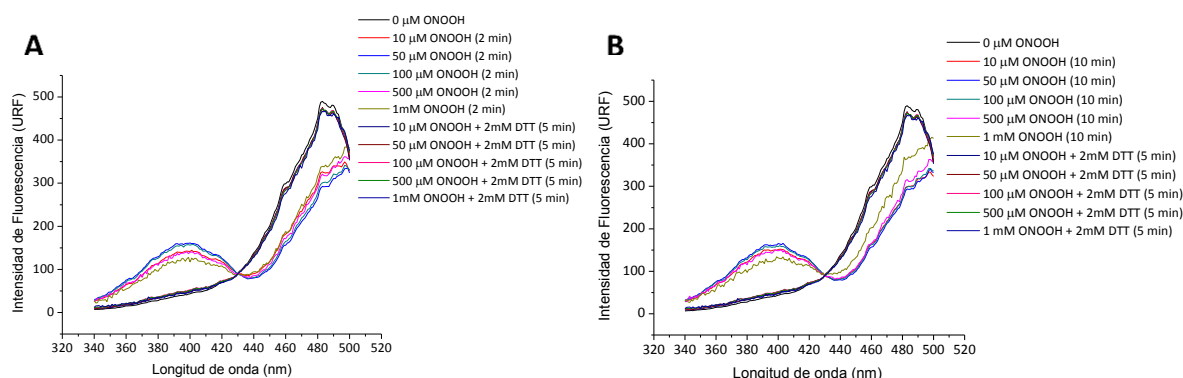


Figura 64. Espectros de excitación para la hGrx-roGFP2 recombinante tratada con ONOOH. Se grafica el espectro de fluorescencia (λ_{ex} 340-500 nm, λ_{em} 510 nm) del biosensor hGrx-roGFP2 luego de (A) 2 min y (B) 10 min del agregado de diferentes concentraciones de ONOOH a temperatura ambiente. Los espectros fueron normalizados por el valor de intensidad de fluorescencia a 430 nm de la muestra control (0 μM ONOOH). Se incluyen los espectros de fluorescencia de las mismas muestras tratadas con 2 mM DTT durante 5 min adicionales. El ONOO⁻ se prepara en una solución de NaOH 500 mM y se cuantifica la concentración del stock a 302nm ($\epsilon = 1,67 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Es probable que el fenómeno de reducción aparente observado a elevadas concentraciones de ONOO^- (0,5-1 mM) pueda deberse a una reacción de especies radicalares derivadas del peroxinitrito que podrían estar oxidando y/o nitrando al residuo de tirosina en la posición 66 que es parte integral del cromóforo de la roGFP2. A partir de la oxidación por un electrón de la tirosina se generaría el radical tirosilo ($\text{Tyr}^\bullet$) el cual podría reaccionar con el $^\bullet\text{NO}_2$ para dar la forma nitrada de la tirosina (Bartesaghi et al., 2007). Para determinar si esta reacción estaba teniendo lugar se analizó por espectrometría de masas una muestra de la hGrx-roGFP2 recombinante tratada con 0,5 mM ONOOH durante 15 min. Este análisis no mostró ningún péptido triptico conteniendo la secuencia del cromóforo ni en su estado nativo ni modificado con un incremento de 50 Da aproximadamente en su masa. Por lo tanto, los resultados arrojados por espectrometría de masa de una muestra de hGrx-roGFP2 tratadas con 500uM de ONOOH no nos permiten confirmar si el residuo de tirosina 205 del cromóforo se encuentra nitrado o modificado

Como dato significativo de los estudios realizados con ONOOH se destaca el identificar el gran potencial de esta molecula para oxidar de manera directa y altamente eficiente a las cisteínas del biosensor. Estos resultados son de gran impacto para la interpretación de datos biológicos derivados del uso de este biosensor, en sistemas o situaciones donde se espere generación de este oxidante.

4.5 Evaluación preliminar de las líneas reporteras de tripanosomátidos para detectar cambios redox in situ, en tiempo real y en contextos fisiológicos.

4.5.1 Análisis por microscopía confocal y de epifluorescencia de las líneas reporteras de *T. cruzi*

Un aspecto importante de la aplicación de los biosensores redox codificados genéticamente es que permiten estudiar fenómenos redox a nivel subcelular sin dañar la integridad de la célula.

Los tripanosomátidos son organismos móviles debido a la presencia de un flagelo que nace en el polo anterior del parásito, se extiende a lo largo del cuerpo del mismo y emerge en el polo posterior de la célula. Si bien esta característica no representa un inconveniente para el análisis de células viables por citometría de flujo, la observación directa de cambios redox a nivel intracelular por técnica de microscopía es compleja para parásitos en constante y rápido movimiento. Por lo tanto, para salvar este escollo se empleó una técnica previamente descrita (Hiller et al., 2014) de inmovilización en un medio semi-sólido, el cual permite mantener los parásitos viables por un tiempo prolongado (>60 min) y adquirir imágenes de fluorescencia de alta calidad mediante microscopía laser confocal.

Si bien fue posible inmovilizar *T. brucei* hGrx-roGFP2, los bajos niveles de expresión del biosensor en el citosol del parásito rindieron niveles de fluorescencia próximos a la señal

de ruido (autofluorescencia) correspondiente a la misma línea celular no inducida con tetraciclina (no mostrado).

Por el contrario, los altos niveles de expresión de la hGrx-roGFP2 en epimastigotas de *T. cruzi* cepa Adriana posibilitaron la visualización *in situ* del biosensor el cual presentó una distribución uniforme en el citosol del parásito (Fig. 65). De manera tal de evaluar la funcionalidad de la hGrx-roGFP2 bajo estas condiciones experimentales, se realizó un tratamiento con H_2O_2 y monitoreo en tiempo real de la intensidad de fluorescencia del biosensor excitado a 405 nM. Como se muestra en la Fig. 65, el agregado de 100 μL de 9 mM H_2O_2 a 1 mL de matriz de agarosa (en una difusión homogénea del oxidante en la agarosa esto equivaldría a una concentración final de 818 μM del oxidante) conteniendo los parásitos reporteros produjo un descenso marcado y rápido en la intensidad de fluorescencia del biosensor al cabo de 4 min de exposición. En los subsiguientes 4 min, se pudo apreciar una disminución adicional en la intensidad de la fluorescencia del biosensor, aunque de menor magnitud debido al alto grado de oxidación del biosensor alcanzado previamente.

Si bien no realizamos determinaciones cuantitativas, estos ensayos nos permitieron confirmar la potencialidad de la línea reportera de *T. cruzi* para efectuar estudios cuantitativos y con resolución espacio-temporal de fenómenos redox intracelulares que afecten la relación GSSG/GSH.

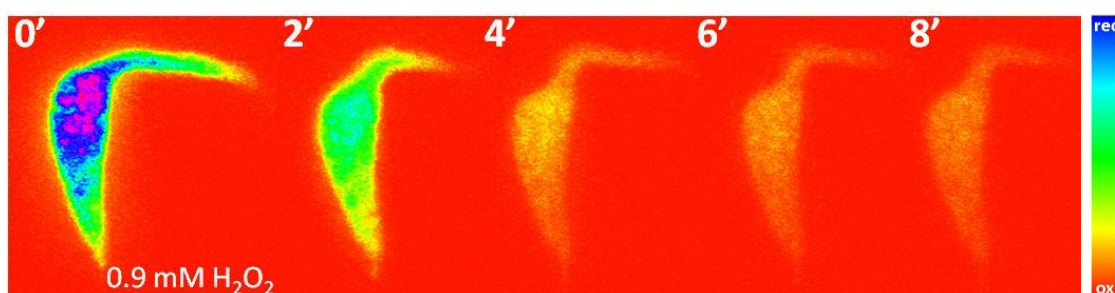


Figura 65. Monitoreo en tiempo real de cambios redox intracelulares para la forma no infectiva de *T. cruzi* sometida a estrés oxidativo con H_2O_2 . Imagen de microscopia confocal ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ 480/510 nm) de un parásito viable inmovilizado sobre medio semisólido y tratado con un bolo de peróxido de hidrógeno de $\sim 0,9$ mM. Cada una de las imágenes resulta de la composición de 23 fotos tomadas en distintos planos Z (espesor total: 8 μm) y sobre las cuales se aplicó una escala redox de pseudocolor que va del rojo (biosensor totalmente oxidado) al azul (biosensor totalmente reducido).

Con el fin de avanzar en la caracterización de los parásitos redox reporteros de *T. cruzi* y su aplicación futura a estudios de interacción huésped-patógeno, se procedió a verificar la capacidad infectiva y expresión de la hGrx-roGFP2 por parte de las líneas transgénicas generadas en las cepas Adriana y CL-Brener.

Para la línea reportera generada en la cepa Adriana, la forma infectiva extracelular y altamente invasiva de células de mamíferos, tripomastigota, se obtuvo por diferenciación espontánea por estrés metabólico (cultivos envejecidos) en presencia de tetraciclina. Con

estos cultivos se procedió a la infección de monocapas de líneas celulares de origen humano (HEK-293, *human embryonic kidney*) y primate (VERO, *African green-monkey kidney epithelial cells*) conservando la presencia del inductor de la expresión de la hGrx-roGFP2 durante este proceso y en los días posteriores. Al cabo de 24 h se pudieron observar formas amastigotas (redondeadas y no flageladas) en el interior de ambas líneas celulares las cuales presentaban fluorescencia correspondiente a GFP (Fig. 66). La expresión del biosensor se logró mantener por al menos 72 h post-infección.

Si bien no se realizaron estudios cuantitativos y comparativos de infectividad con líneas celulares salvajes o no inducidas, estos experimentos preliminares permiten confirmar que la línea reportera de la cepa Adriana conserva capacidad infectiva y de amastigogénesis.

Los estudios realizados sobre la línea reportera de la cepa CL-Brener que se describen a continuación fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Radi (CEINBIO, Facultad de Medicina, UdelaR) y la asistencia de la Lic. Carolina Prolo y la Dra. Ma. Noél Alvarez. Los parásitos *T. cruzi* CL-Brener hGrx-roGFP2 fueron diferenciados por técnica de privación de nutrientes (cultivo axénico). Tres x 10⁸ epimastigotas fueron resuspendidos e incubados por 2 h en 1 mL de medio TAU, luego diluidos 1/100 en medio TAU 3AAG retomando la incubación a 25°C por 96 h (protocolo de Alvarez et al., 2011). Con los tripomastigotas obtenidos se realizaron infecciones de macrófagos murinos (línea celular J774) previamente activados con interferón gamma (IFN- γ) y lipopolisacárido (LPS) durante 4:30 h y posterior lavado con DMEM previo a la incubación con los parásitos.

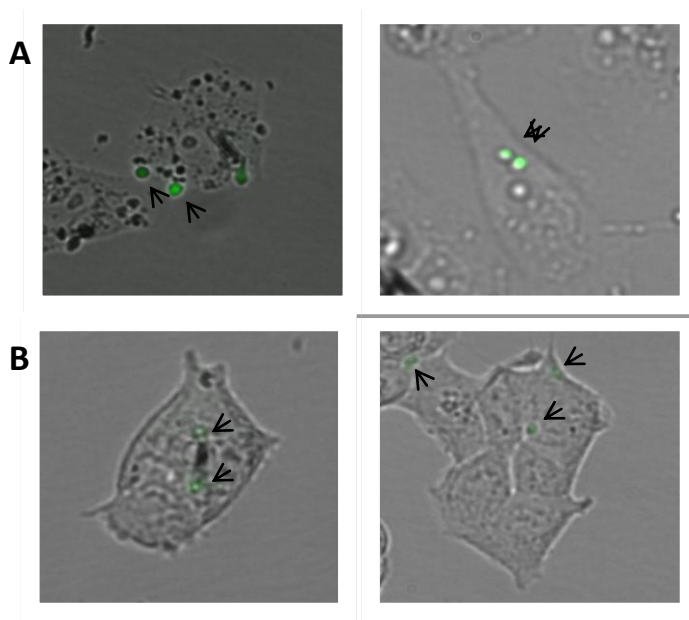


Figura 66. Expresión de hGrx-roGFP2 en formas amastigotas de *T. cruzi* cepa Adriana. Imagen de células VERO (panel superior) y HEK-293 (panel inferior) conteniendo formas amastigotas de *T. cruzi* hGrx-roGFP2 indicadas con flechas negras. Las imágenes corresponden a la superposición de fotos de campo claro y fluorescencia (filtro U-MNIBA3: λ_{ex} 470-495nm / λ_{em} 510-550nm) adquiridas en microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81) y trabajadas con el programa Adobe Illustrator.

Durante el proceso de diferenciación y cada 24 h se agregó tetraciclina fresca a una concentración final de 1 µg/ml. En una primera instancia, las determinaciones de intensidad de fluorescencia de la roGFP2 fueron realizadas en un lector de placas (VARIOSKAN) a diferentes tiempos post-infección, para ello luego de 15 min de incubación de los macrófagos J774 con los tripomastigotas se procedió al lavado de la placa para eliminar los parásitos que quedaron en suspensión al no invadir las células. Bajo estas condiciones se obtuvo un nivel de fluorescencia muy bajo. En principio este fenómeno podría estar causado por: 1) una tasa de infección baja de los macrófagos, y por lo tanto un número reducido de parásitos que emiten señal fluorescente y/o 2) una extinción (por protonación del cromóforo) o disminución específica (por oxidación) de la fluorescencia del biosensor expresado por los parásitos internalizados, y/o 3) un silenciamiento de la expresión del biosensor (degradación o fenómeno epigenético).

De manera complementaria, los ensayos de infección fueron monitoreados por técnica de microscopia de epifluorescencia. Macrófagos activados con LPS e IFN-γ tratados o no con un inhibidor de la NADPH oxidasa (NOX) y con un inhibidor de la iNOS fueron incubados con tripomastigotas de *T. cruzi* hGrx-roGFP2 cepa CL-Brener. Al cabo de 2 h de incubación, las células fueron fijadas y los ácidos nucleicos teñidos con DAPI, y luego varios campos de estas muestras fueron observados en un microscopio Olympus IX81 (filtros 460-490 para DAPI y 510-550 nm para GFP). Las monocapas de macrófagos fueron sembradas en dos placas en paralelo, donde se testearon por duplicado cada una de las condiciones antes mencionadas, en una de las placas y previo a la fijación se realizó el bloqueo de tioles con NEM 20 mM. Para todos los experimentos, macrófagos inducidos, iNOS⁺ e iNOS⁻ y NOX⁺ y NOX⁻ se trabajó con el mismo número de macrófagos expuestos a un número idéntico de tripomastigotes.

Fue posible detectar la presencia de tripomastigotes en el interior de la célula huésped, reconocidos mediante la tinción con DAPI, tanto en las muestras provenientes de macrófagos activados y con actividad de NOX inhibida o no, como en muestras de macrófagos activados con actividad de iNOS o no (Fig. 67 A, B y C). En todos los casos se observó un porcentaje alto (~ 40%) de parásitos internalizados carentes de señal de fluorescencia para la roGFP2. En principio esto estaría demostrando que la tasa de infección de las células es el adecuado y que la nula a baja señal del biosensor integrado al genoma del patógeno tendría otro origen. Por otro lado, si para ambas condiciones de infección se compara el nro. de parásitos intracelulares que presentan señal para roGFP2 se puede apreciar que cada 50 macrófagos infectados se observó un promedio de 10 tripomastigotas con señal GFP en los NOX⁻ contra 4 en los NOX⁺, y 8 tripomastigotas con señal GFP en los iNOS⁻ contra 4 en los iNOS⁺ (Fig. 68 A, B y C). Estos resultados indican que la inactivación de la NOX o la iNOS promueven la proliferación del parásito en macrófagos activados, lo cual concuerda con la importante función de ambas enzimas en la eliminación de patógenos mediante la generación de estrés oxidativo en células fagocíticas (Alvarez et al., 2004), (Prolo et al., 2014).

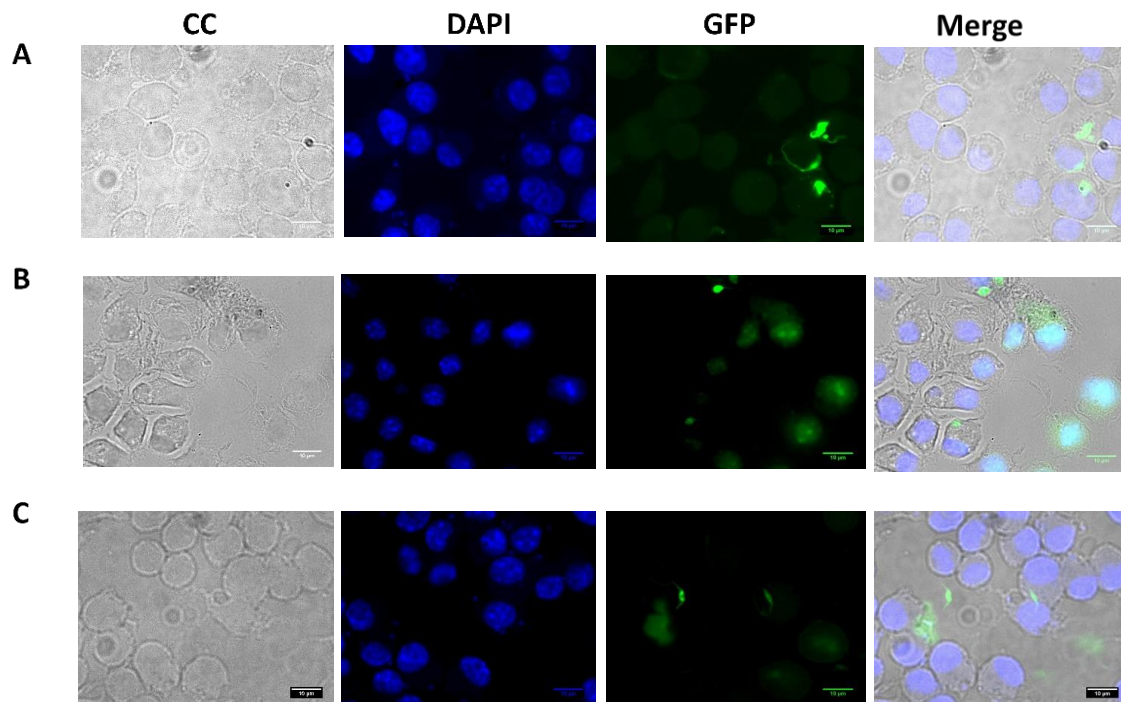


Figura 67. Infección de macrófagos murinos con tripomastigotes de *T. cruzi* hGrx-roGFP2 cepa CL-Brener. Imágenes de epifluorescencia de macrófagos J774 activados con LPS e IFN y (A) no tratados o tratados con (B) un inhibidor de la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) o (C) un inhibidor de la NOX (NADPH oxidasa), y en los tres casos incubados durante 2 h con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa CL-Brener hGrx-roGFP2. La expresión del biosensor fue inducida con 1 µg/ml de tetraciclina durante todo el proceso de diferenciación de epi- a tripomastigota y durante las 2 h de infección. CC: campo claro, DAPI: tinción de ADN (azul, filtro λ_{em} 460-490 nm), GFP: señal de hGrx-roGFP2 (verde, filtro λ_{em} 510-550 nm) y Merge: superposición de las imágenes de CC, DAPI y GFP.

De todas formas, el hecho que en macrófagos con NOX inhibida se observe un porcentaje mayor de parásitos sin señal roGFP2 sugiere que procesos no redox estarían contribuyendo de manera adicional a “apagar” al biosensor.

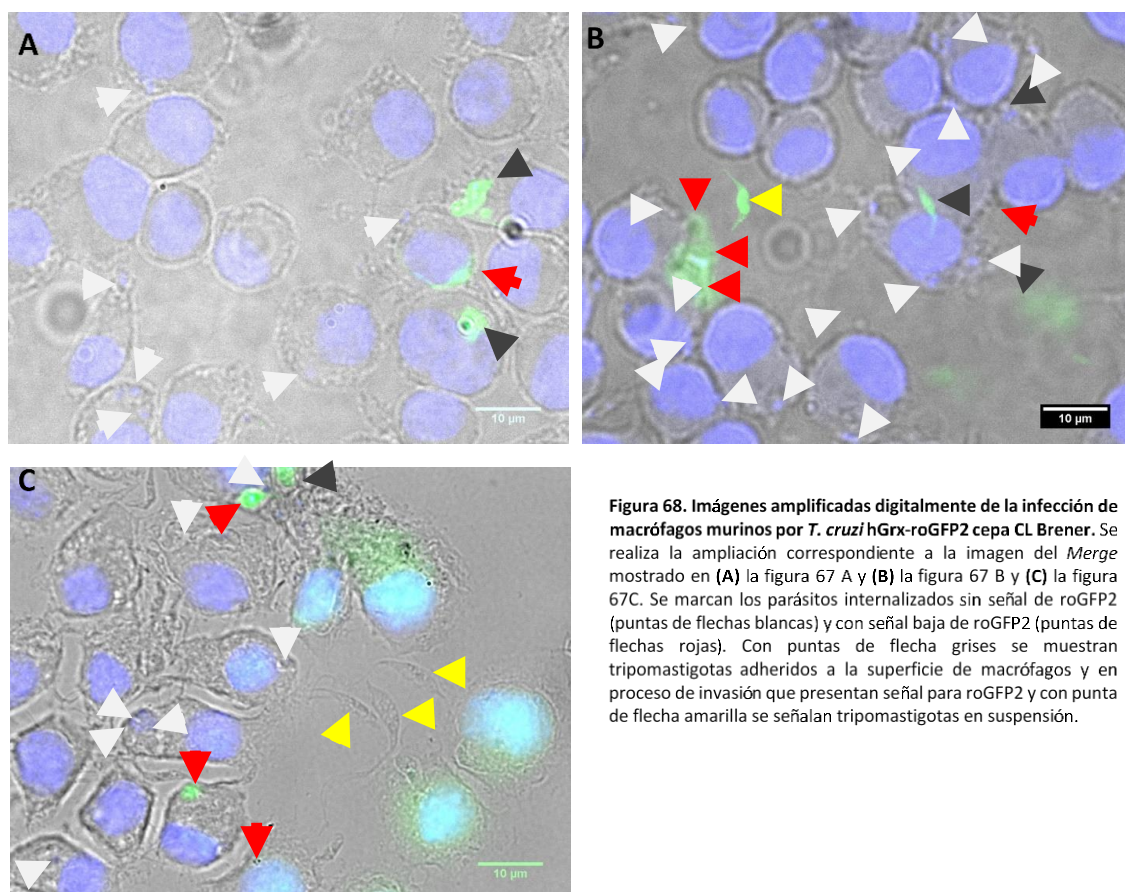


Figura 68. Imágenes amplificadas digitalmente de la infección de macrófagos murinos por *T. cruzi* hGrx-roGFP2 cepa CL Brener. Se realiza la ampliación correspondiente a la imagen del Merge mostrado en (A) la figura 67 A y (B) la figura 67 B y (C) la figura 67C. Se marcan los parásitos internalizados sin señal de roGFP2 (puntas de flechas blancas) y con señal baja de roGFP2 (puntas de flechas rojas). Con puntas de flecha grises se muestran tripomastigotas adheridos a la superficie de macrófagos y en proceso de invasión que presentan señal para roGFP2 y con punta de flecha amarilla se señalan tripomastigotas en suspensión.

Como se mostró en la sección 4.3.2, la expresión del biosensor por la cepa CL Brener presenta una elevada heterogeneidad, por lo que es probable que una fracción de los parásitos que no emiten fluorescencia corresponda a la población no expresante de la hGrx-roGFP2. No obstante debe tenerse en cuenta que esta solo representaba <20% de la población total de células, por lo que debemos considerar otros factores adicionales como responsables de la pérdida de señal del biosensor.

T. cruzi invade células mediante reclutamiento y fusión a lisosomas en la membrana plasmática o por invaginación de la membrana plasmática (endosoma) seguido de fusión intracelular a lisosomas, residiendo así de manera transitoria en una vacuola con características de lisosoma (Andrade et al., 2004); (De Souza et al., 2010). Tanto esta vacuola como el fagolisosoma propiamente dicho presentan un bajo pH (pH ~5; (Levitz et al., 1999); (Andreoli et al., 2003), y si bien el parásito cuenta con eficientes bombas de protones para conservar su pH intracelular (Mukkada et al. 1989); (Zilberstein et al., 1985); (Zilberstein et al., 1989) un descenso de dos unidades en el pH podría producir una disminución de hasta un 40% en la fluorescencia de la roGFP2 por protonación de residuos del cromóforo (Gutscher et al., 2004); (Schwarländer et al., 2015). Por otro lado, el proceso de diferenciación de tripomastigota a amastigota implica una importante transformación y remodelación celular. Se ha reportado que este proceso se acompaña de un incremento

temprano y marcado de la actividad proteolítica por parte de la vía ubiquitina-proteasoma, se han identificado a las proteínas de la estructura flagelar (principalmente las proteínas paraflagelares, PAR) y a las proteínas del citoesqueleto (tubulina) como proteínas principalmente degradadas (De Diego et al., 2001). Por lo tanto, es posible especular que un evento de este tipo pueda contribuir a la degradación acelerada de la hGrx-roGFP2 durante las fases iniciales de la diferenciación, y luego que esta culmine y la actividad del complejo proteolítico retorne a niveles basales, se recuperen buenos niveles del biosensor tal como se observó en amastigotas infectando células VERO y HEK-293 (Fig. 66). A pesar que el sistema empleado para la expresión de la hGrx-roGFP2 es inducible y por lo tanto independiente de señales genómicas que podrían afectar su funcionamiento, no podemos descartar fenómenos epigenéticos o postranccripcionales transitorios (nuevamente asociados al proceso temprano de diferenciación) como responsables del silenciamiento de la expresión del biosensor (Taylor et al., 2006).

Si bien se requieren estudios adicionales para identificar la causa del “apagado” de la señal del biosensor redox en parásitos internalizados, estos resultados preliminares destacan el valor de esta herramienta para llevar a cabo estudios de interacción huesped-patógeno enfocados en el papel del metabolismo redox en procesos de señalización, diferenciación y evasión de respuesta.

4.5.2 Infecciones de ratón con *T. brucei* hGrx-roGFP2

Con el fin de validar la aplicabilidad del biosensor hGrx-roGFP2 para llevar a cabo estudios *in vivo*, se utilizó la línea redox reportera de *T. b. brucei* (subespecie no patógena para humanos) teniendo en cuenta que es un muy buen modelo de estudio de la infección aguda provocada por *T. b. rhodesiense* en humanos. El modelo murino de tripanosomiasis africana por *T. b. brucei* se usa de rutina en nuestro laboratorio (Manta et al., 2013), (Hiller et al., 2014), (Musunda et al., 2015), (Bonilla et al., 2016)

T. brucei es un patógeno intracelular que reside principalmente en la sangre y otros fluidos del huésped mamífero. Si bien este parásito es capaz de invadir el sistema nervioso central, y de ese modo colonizar el líquido cefalorraquídeo, el modelo que se empleó (cepa monomórfica, la cual presenta una replicación descontrolada y tiempos cortos de desarrollo de la infección) es de infección aguda donde el parásito se encontrará en sangre en altos niveles.

Para llevar a cabo los estudios *in vivo* se infectaron 4 hembras de ratones cepa BALB/cJ con parásitos *T. brucei* hGrx-roGFP2 (clon A1) que previamente fueron crecidos por 24 h en presencia o ausencia de 1 µg/mL oxitetraciclina. La inducción de la expresión *in vivo* del biosensor se llevó a cabo mediante la alimentación de los ratones infectados con agua conteniendo oxitetraciclina (1 mg/mL). El grupo control incluyó 2 animales infectados con parásitos no inducidos y por lo tanto no alimentados con oxitetraciclina. La expresión del biosensor fue evaluada por citometría de flujo sobre muestras de sangre tomadas a los

días 4, 7 y 9 post-infección (Figura 69). Si bien se detectó expresión del biosensor hasta el día 9 inclusive post-infección, ya al día 4 post-infección se observó la presencia de dos poblaciones con diferentes niveles en intensidad de fluorescencia para la roGFP2. Tomando como referencia los controles realizados con los parásitos inducidos y no inducidos utilizados para la infección, la población mayoritaria corresponde a células con nula o muy baja intensidad fluorescencia del biosensor y la minoritaria (~35%) a parásitos con niveles de fluorescencia similares a los determinados en células con máxima inducción *in vitro* (Fig. 69 A y B). Si bien esta misma relación se mantuvo al día 7 post-infección, a las posteriores 48 h (día 9) se notó la desaparición de la población de células que emitían fluorescencia, estando aun presente la correspondiente a células con nula o muy baja intensidad fluorescencia de hGrx-roGFP2 (Fig. 69 C y D). La pérdida de fluorescencia en los parásitos redox reporteros durante el curso de la infección puede deberse a: (1) un fenómeno redox originado por la respuesta oxidativa montada por el sistema inmune del animal, (2) que la concentración de oxitetraciclina (1 mg/mL) administrada a los animales no alcanza en plasma los niveles óptimos para lograr la máxima inducción de la expresión del biosensor y/o (3) la pérdida del control de expresión del biosensor por eliminación o silenciamiento del gen de la hGrx-GFP2 debido a que *in vivo* no se empleó presión selectiva (higromicina) para mantener su expresión.

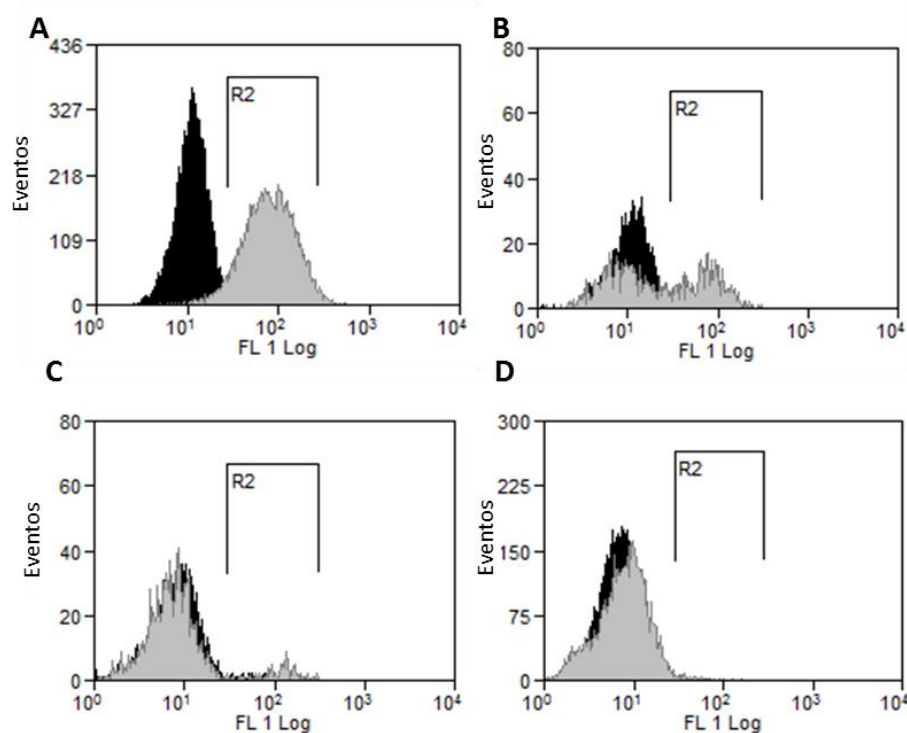


Figura 69. Análisis por citometría de flujo de *T. brucei* hGrx-roGFP2 aislado de ratones infectados. Parásitos *T. brucei* hGrx-roGFP2 fueron analizados por citometría de flujo CyanADP (Dako) empleando un $\lambda_{Ex/Em}$ 488/500-570 nm a partir de muestras obtenidas de (A) cultivos en presencia y ausencia de tetraciclina que fueron empleadas para la infección de los respectivos grupos de animales (Día 0), y de parásitos aislados de muestras de sangre provenientes de ratones a los días (B) 4, (C) 7 y (D) 9 post-infección. Los glóbulos rojos de las muestras de sangre fueron lisados previos al análisis por citometría. Los resultados se grafican como histogramas del número de eventos celulares en función de la intensidad de fluorescencia (expresada en unidades Log₁₀) para parásitos provenientes de cultivos o ratones inducidos (gris) con 1 μ g/mL o 1mg/mL oxitetraciclina, respectivamente, o no inducidos (negro).

Para responder a esta pregunta, se realizó un tratamiento con 2 mM DTT de muestras de parásitos aislados al día 9 post-infección de animales alimentados con oxitet, dado que a este tiempo era donde se producía la negativización completa de una población de parásitos que días anteriores presentaba fluorescencia para roGFP2. Frente al agregado del agente reductor, un 30% de la población que en la muestra no reducida no mostraba fluorescencia ahora pasó a emitir señal (Fig. 80), alcanzando un nivel de fluorescencia media muy similar al obtenido *in vitro* para cultivos inducidos (Fig. 79A). Este resultado sugiere que en ese momento de la infección los parásitos estaban sometidos a un fuerte estrés oxidativo generado por mecanismos de defensa innatos del animal.

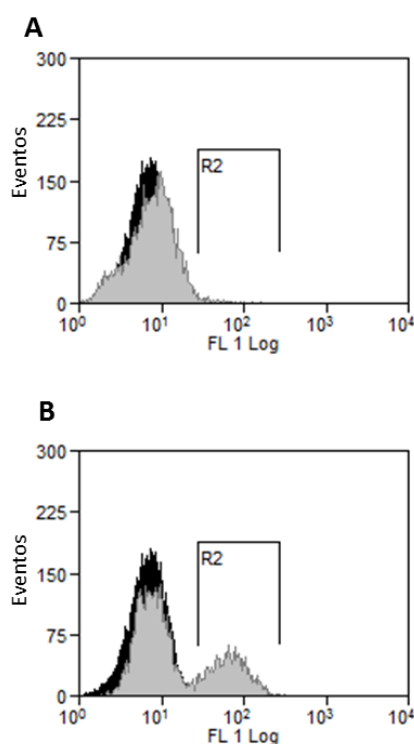


Figura 70. Análisis por citometría de flujo de *T. brucei* hGrx-roGFP2 aislado de ratones infectados al día 9 post-infección. Muestras de sangre provenientes de ratones infectados con *T. brucei* hGrx-roGFP2 fueron extraídas al día 9 post-infección, **(A)** no tratadas y **(B)** luego de 5 min de tratamiento con 2 mM DTT. Previo al análisis de las muestras en el citómetro de flujo CyanADP (Dako) con $\lambda_{Ex/Em}$ 488/500-570 nm, los glóbulos rojos fueron lisados. Los datos se presentan como histogramas del número de eventos celulares en función de la intensidad de fluorescencia (expresada en unidades Log_{10}) para parásitos provenientes de ratones alimentados (gris) con 1 mg/mL oxitetraciclina o no (negro).

La infección por *T. brucei* da lugar a la activación de linfocitos T-independientes y T-dependientes de células B como respuesta a las moléculas VSG expuestas en la superficie del parásito. Los linfocitos T activados liberan IFN- γ el cual activa a los macrófagos presentes en diferentes tejidos a producir una gran cantidad y variedad de factores tripanocidas como las especies reactivas del nitrógeno y el oxígeno, así como citoquinas citotóxicas como el TNF- α , todos los cuales contribuyen al control de la infección mediante

la eliminación de parásitos circulantes. Los macrófagos son la primera línea de defensa junto con las células dendríticas, donde la activación mediada por receptor representa uno de los primeros eventos de la respuesta inmune innata, provocando liberación de citoquinas pro-inflamatorias que inicia la respuesta inflamatoria (Mansfield et al., 2005). Trabajos en modelos animales de tripanosomiasis africana en modelo murino han reportado que el pico de la respuesta innata ocurre aproximadamente al día 7 post-infección (Namangala et al., 2012), (Nishimura et al., 2011), (Salmon et al., 2012) y se sostiene por al menos una semana, lo cual coincide con la marcada oxidación del biosensor redox observada en torno a ese tiempo nuestros experimentos.

Estos experimentos nos permitieron validar el uso *in vivo* de esta línea reportera aunque, como se indicó en secciones anteriores, sería conveniente mejorar los niveles de expresión del biosensor para aumentar la capacidad de detección de perturbaciones redox a nivel intracelular.

4.6 Aplicación de las líneas redox reporteras de *T. brucei* y *T. cruzi* a la evaluación de actividad biológica de compuestos químicos

4.6.1 Antecedentes previos

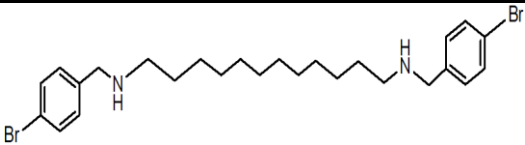
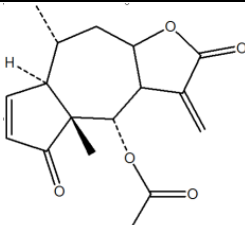
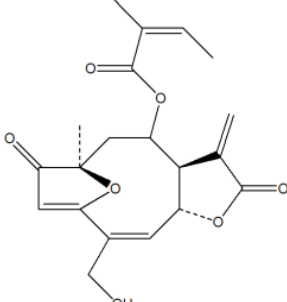
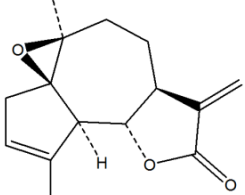
Trabajos de investigación previos desarrollados en nuestro laboratorio y que emplearon la línea reportera *T. brucei* hGrx-roGFP2 permitieron identificar varios compuestos cuya actividad anti-tripanosoma estuvo asociada a una marcada oxidación del biosensor (Ref: “Evaluación de la actividad bioquímica y biológica anti-tripanosoma de una quimioteca” 2016. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay y Biosíntesis de tripanotión en *Trypanosoma cruzi*: validación biológica de su potencial como blanco terapéutico contra la enfermedad de Chagas” 2014 PEDECIBA Biología, Uruguay). En esta tesis de Maestría se propuso investigar el modo de acción de derivados de lactonas sesquiterpénicas (Dr. T. Schmidt, Universidad de Muenster, Alemania), de diamino bencenos (Dr. G. Labadie, Universidad Nacional de Rosario, Argentina) y de paulonas (Dr. C. Kunick, Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania), priorizando la validación de dichos resultados así como la obtención de datos cuantitativos por parte de la sonda redox.

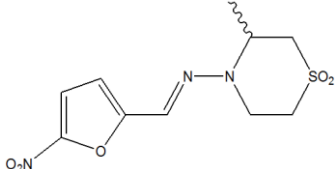
4.6.2 Aproximación al modo de acción de ciertos compuestos sobre la forma infectiva de *T. brucei* de la línea reportera hGrx-roGFP2

Con la finalidad de indagar sobre el mecanismo de acción de algunos compuestos destacados que surgieron de los trabajos mencionados anteriormente, seleccionamos siete derivados de diaminas *N,N'*-bis(bencil)-sustituidas (DAB; (Caminos et al., 2012) y tres derivados de una lactona de sesquiterpeno (STL; (Schmidt et al., 2009) (Tabla 2). La primera serie de compuestos fue originalmente reportada como potentes inhibidores de la proliferación de distintas especies de tripanosomátidos (CE50 submicromolar; (Caminos et

al., 2012) y presentan un núcleo estructural (cadena alifática con grupos aminos terminales sustituidos) que los convierte en candidatos a interferir con la función de proteínas que sinteticen o dependan del uso de poliaminas. En ese sentido, nuestro grupo mostró recientemente que un análogo de DAB, el EAP1-47 agregado a 100 nM (la mitad de su CE_{50}) disminuye un 30% los niveles de tripanotión en la forma infectiva de *T. brucei* (Benitez et al., 2016). En el caso de los derivados de STL, estos compuestos son de origen natural y fueron previamente reportados como altamente activos ($CE_{50} < 1 \mu M$) contra diferentes hemo parásitos (*T. brucei rodhesiense*, *L. donovani*, *L. major*, *T. cruzi* y *Plasmodium falciparum*; (Oketch-Rabah et al., 1998); (Schmidt et al., 2002); (Nour et al., 2009); (Schmidt et al., 2009).

Tabla 3 Lista de compuestos evaluados por ensayo semi-automatizado contra la forma infectiva de *T. brucei* línea reportera hGrx-roGFP2. En la siguiente tabla se presentan los 10 compuestos evaluados y el fármaco control nifurtimox (NFX). Los compuestos de la serie APC y EAP corresponden a diamina N, N'-bis (bencil)-sustituidas (DAB) mientras que los TS refieren a lactonas sesquiterpénicas (STL) con enlaces carbono α - β insaturados.

Compuesto	Núcleo Estructural	Estructura	CE_{50} referencia * (μM)
APC 1-71	DAB		0,062 ^b
APC 1-87			0,097 ^b
APC 1-89			0,168 ^b
APC 1-99			0,139 ^b
APC 1-101			0,189 ^b
APC 1-119			0,113 ^b
EAP 1-63			0,08 ^a
TS1	STL		~ 0,6 ^a
TS2			~ 5 ^a
TS3			~ 0,5 ^a

NFX	NF		5,3 ^b
-----	----	---	------------------

^a Fiestas L. 2014. Tesis de Maestría. PEDECIBA

^b (Benitez et al., 2016)

Gran parte de la actividad de las STL reside en la presencia de un elemento estructural (carbonilo) α,β -no saturado que lo convierte en un grupo aceptor de Michaels (Schmidt et al., 2009), altamente reactivo contra moléculas nucleofílicas como suelen ser los tioles redox activos de proteínas o compuestos de bajo peso molecular (ej: GSH, T(SH)₂). Dado que recientemente fue aprobado el uso clínico de nifurtimox para el tratamiento de la tripanosomiasis humana africana (<http://www.dndi.org/treatments/nect/>, Alirol E. et al 2014) y que el mecanismo de acción propuesto para este compuesto involucra la generación de un nitrilo no saturado de cadena abierta que funciona como un potente aceptor de Michaels capaz de reaccionar con diversos componentes celulares (entre ellos, residuos de cisteína; (Hall et al., 2011), es que decidimos incluirlo como fármaco control en los estudios de validación biológica de mecanismo de acción.

En primer lugar y para descartar una interferencia directa (ej. oxidación, extinción de fluorescencia) de los compuestos sobre el biosensor redox, se realizaron mediciones de fluorescencia de la hGrx-roGFP2 recombinante en presencia de los compuestos a concentraciones superiores a las emplearse luego en los ensayos biológicos. Los espectros de excitación correspondientes fueron registrados por medio del equipo Cary Variant (descrito en la sección 3.5) y el valor del fotomultiplicador fijado a un valor de manera tal que la intensidad de fluorescencia del pico correspondiente a una excitación de 488 nm del control se encontrara en un 50% de la escala en el eje y (Fig. 71 A, B y C).

Como se puede apreciar en la Fig. 71 ninguno de los compuestos de la serie DAB (2 μ M) y STL (1-20 μ M) y Nfx (12,5 μ M) afectó de manera significativa la fluorescencia del biosensor, ni presentó autofluorescencia que solapara con la de la roGFP2. Únicamente a concentraciones elevadas de los compuestos TS1 (20 μ M) y TS3 (10 y 20 μ M) se pudo observar un ligero aumento (25% y 35%, respectivamente) en el ratio 405/488 nm indicando una oxidación directa del biosensor por los mismos. Se observó que frente al agregado de 2 mM DTT este aumento en la intensidad de fluorescencia fue revertido prácticamente hasta el valor del control sin tratar (Fig. 71C).

La aproximación empleada para determinar si el mecanismo de acción de estos compuestos podía implicar una interferencia con el metabolismo redox del parásito consistió en evaluar la intensidad de fluorescencia del biosensor redox hGrx-roGFP2 expresado por la forma infectiva de *T. brucei*. Si el blanco de acción de estos compuestos implicara la acción directa, como oxidación o conjugación, sobre los tioles de bajo peso molecular o bien afectara la actividad de proteínas implicadas en la síntesis y reducción de

tripanotión, de NADPH o la defensa contra oxidantes, se espera que esto resulte en un desbalance redox y una consecuente disminución en la intensidad de fluorescencia del biosensor que debería guardar relación con la concentración de dicho compuesto y ser reversible por el agregado de un agente reductor permeable a membrana.

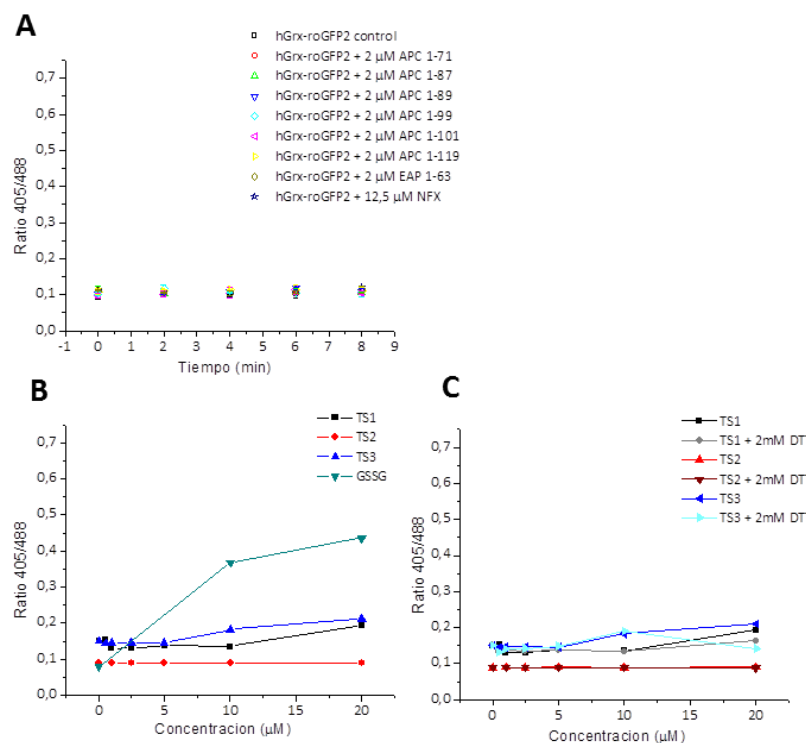


Figura 71. Evaluación del efecto de los compuestos DAB y STL *in vitro* sobre hGrx-roGFP2 recombinante. Las gráficas muestran la relación de intensidad de fluorescencia a 510 nm de la hGrx-roGFP2 recombinante (1 μM) para λ_{ex} de 405 nm y 488 nm, y que fue incubada **(A)** durante 8 min con 2 μM de los compuestos DAB y 12,5 μM nifurtimox (NFX), **(B)** durante 10 min con diferentes concentraciones (0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 y 20 μM) de TS1, TS2 y TS3, y **(C)** frente al agregado de 2 mM DTT para evaluar la reversión de la oxidación del biosensor. Como condición control el biosensor fue oxidado con 10 y 20 μM GSSG.

La actividad biológica de los compuestos en estudio fue evaluada utilizando medidas multiparamétricas (permeabilidad de membrana, volumen y granulosidad celular, y fluorescencia de roGFP2) por técnica de citometría de flujo (descrito en la sección 3.8; Fig. 72). Para los estudios biológicos se empleó la línea reportera redox de *T. brucei* no inducida e inducida por 48 h con tetraciclina y los compuestos DAB agregados a concentraciones correspondientes a 1X y 10X su CE_{50} , de STL y nifurtimox ensayados a concentraciones de 1,25 μM, 5 μM y 20 μM durante distintos tiempos (2-24 h) y como se detalla más abajo para cada caso. Se incluyó un control positivo de viabilidad que consistió en el agregado de DMSO (disolvente de compuestos) a una concentración final de 1% v/v, que corresponde a la empleada en los test de actividad biológica con todos estos compuestos.

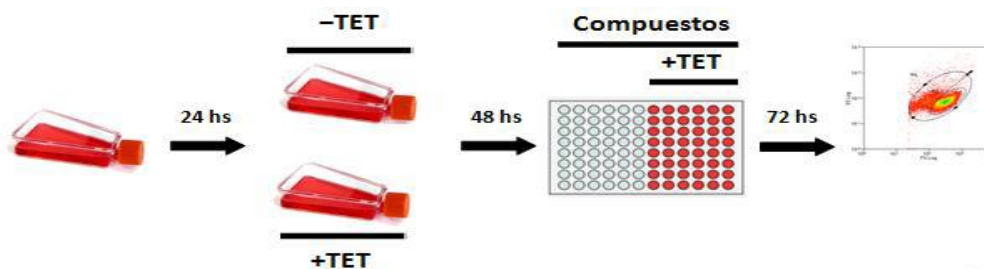


Figura 72. Esquema del ensayo semi-automatizado para evaluación de actividad biológica de compuestos contra *T. brucei*. El ensayo se realiza en placa de cultivo de 96 o 24 pocillos sobre la línea celular 449 hGrx-roGFP2 de la forma infectiva de *T. brucei*. 48 h previo al inicio del ensayo y cada 24 h se realizan pasajes sucesivos de los parásitos mediante siembra a una densidad de 5×10^5 células/mL en medio de cultivo fresco. En el segundo de estos pasajes, uno de estos cultivos recibe 1 $\mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina para inducir la expresión de hGrx-roGFP2. Al cabo de 24 h de inducción, en cada uno de los pocillos se colocan los compuestos disueltos en DMSO o el propio disolvente (control) y luego 0,2 mL (placa de 96 pocillos) o 1 mL (placa de 24 pocillos) del cultivo de parásitos resuspendido en medio fresco (con o sin oxitetraciclina, según corresponda) a una densidad de 5×10^5 parásitos/mL. Luego las placas se incuban por 24 h, y el recuento de células y las determinaciones de intensidad de fluorescencia para el biosensor (para $\lambda_{\text{ex/em}}$ 488/510-550 nm) y el colorante de exclusión ioduro de propidio ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 488/500-560) se realizaron en un equipo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences).

Para los compuestos de la serie DAB, en primer lugar se notó que los mismos presentaban una menor potencia anti-tripánocida que la determinada anteriormente (Charquero 2014) dado que el porcentaje de citotoxicidad para todos ellos fue inferior al 15% cuando estos fueron ensayados a sus correspondientes CE_{50} (Fig. 73). No obstante, a concentraciones 10X su CE_{50} todos los compuestos ejercieron un efecto citotóxico $\geq 70\%$. Las muestras no inducidas pero tratadas con los compuestos en iguales condiciones no muestran diferencias significativas en el % de citotoxicidad celular respecto al control no inducido e inducido sin tratar, por lo que la sobreexpresión del biosensor no estaría confiriendo resistencia contra los compuestos. La menor citotoxicidad de los compuestos podemos atribuirlo a que los mismos fueron sometidos a repetidos ciclos de congelamiento-descongelamiento lo cual puede haber afectado su integridad. Debido a la baja toxicidad de los compuestos agregados a su CE_{50} los análisis de fluorescencia del biosensor se realizaron sobre las células tratadas con 10X esa concentración. Excepto por el compuesto EAP1-63, el resto de los derivados de DAB produjo un descenso en la fluorescencia del biosensor de entre 30-45% (Fig. 73 B) en la población de parásitos que no presentaba daño de membrana, lo cual correspondería a aproximadamente el 10% de la población celular (Fig. 73A).

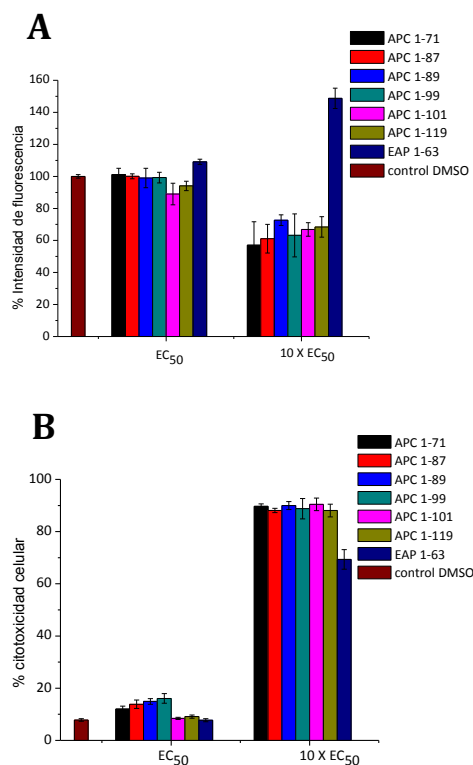


Figura 73. Actividad biológica de diaminas *N*, *N'*-bis (bencil)-sustituidas sobre la forma infectiva de *T. brucei* hGrx-roGFP2. La forma infectiva de *T. brucei* hGrx-roGFP2 (10^6 parásitos/mL) no inducida e inducida con 1 μ g/mL de oxitetraciclina por 48 h fue tratada con 7 derivados de DAB o 1% v/v DMSO (0 μ M) por 24 h. Los compuestos fueron ensayados a la concentración correspondiente a 1X y 10X sus CE₅₀. Las muestras fueron analizadas con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) empleando $\lambda_{Ex/Em}$ 488/530-560 nm. Los datos se grafican como % intensidad de fluorescencia, fijando en 100% el valor promedio correspondiente a la muestra sin tratar. Los valores de porcentaje de citotoxicidad se obtienen de gráficos biparamétricos (SSC vs FSC). **(A)** Efecto redox y **(B)** porcentaje de citotoxicidad para cada compuesto.

Empleando al nifurtimox como fármaco modelo, se observó que un tratamiento durante 2 h con concentraciones crecientes del mismo duplicó el porcentaje de células muertas (de 2,5% para el control no tratado a ~5% para 1,25-20 μ M Nfx; Fig. 74A), si bien el valor global de citotoxicidad fue bajo, como era de esperarse para una incubación corta de los parásitos al fármaco. Respecto del control no tratado, en este rango de concentraciones y tiempo de exposición, Nfx produjo un incremento del 8-16% en la intensidad de fluorescencia del biosensor, el cual fue significativo ($p=0,023$, test t unpaired, Graphpad). Extendiendo el tratamiento de los parásitos con Nfx a 24, el porcentaje de citotoxicidad se incrementó a un 19-21% para las diferentes concentraciones del fármaco, mientras que en el cultivo control este alcanzó un 14%, no guardando una relación proporcional con las diferencias en citotoxicidad observadas al cabo de 2 h de exposición. A pesar de la relativamente baja toxicidad inducida por Nfx bajo estas condiciones de ensayo, fue significativa la disminución (30-40%) en la intensidad de fluorescencia del biosensor en la población de células viables tratadas con 1,5 a 20 μ M del compuesto. Dado que Nfx no afecta de manera directa la fluorescencia de la hGrx-roGFP2 (Fig. 74) y que la oxidación intracelular del biosensor inducida por el fármaco fue revertida por el tratamiento con DTT (2 mM durante 5 min) podemos confirmar a través de esta herramienta que el mecanismo de acción de este compuesto implica la generación de un importante desbalance redox

intracelular en tripanosomas africanos. Tal como se propuso en trabajos realizados por otros grupos, este desequilibrio en la homeostasis redox se originaría por una marcada depleción de tioles dado el fuerte carácter electrofílico del nitrilo insaturado (el subproducto de Nfx luego de su reducción por nitroreductasas del parásito; Hall et al. 2011) y no por la producción de ROS por parte del mismo (Boiani et al., 2010).

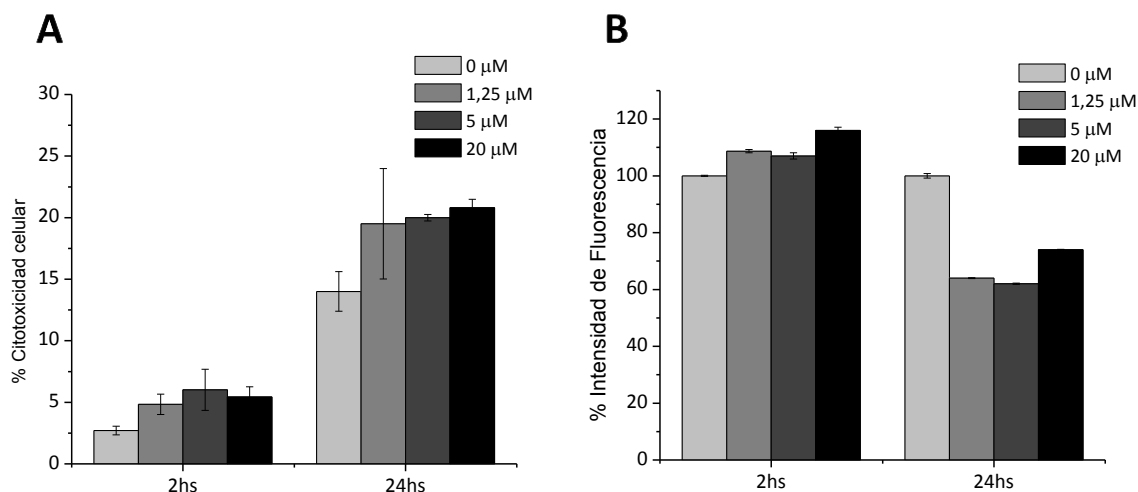


Figura 74. Actividad biológica de nifurtimox sobre la forma infectiva de *T. brucei* hGrx-roGFP2. La forma infectiva de *T. brucei* hGrx-roGFP2 (10^6 parásitos/mL) no inducida e inducida con 1 μ g/mL de oxitetraciclina por 48 h fue tratada con diferentes concentraciones (1,25-20 μ M) de nifurtimox (NFX) o 1% v/v DMSO (0 μ M) por 2 y 24 h. Las muestras fueron luego analizadas con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) empleando $\lambda_{Ex/Em}$ 488/530-560 nm. Los datos se grafican como % intensidad de fluorescencia, fijando en 100% el valor promedio correspondiente a la muestra sin tratar. Los valores de porcentaje de citotoxicidad se obtienen de gráficos biparamétricos (SSC vs FSC). **(A)** Efecto citotóxico y **(B)** efecto redox del nifurtimox a las 2 y 24 h de tratamiento.

La actividad biológica de los derivados de STL fue ensayada sobre *T. brucei* a concentraciones idénticas o 2 a 40 veces superiores a sus CE_{50} (CE_{50} ~0.5 μ M para TS1 y TS3, y 5 μ M para TS2) y en tratamientos que se extendieron por 2 h dado que a las 24 h de tratamiento se observó una marcada muerte celular. De los tres STL, los compuestos TS1 y TS3 presentaron una marcada actividad anti-tripanosoma la cual mostró un comportamiento dosis-dependiente para ambos tiempos de exposición (Fig. 75A). Al comparar la citotoxicidad de ambos compuestos ensayados a idénticas concentraciones, puede notarse que TS3 presenta una citotoxicidad 15% (para 1,25 μ M) a 30% (para 5 o 20 μ M) superior a la de TS1. El compuesto TS2 ensayado a una concentración de 1, 2 y 4X su CE_{50} (5 μ M) mostró una actividad anti-tripanosoma despreciable (~1% superior al del control no tratado) al cabo de 2 h de incubación (Fig. 74). Al analizar los datos de intensidad de fluorescencia del biosensor en la población de células que no presentan daño de membrana (ioduro de propidio negativas) se observa lo siguiente por comparación a los correspondientes controles sin tratar (Fig. 74 A y C), TS1: a ninguna de las concentraciones ensayadas se observan cambios significativos en la intensidad de fluorescencia del biosensor, TS2: disminución de hasta un 17% de la intensidad de fluorescencia del biosensor de manera dosis-dependiente, y TS3: produjo un descenso

marcado de la fluorescencia del biosensor que fue directamente proporcional a la concentración del mismo (ej. 9% para 1,25 μM , 24% para 5 μM y 74% para 20 μM). El origen redox de estos cambios en la intensidad de fluorescencia del biosensor pudo verificarse mediante el agregado de DTT (2 mM por 5 min), tratamiento que restableció los niveles de fluorescencia a niveles similares a los de la muestra sin tratar con STL (Fig. 74 B). Aquí también vale la pena destacar que la magnitud de la oxidación del biosensor inducida dentro de los parásitos por TS2 (5-17% de 5-20 μM) y TS3 (9-74% de 1,25-20 μM) fue superior a la observada *in vitro* (0% de 5-20 μM TS2 y 2-35% de 5-20 μM TS3), reforzando la idea que estos compuestos están afectando el balance redox intracelular.

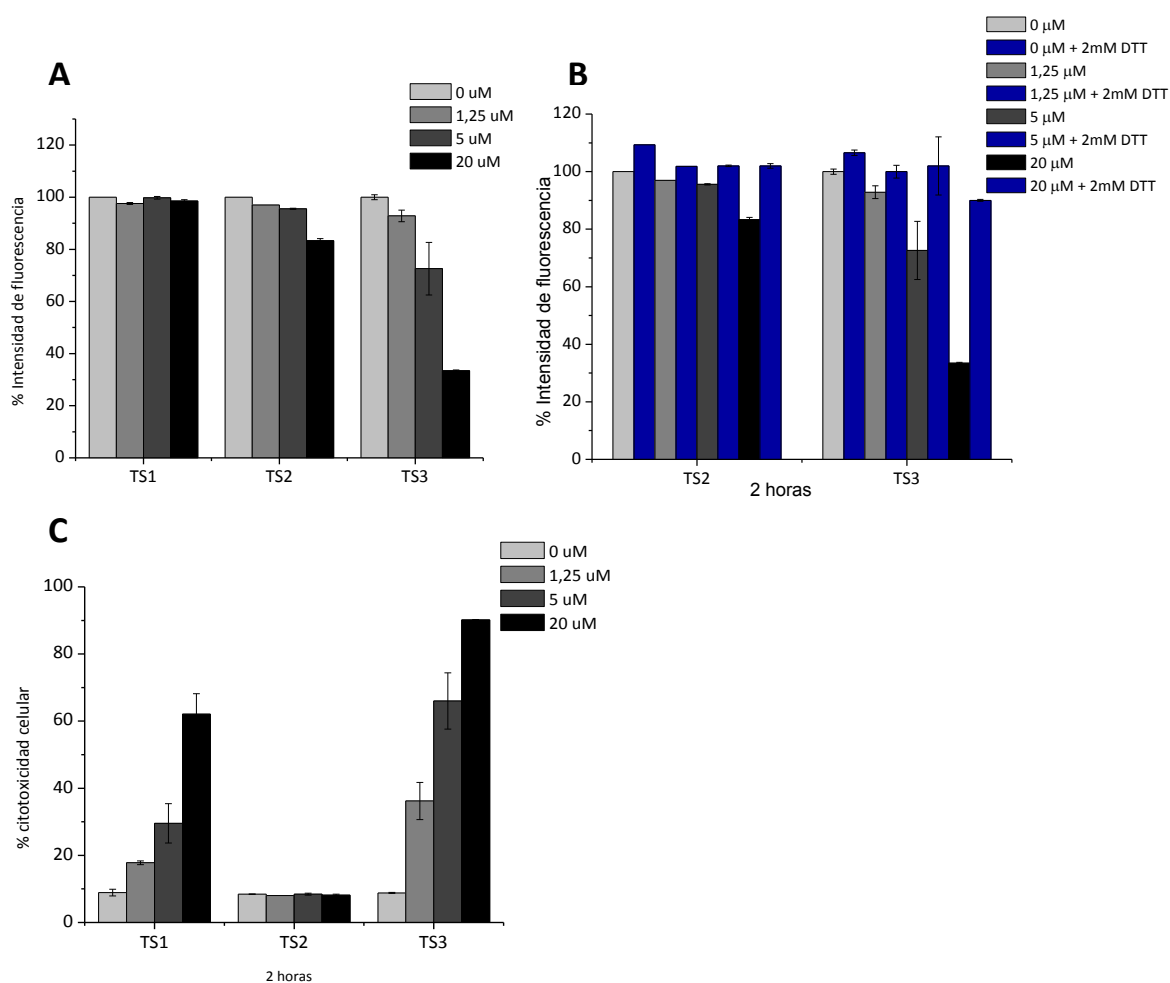


Figura 74. Actividad biológica de lactonas sesquiterpeno sobre la forma infectiva de *T. brucei* hGrx-roGFP2. La forma infectiva de *T. brucei* hGrx-roGFP2 (10^6 parásitos/mL) no inducida e inducida con 1 $\mu\text{g/mL}$ de oxitetraciclina por 48 h fue tratada con diferentes concentraciones (1,25-20 μM) de TS1, TS2 y TS3 o 1% v/v DMSO (0 μM) por 2 h. Las muestras fueron luego analizadas con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) empleando $\lambda_{\text{Ex/Em}}$ 488/530-560 nm. Los datos se grafican como % intensidad de fluorescencia, fijando en 100% el valor promedio correspondiente a la muestra sin tratar. Los valores de porcentaje de citotoxicidad se obtienen de gráficos biparamétricos (SSC vs FSC). Efecto redox de los STL sobre *T. brucei* (A) pre- y (B) post-tratamiento con DTT 2 mM durante 5 min. (C) Efecto citotóxico de los STL sobre *T. brucei*.

A partir de estos resultados podemos concluir que la actividad parasiticida de TS3, y en menor medida de TS2, estaría relacionada a una interferencia de este compuesto con funciones celulares dependientes del T(SH)₂. Por ejemplo, estos compuestos podrían estar formando aductos con GSH y T(SH)₂, conduciendo a su rápida depleción a nivel intracelular, como se describió recientemente para la cinaropicrina (Zimmermann et al., 2013), una lactona sesquiterpénica con un grupo metileno α,β insaturado. Algunos de estos aductos, por ej. los formados con T(SH)₂, lograron inhibir a la TR (Zimmerman et al., 2013). Tampoco podemos descartar que estos compuestos estén actuando sobre blancos adicionales, como otras proteínas (enzimas) que utilicen tripanotión y/o presenten tioles críticos para su función. Estudios futuros abordarán algunos de estos interrogantes mediante el análisis del *pool* de tioles de bajo peso molecular en parásitos tratados con los compuestos así como la potencial inhibición de enzimas del metabolismo del tripanotión por aductos entre STL y GSH o T(SH)₂.

En resumen, estos experimentos pilotos permiten validar la utilidad de esta herramienta para realizar el cribado fenotípico de compuestos que junto con el dato de citotoxicidad ofrecen una aproximación al mecanismo de acción de los compuestos con actividad anti-tripanosoma.

4.6.3 Aproximación al modo de acción de benznidazol y nifurtimox sobre *T. cruzi* Cl-Brener hGrx-roGFP2

Benznidazol y nifurtimox son los fármacos utilizados en el tratamiento de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas y su modo de acción en *T. cruzi* ha sido explorado mediante diferentes aproximaciones que van de la bioquímica a la metabolómica (Faundez et al., 2005); (Maya et al., 1997); (Hall et al., 2012), (Boiani et al., 2010); (Trochine et al., 2014). Estos trabajos han mostrado claramente que el modo de acción de estos heterociclos nitroaromáticos implica alteraciones en el metabolismo redox del parásito, en particular la disminución del nivel de tioles (reducidos) de bajo peso molecular a partir de reacciones de oxidación y/o conjugación con metabolitos de estos compuestos. Los compuestos nitro-heterocíclicos se caracterizan por presentar un grupo nitro unido a un anillo aromático. Estos compuestos incluyen el amplio espectro de los antibióticos nitrofurano y nitroimidazol, los cuales son efectivos contra una gran variedad de bacterias y de infecciones parasitarias (Raether et al., 2003). Estos agentes o compuestos actúan como prodrogas, deben ser activadas mediante enzimas dentro del patógeno para que manifiesten un efecto citotóxico, estas reacciones son catalizadas por las nitroreductasas (NTRs) (Wilkinson et al., 2008). Las NTRs pueden dividirse en dos grupos, dependiendo de la necesidad de oxígeno. Las NTRs tipo I, son sensibles al oxígeno y funcionan por una serie de reducciones vía 2 electrones. Las clases II median la reducción del grupo nitro vía un electrón generando un nitroradical inestable. En presencia de oxígeno, este radical genera superóxido con la regeneración del compuesto nitro. En

tripanosomas, se ha propuesto que la activación de los compuestos Nfx y Bzn está dada por una NTR tipo II (Docampo et al., 1990); (Wilkinson et al., 2008).

De manera tal de confirmar dichas evidencias y el valor de la herramienta generada en este trabajo para identificar compuestos que interfieran con el metabolismo redox de este patógeno, es que se procedió a evaluar si nifurtimox y benznidazol producen cambios redox intracelulares en *T. cruzi* CL-Brener que sean detectados por el biosensor hGrx-roGFP2.

En primer lugar y para descartar una interferencia directa (ej. oxidación, extinción de fluorescencia) del benznidazol sobre el biosensor redox, se realizaron mediciones de fluorescencia de la hGrx-roGFP2 recombinante en presencia de concentraciones correspondiente a la CE_{50} de este fármaco. Los espectros de excitación correspondientes fueron registrados por medio del equipo Cary Variant (descrito en la sección 3.5) y el valor del fotomultiplicador fijado a un valor de manera tal que la intensidad de fluorescencia del pico correspondiente a una excitación de 488 nm del control se encontrara en un 50% de la escala en el eje y (Fig. 75).

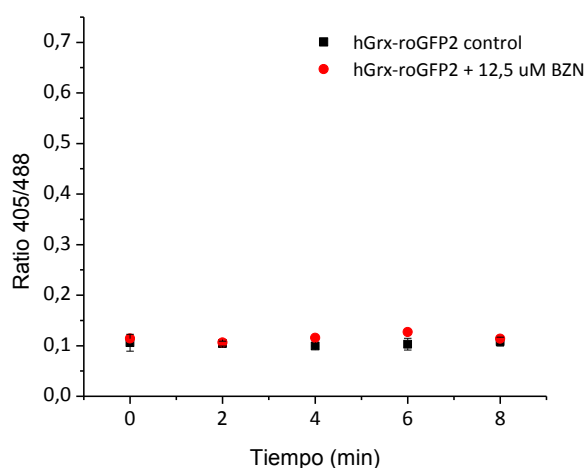


Figura 75. Evaluación del efecto de benznidazol sobre el biosensor hGrx-roGFP2 recombinante. La gráfica muestra la relación de intensidad de fluorescencia a 510 nm obtenida a partir de los picos de excitación a λ 405 y 488 nm para la hGrx-roGFP2 recombinante (1 μ M) incubada durante 8 min con 12,5 μ M de benznidazol (BZN).

Epimastigotas de la línea reportera redox de *T. cruzi* CL-Brener fueron tratados con diferentes concentraciones de los nitro-heterociclos por 24 h y tanto la citotoxicidad (daño de membrana) como la intensidad de fluorescencia de la hGrx-roGFP2 (ratio 405/488nm) fueron evaluadas por citometría de flujo en un equipo FACSaria FUSION (BD) (ver sección 3.8).

Como se observa en la Figura 76, ambos fármacos mostraron un efecto citotóxico sobre *T. cruzi* que fue dosis dependiente (Fig. 76A) e indujeron un incremento dosis-dependiente y de similar magnitud en la relación 405/488 nm que indica un 25% y un 50% de oxidación del biosensor para Nfx y Bzn, respectivamente (Fig. 76B). Dado que se trató de una

medición ratiométrica no se incluyó un tratamiento con agente reductor, por lo tanto estos resultados aportan evidencias adicionales a que el mecanismo de citotoxicidad de los nitro-heterocíclicos sobre *T. cruzi* implica, entre otros posibles blancos, un desbalance redox intracelular.

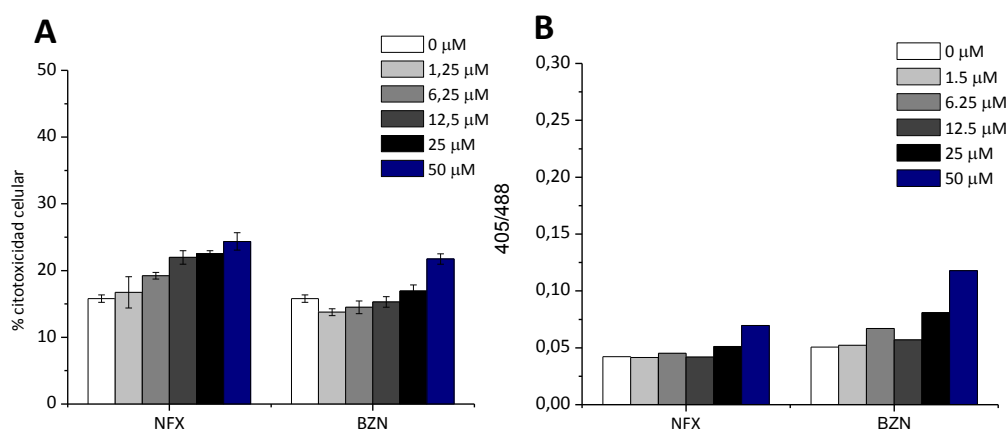


Figura 76. Evaluación de la actividad biológica de nifurtimox y benznidazol contra *T. cruzi* hGrx-roGFP2 cepa CL-Brener. Parásitos en fase exponencial fueron tratados por 24 h con diferentes concentraciones (1,25-50 μM) de nifurtimox (NFX) y benznidazol (BZN). Cada una de las condiciones fue ensayada por triplicado. Los datos fueron adquiridos en un equipo FACSaria FUSION (BD) empleando $\lambda_{Ex/Em}$ 488/530-560 nm y $\lambda_{Ex/Em}$ 405/525-575 nm. Se grafica la relación 405/488 la cual representa la intensidad de fluorescencia emitida a 510 nm luego de excitar 405 y 488 nm. El procesamiento estadístico de estos datos da un error menor al 10%. Los valores de citotoxicidad porcentual se calcularon a partir de gráficos biparamétricos de SSC vs. FSC. **(A)** Citotoxicidad celular y **(B)** efecto redox de los nitroheterociclos.

5. Conclusiones y Perspectivas

Los tripanosomátidos poseen un metabolismo redox con características únicas ya que es controlado por un (di) tiol de bajo peso molecular ausente en mamíferos, el tripanotión. Un gran número de funciones celulares que en otros organismos requieren del aporte de poder reductor a partir de la transferencia de electrones por intercambio tiol/disulfuro por el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa y glutatión/glutatión reductasa, en estos protozoos dependen de tripanotión.

No existían hasta la fecha reportes que indiquen el empleo de biosensores redox (proteínas fluorescentes redox-sensibles) para monitorear la homeostasis redox en parásitos patógenos para el ser humano y el ganado, como son *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*.

En tripanosomas, el glutatión y el tripanotión conforman el principal tampón redox de estos parásitos al alcanzar concentraciones intracelulares de 0.2-1 mM y contar con un sistema enzimático dedicado a mantenerlos en su estado reducido. La respuesta *in vitro* del biosensor hGrx-roGFP2 a la dupla redox GSSG/GSH fue significativamente mas sensible y específica que la obtenida contra la forma oxidada de tripanotión. La mayor sensibilidad de hGrx-roGFP2 contra el disulfuro de glutatión se explica por la presencia de la hGrx en el biosensor, una enzima especializada en catalizar la transferencia del estado redox de GSH a diferentes proteínas blanco, en este caso a la roGFP2. No obstante, nuestros resultados muestran que la reacción de oxidación espontanea del módulo sensor (roGFP2) por TS₂ es superior a la del GSSG y que la 2CGrx1 del parasito acelera la reacción a expensas del disulfuro de tripanotión. Por otro lado comprobamos que si bien la reacción de reducción de la roGFP2 puede ocurrir por reacción directa de Grx, esta reaccin no compite con la que depende de GSH. Consideramos también relevante el poder demostrar que esta misma reacción en presencia de T(SH)₂ no es catalizada por ninguna de estas Grx ni tampoco por la principal oxidoreductasa de estos organismos, la TXN. Estos estudios bioquímicos nos permiten elaborar sobre la respuesta del biosensor en el complejo escenario del sistema redox del parasito. En ensayos de corta duración (min), la oxidación de la hGrx-roGFP2 señalara el incremento en la relación GSSG/GSH, y en menor medida podría estar dosando el nivel de TS₂, a partir de la reacción catalizada por la 2CGrx1 endógena, si el estímulo condujera a un incremento marcado de este disulfuro. No obstante, dado que los tripanosomátidos carecen de actividad GR y la 2CGrx1 podría funcionar como tal a nivel citosólico, es de esperar que un incremento en la relación TS₂/T(SH)₂ se traduzca en un aumento correlativo en los niveles de GSSG/GSH, que serían rápida y específicamente detectados por la hGrx-roGFP2. Para las determinaciones que se realizan a tiempos donde se espera alcanzar nuevas condiciones de equilibrio estacionario (por ej. estadios del crecimiento o diferenciación definidos, estímulo-respuesta a tiempos prolongados) el biosensor estará reportando una medida del contenido de especies de bajo peso molecular oxidadas (GSSG y TS₂). Por otro lado, la recuperación de la forma reducida del biosensor puede tener lugar a partir de la acción de Grx (hGrx o 2CGrx1) sea por reacción directa, menos eficiente, o indirecta, más eficiente, empleando GSH como cofactor redox.

De todas formas, la carencia de GR vuelve a determinar que el poder reductor para regenerar al GSH dependa de la relación $TS_2/T(SH)_2$, por lo que incluso la fase de reducción del biosensor es una estimación indirecta del estado de redox de este par tiol/disulfuro.

Por lo tanto consideramos que a pesar de la especificidad de la hGrx-roGFP2 por GSSG/GSH, este biosensor expresado en los tripanosomátidos estará aportando una medición indirecta y global sobre el estado del *pool* $TS_2/T(SH)_2$.

Con el fin de obtener un biosensor con mayor selectividad por $TS_2/T(SH)_2$ intentamos generar un mutante de la 2CGrx1 que fuera incapaz de unir centros ferrosulfurados con su cisteína redox activa y retuviera actividad oxidoreductasa. Si bien se logró cumplir con el último objetivo la 2CGrx1 R53F conservó la capacidad de ligar *cluster* Fe/S. Trabajos futuros tendrán por objetivo profundizar esta línea mediante el empleo de otra isoforma de Grx de tripanosomas, la 2CGrx2, como proteína de fusión o bien de nuevos mutantes de 2CGrx1.

Generamos y caracterizamos con éxito líneas celulares transgénicas de la forma infectiva de *T. brucei* y de la forma no-infectiva de *T. cruzi*, las cuales poseen integrado en su genoma de manera estable el gen de hGrx-roGFP2. La expresión del biosensor por parte de parásitos *T. b. brucei* fue marcadamente inferior a la lograda en cepas de *T. cruzi*, y si bien esto no impidió la realización de diversos ensayos, estos estuvieron limitados a lecturas por técnica de citometría de flujo. Este aspecto será abordado en trabajos futuros tendientes a trabajar con sistemas optimizados de expresión (nuevos pares célula/vector o codones optimizados del biosensor). La expresión del biosensor en *T. cruzi* mostró altos niveles y un llamativo nivel de heterogeneidad. En ese sentido, experimentos futuros de selección celular tendrán por objetivo investigar si este fenotipo refleja verdaderas variaciones en la expresión, por ej. ciclo-celular dependiente, o bien una mezcla de parásitos expresantes y no expresantes pero con resistencia a la selección. Independientemente de las características que presentaron las líneas reporteras, todas ellas fueron capaces de detectar cambios redox intracelulares de manera rápida (min) y reversible, sea esta espontánea o inducida. En general la respuesta a diferentes estímulos oxidantes guardó una relación directa con la dosis y el mecanismo de acción o potencial del oxidante. Estas herramientas nos permitieron explorar de manera preliminar el rol de la 2CGrx1 en el metabolismo redox de la forma infectiva de *T. brucei*, pudiendo establecer que esta proteína conecta el *pool* citosólico del GSSG/GSH con el del TS_2/TSH_2 y que contribuye a brindar resistencia al estrés oxidativo en tiempos cortos. A partir de estos resultados pudimos inferir que el parásito cuenta con mecanismos robustos de adaptación a la ausencia de actividad GR y 2CGrx1, que podrían involucrar otras oxidoreductasas como la 2CGrx2 del espacio intermembrana de mitocondria, la cual podría suplir la función de GR (ya que las especies de bajo peso molecular pueden acceder fácilmente a ese compartimento) no así tal vez la de (de) glutationilación de proteínas del citosol. Ensayos de infección con las líneas reporteras de *T. cruzi* sobre modelos celulares de interés biológico nos permitieron confirmar el importante rol de la respuesta oxidativa de células

fagocíticas en el control de la infección en etapas tempranas de la invasión. Además pudimos demostrar que el ONOOH es capaz de oxidar de manera muy eficiente, comparable a la observada para GSSG en nuestras condiciones de ensayo, a la hGrx-roGFP2, lo cual abre varios interrogantes en cuanto a la selectividad de este biosensor e invita a una cuidadosa interpretación de los resultados derivados de sistemas (biológicos) donde se espera que esta especie nitrogenada este presente. De todas formas, creemos que es necesario realizar estudios cinéticos más detallados para poder valorar con mayor precisión el verdadero impacto de nuestros resultados.

Un resultado de gran relevancia fue el poder demostrar la aplicabilidad de la línea reportera de *T. b. brucei* para llevar a cabo estudios *in vivo* en un modelo de infección murino. Logramos detectar la expresión del biosensor bajo condiciones fisiológicas (*ex vivo*, parásitos aislados de animales infectados) y comprobamos que la misma no altera la infectividad y virulencia del patógeno. Totalmente compatible con el curso del proceso infeccioso y los mecanismos de defensa montados por el huésped, el biosensor indicó que el patógeno está sometido en el medio extracelular (sangre, plasma) a un alto grado de oxidación. Estos resultados son de gran relevancia dado que posibilitan la realización de estudios de monitoreo de cambios redox intracelulares aplicados a entender el proceso de interacción huésped-patógeno así como la evaluación de compuestos y terapias en modelos de infección complejos. A futuro se planea extender estos trabajos al modelo de infección murino por *T. cruzi*, microorganismo para el cual se obtuvieron líneas reporteras con elevado nivel de expresión del biosensor.

En este trabajo se exploró el uso de las líneas reporteras para indagar sobre el potencial modo de acción de ciertos compuestos y fármacos. En ese sentido pudimos asociar, al menos en parte para una variedad de diaminas *N,N'*-bis(bencil)-sustituidas y en gran medida para ciertas lactonas de sesquiterpeno, que la actividad citotóxica de estos compuestos es causada por perturbaciones en el estado redox intracelular. Con estas herramientas confirmamos que el modo de acción de dos fármacos de uso clínico para tripanosomiasis africana (nifurtimox) y enfermedad de Chagas (nifurtimox y benznidazol) acarrea un importante desbalance redox en el patógeno. Estos resultados destacan la gran utilidad que estas líneas celulares podrían tener en ensayos de cribado fenotípico de alto contenido y procesividad, para identificar y caracterizar compuestos anti-tripanosomas con el potencial de interferir con la homeostasis redox del parásito.

En resumen, los estudios realizados en esta Tesis permitieron confirmar la hipótesis de trabajo que planteaba que era posible medir cambios redox intracelulares en tripanosomátidos empleando el biosensor redox hGrx-roGFP2. Por otro lado se cumplieron todos los objetivos planteados, habiéndose generado herramientas de trabajo (líneas reporteras redox) con gran potencial de aplicación tanto en estudios de investigación básica de la biología de tripanosomátidos, incluyendo la interacción con el hospedero a nivel celular y de organismo, así como al descubrimiento y caracterización de fármacos contra especies patogénicas.

6. Bibliografía

- Albrecht, S. C. (2011). In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis. *Cell Metabolism*, 14(6), 819–29. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.010>
- Albrecht, S. C. (2014). Redesign of genetically encoded biosensors for monitoring mitochondrial redox status in a broad range of model eukaryotes. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(3), 379–86. <http://doi.org/10.1177/1087057113499634>
- Alibu, V. P. (2006). The role of Trypanosoma brucei MRPA in melarsoprol susceptibility. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 146(1), 38–44. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.10.016>
- Alvarez, M. N. (2011a). Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: Consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6627–6640. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.167247>
- Alvarez, M. N. (2011b). Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6627–40. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.167247>
- Alvarez, M. N. (2004). Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to Trypanosoma cruzi. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 432(2), 222–232. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.015>
- Andrade, L. O. (2004). Lysosomal fusion is essential for the retention of Trypanosoma cruzi inside host cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(9), 1135–1143. <http://doi.org/10.1084/jem.20041408>
- Andreoli, W. K. (2003). Acidification modulates the traffic of Trypanosoma cruzi trypomastigotes in Vero cells harbouring Coxiella burnetii vacuoles. *International Journal for Parasitology*, 33(2), 185–197.
- Arias, D. G. (2013). Redox metabolism in Trypanosoma cruzi: functional characterization of tryparedoxins revisited. *Free Radical Biology & Medicine*, 63, 65–77. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.036>
- Ariyanayagam, M. R. (2001). Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(2), 189–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420105>
- Ariyanayagam, M. R. (2003). Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in Trypanosoma cruzi. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27612–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M302750200>
- Avrahami, D. (1995). A single-stranded DNA binding protein binds the origin of replication of the duplex kinetoplast DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(November), 10511–10515. <http://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10511>
- Bacchi, C. J. (1979). Synthesis and Content of Polyamines in, 484–488.
- Back, P. (2012). Exploring real-time in vivo redox biology of developing and aging Caenorhabditis elegans. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(5), 850–859. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.037>
- Baker, J. J. (2014). Slow growth of Mycobacterium tuberculosis at acidic pH is regulated by phoPR and host-associated carbon sources. *Molecular Microbiology*, 94(1), 56–69. <http://doi.org/10.1111/mmi.12688>

- Barrett, M. P. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet (London, England)*, 362(9394), 1469–1480. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14694-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14694-6)
- Barrias, E. S. (2013). Trypanosoma cruzi: Entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in Immunology*, 4(AUG), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00186>
- Bartesaghi, S. (2007). Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids*, 32(4), 501–515. <http://doi.org/10.1007/s00726-006-0425-8>
- Beck, J. T. (1990). Nutritional requirements of wild-type and folate transport-deficient Leishmania donovani for pterins and folates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 43(2), 221–230.
- Bello, A. R. (1994). PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite Leishmania major. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11442–11446.
- Belousov, V. V. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide, 3(4), 281–286. <http://doi.org/10.1038/NMETH866>
- Benitez, D. (2016). Identification of Novel Chemical Scaffolds Inhibiting Trypanothione Synthetase from Pathogenic Trypanosomatids. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), e0004617. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004617>
- Berndt, C. (2007). How Does Iron – Sulfur Cluster Coordination Regulate the, 9(1).
- Berriman, M. (2005). The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), 416–22. <http://doi.org/10.1126/science.1112642>
- Bhaskar, A. (2014). Reengineering redox sensitive GFP to measure mycothiol redox potential of Mycobacterium tuberculosis during infection. *PLoS Pathogens*, 10(1), e1003902. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003902>
- Björnberg, O. (2006). Mechanistic insight provided by glutaredoxin within a fusion to redox-sensitive yellow fluorescent protein. *Biochemistry*, 45(7), 2362–71. <http://doi.org/10.1021/bi0522495>
- Boiani, M. (2010). Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against Trypanosoma cruzi: is oxidative stress involved? *Biochemical Pharmacology*, 79(12), 1736–45. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.009>
- Bonilla, M. (2016). Selenoproteins of African trypanosomes are dispensable for parasite survival in a mammalian host. *Molecular and Biochemical Parasitology*. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.03.002>
- Bouffard, J. (2008). A highly selective fluorescent probe for thiol bioimaging. *Organic Letters*, 10(1), 37–40. <http://doi.org/10.1021/ol702539v>
- Braun, N. A. (2010). The yeast CLC protein counteracts vesicular acidification during iron starvation. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 13), 2342–2350. <http://doi.org/10.1242/jcs.068403>
- Cabiscol, E. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 3(1), 3–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963327>
- Camino, A. P. (2012). Synthesis and antikinoplastid activity of a series of N,N'-substituted diamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(4), 1712–1715. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.101>
- Cao, X. (2011). A ratiometric fluorescent probe for thiols based on a tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin-coumarin scaffold. *The Journal of Organic Chemistry*, 76(18), 7423–7430.

<http://doi.org/10.1021/jo201199k>

- Cavalli, A. (2009). Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(23), 7339–59. <http://doi.org/10.1021/jm9004835>
- CDC, C. for disease C. and P. (2012). African Trypanosomiasis.
- Ceylan, S. (2010). The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 35224–37. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.165860>
- Chang, K. P. (1975). Heme biosynthesis in bacterium-protozoan symbioses: enzymic defects in host hemoflagellates and complemental role of their intracellular symbiotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(8), 2979–2983.
- Chattoraj, M. (1996). Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), 8362–8367.
- Chen, X. (2010). Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols. *Chemical Society Reviews*, 39(6), 2120–2135. <http://doi.org/10.1039/b925092a>
- Comini, M. A. (2007). Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *The Biochemical Journal*, 402(1), 43–9. <http://doi.org/10.1042/BJ20061341>
- Comini, M. A. (2008). Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27785–98. <http://doi.org/10.1074/jbc.M802010200>
- Comini, M. A. (2016). Measurement and meaning of cellular thiol:disulfide redox status. *Free Radical Research*, 50(2), 246–271. <http://doi.org/10.3109/10715762.2015.1110241>
- Comini, M. A. (2009). Preparative enzymatic synthesis of trypanothione and trypanothione analogues. *International Journal for Parasitology*, 39(10), 1059–1062. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.002>
- Comini, M. A. (2013). Trypanothione-Based Redox Metabolism of Trypanosomatids. *Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery*, 167–199. <http://doi.org/10.1002/9783527670383.ch9>
- Comini, M. A. (2012). Mono- and Dithiol Glutaredoxins in the Trypanothione-Based Redox Metabolism of Pathogenic Trypanosomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(7), 121025083704002. <http://doi.org/10.1089/ars.2012.4932>
- Comini, M. A. (2003). Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biological Chemistry*, 384(4), 653–6. <http://doi.org/10.1515/BC.2003.072>
- Corliss, J. O. (2001). Two most remarkable Amoeba men: Joseph Leidy (1823-1891) of Philadelphia and Eugene Penard (1855-1954) of Geneva. *Protist*, 152(1), 69–85. <http://doi.org/10.1078/1434-4610-00044>
- Couturier, J. (2009). Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *Journal of Biological Chemistry*, 284(14), 9299–9310. <http://doi.org/10.1074/jbc.M807998200>
- Couturier, J. (2011). Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin C5 as a model to explore molecular

- determinants for iron-sulfur cluster binding into glutaredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27515–27. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.228726>
- Crankshaw, M. W. (2001). Modification of cysteine. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.], Chapter 15, Unit15.1*. <http://doi.org/10.1002/0471140864.ps1501s03>
- Cruz, M. C. (2012). Trypanosoma cruzi: Role of δ -Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. *PLoS ONE*, 7(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0051804>
- De Diego. (2001). The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during Trypanosoma cruzi remodeling. *Biochemistry*, 40(4), 1053–1062. <http://doi.org/10.1021/bi001659k>
- De Souza, W. (2010). Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, 2010. <http://doi.org/10.1155/2010/295394>
- Delaunay, A. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO Journal*, 19(19), 5157–5166. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5157>
- Denicola, A. (1993). Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 304(1), 279–286. <http://doi.org/10.1006/abbi.1993.1350>
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3217–66. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>
- Deschamps, P. (2011, January). Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids. *Molecular Biology and Evolution*. United States. <http://doi.org/10.1093/molbev/msq289>
- Di Monte, D. (1984). Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 235(2), 334–342.
- Docampo, R. (1990). Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-Biological Interactions*, 73(1), 1–27.
- Dooley, C. T. (2004). Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22284–93. <http://doi.org/10.1074/jbc.M312847200>
- Dormeyer, M. (2001). Trypanothione-dependent Synthesis of Deoxyribonucleotides by Trypanosoma brucei Ribonucleotide Reductase *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10602–10606. <http://doi.org/10.1074/jbc.M010352200>
- Eckers, E. (2009). Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from Saccharomyces cerevisiae: the catalytic redox mechanism redux. *Biochemistry*, 48(6), 1410–23. <http://doi.org/10.1021/bi801859b>
- ELLMAN, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77.
- El-Sayed, N. M. (2005). The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), 409–415. <http://doi.org/10.1126/science.1112631>
- Elsiger, M. A. (1999). Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry*, 38(17), 5296–5301. <http://doi.org/10.1021/bi9902182>
- Fairlamb, A. H. (1989). Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 86(8), 2607–11. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=286966&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Fairlamb, A. H. (2003). Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in Parasitology*, 19(11), 488–494. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.002>
- Fan, Y. (2015). Monitoring redox dynamics in living cells with a redox-sensitive red fluorescent protein. *Analytical Chemistry*, 87(5), 2802–2810. <http://doi.org/10.1021/ac5041988>
- Faundez, M. (2005). Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 126–130. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.1.126>
- Filser, M. (2008). Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of *Trypanosoma brucei* monothiol glutaredoxin-1. *Biological Chemistry*, 389(1), 21–32. <http://doi.org/10.1515/BC.2007.147>
- Fratelli, M. (2002). Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3505–3510. <http://doi.org/10.1073/pnas.052592699>
- Goldberg, J. A. (2012). Calcium entry induces mitochondrial oxidant stress in vagal neurons at risk in Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 15(10), 1414–21. <http://doi.org/10.1038/nn.3209>
- Gommel, D. U. (1997). Catalytic characteristics of tryparedoxin. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 248(3), 913–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9342246>
- Grassetti, D. R. (1967). Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 119(1), 41–49.
- Gutscher, M. (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential, 5(6), 553–559. <http://doi.org/10.1038/NMETH.1212>
- Gutteridge, W. E. (1979). A re-examination of purine and pyrimidine synthesis in the three main forms of *Trypanosoma cruzi*. *The International Journal of Biochemistry*, 10(5), 415–422.
- Guzman, J. N. (2010). Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*, 468(7324), 696–700. <http://doi.org/10.1038/nature09536>
- Hall, B. S. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13088–13095. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.230847>
- Hall, B. S. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), 115–23. <http://doi.org/10.1128/AAC.05135-11>
- Hansen, J. M. (2006). Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 40(1), 138–45. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.023>
- Hansen, R. E. (2013). Quantifying changes in the cellular thiol-disulfide status during differentiation of B cells into antibody-secreting plasma cells. *International Journal of Cell Biology*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/898563>
- Hansen, R. E. (2009). Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2), 422–7.

<http://doi.org/10.1073/pnas.0812149106>

- Hanson, G. T. (2004). Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13044–53.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M312846200>
- Haunhorst, P. (2010). Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(2), 372–6.
<http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.016>
- Heim, R. (1995, February). Improved green fluorescence. *Nature*. ENGLAND.
<http://doi.org/10.1038/373663b0>
- Heller, J. (2012). Redox-sensitive GFP2: use of the genetically encoded biosensor of the redox status in the filamentous fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 13(8), 935–947.
<http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00802.x>
- Hiller, C. (2014). Cytosolic peroxidases protect the lysosome of bloodstream African trypanosomes from iron-mediated membrane damage. *PLoS Pathogens*, 10(4), e1004075.
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004075>
- Holmgren, A. (1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(19), 9627–9632.
- Hurd, T. R. (2009). Chapter 19 Measuring redox changes to mitochondrial protein thiols with redox difference gel electrophoresis (redox-DIGE). *Methods in Enzymology*, 456, 343–361.
[http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04419-4](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04419-4)
- Hurd, T. R. (2007). Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 22040–22051. <http://doi.org/10.1074/jbc.M703591200>
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, 57, 395–418.
<http://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>
- Irigoín, F. (2008). Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(6), 733–742.
<http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.028>
- Iwema, T. (2009). Structural Basis for Delivery of the Intact [Fe₂S₂] Cluster by Monothiol Glutaredoxin †, 6041–6043. <http://doi.org/10.1021/bi900440m>
- Ji, S. (2010). A highly selective OFF-ON red-emitting phosphorescent thiol probe with large stokes shift and long luminescent lifetime. *Organic Letters*, 12(12), 2876–2879.
<http://doi.org/10.1021/ol100999j>
- Jiang, K. (2006). Expression and Characterization of a Redox-Sensing Green Fluorescent Protein (Reduction-Oxidation-Sensitive Green Fluorescent Protein) in *Arabidopsis*, 141(June), 397–403.
<http://doi.org/10.1104/pp.106.078246.proaches>
- Johansson, C. (2011). The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. *The Biochemical Journal*, 433(2), 303–11.
<http://doi.org/10.1042/BJ20101286>
- Kasoz, D. (2013). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathogens*, 9(12), e1003782.
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003782>

- Kennedy, P. G. E. (2006). Human African trypanosomiasis-neurological aspects. *Journal of Neurology*, 253(4), 411–416. <http://doi.org/10.1007/s00415-006-0093-3>
- Kinoshita, T. (2008). Designing sleeping sickness control. *ACS Chemical Biology*, 3(10), 601–603. <http://doi.org/10.1021/cb800239p>
- Kojer, K. (2012). Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. *The EMBO Journal*, 31(14), 3169–82. <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.165>
- Kolossov, V. L. (2012). Experimental Biology and Medicine endoplasmic reticulum reveals highly oxidative environment, 237(6), 652–662. <http://doi.org/10.1258/ebm.2012.011436>
- Kolossov, V. L. (2011). Development of a high-dynamic range, GFP-based FRET probe sensitive to oxidative microenvironments. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 236(6), 681–91. <http://doi.org/10.1258/ebm.2011.011009>
- Kolossov, V. L. (2008). Engineering Redox-Sensitive Linkers for Genetically Encoded FRET-Based Biosensors. *Experimental Biology and Medicine*, 233(2), 238–248. <http://doi.org/10.3181/0707-RM-192>
- Koreny, L. (2010). Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? *International Journal for Parasitology*, 40(2), 149–156. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.11.007>
- Kosower, N. S. (1995). Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods in Enzymology*, 251, 123–133.
- Krauth-Siegel, R. L. (2007). The trypanothione system. *Subcell Biochem*, 44, 231–251.
- Krauth-Siegel, R. L. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(11), 1236–1248. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.006>
- Krauth-siegel, R. L. (1987). Trypanothione reductase from, 128, 123–128.
- Krauth-siegel, R. L. (2012). Low-Molecular-Mass Antioxidants in Parasites, 17(4). <http://doi.org/10.1089/ars.2011.4392>
- Krauth-Siegel, R. L. (2002). Trypanothione and tryparedoxin in ribonucleotide reduction. *Methods in Enzymology*, 347(1999), 259–266. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)47025-5](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)47025-5)
- Krieger, S. (2000). Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology*, 35(3), 542–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672177>
- Le, M. (1995). A procedure for the determination of monothiols in the presence of dithiothreitol--an improved assay for the reduction of disulfides. *Analytical Biochemistry*, 229(2), 264–271. <http://doi.org/10.1006/abio.1995.1411>
- Leichert, L. L. (2004). Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biology*, 2(11), e333. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020333>
- Levitz, S. M. (1999). Cryptococcus neoformans resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infection and Immunity*, 67(2), 885–890.
- Li, L. (2010). Structure of Arabidopsis chloroplastic monothiol glutaredoxin AtGRXcp. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 6), 725–32. <http://doi.org/10.1107/S0907444910013119>

- Lillig, C. H. (2005). Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8168–73. <http://doi.org/10.1073/pnas.0500735102>
- Lind, C. (2002). Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 406(2), 229–240.
- Lindemann, C. (2012). Quantitative redox proteomics: the NOxICAT method. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 893, 387–403. http://doi.org/10.1007/978-1-61779-885-6_24
- Liu, Y. (2014). Constructing a fluorescent probe for specific detection of cysteine over homocysteine and glutathione based on a novel cysteine-binding group but-3-yn-2-one. *The Analyst*, 139(16), 4081–4087. <http://doi.org/10.1039/c4an00639a>
- Liu, Z. (2012). Genetically encoded redox sensor identifies the role of ROS in degenerative and mitochondrial disease pathogenesis. *Neurobiology of Disease*, 45(1), 362–368. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.08.022>
- Lüdemann, H. (1998). Trypanosoma brucei tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Letters*, 431(3), 381–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714547>
- Maeda, H. (2006). 3'-(2,4-Dinitrobenzenesulfonyl)-2',7'-dimethylfluorescein as a fluorescent probe for selenols. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45(11), 1810–1813. <http://doi.org/10.1002/anie.200504299>
- Maeda, H. (2005). 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl fluoresceins as fluorescent alternatives to Ellman's reagent in thiol-quantification enzyme assays. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 44(19), 2922–2925. <http://doi.org/10.1002/anie.200500114>
- Mansfield, J. (2005). Regulation of innate and acquired immunity in African trypanosomiasis. *Parasite Immunology*, 27(July), 361–371. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3024.2005.00791.x/full>
- Manta, B. (2013). Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.
- Manta, B. (2013). Iron-sulfur cluster binding by mitochondrial monothiol glutaredoxin-1 of Trypanosoma brucei: molecular basis of iron-sulfur cluster coordination and relevance for parasite infectivity. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(7), 665–82. <http://doi.org/10.1089/ars.2012.4859>
- Marcello, L. (2007). Analysis of the VSG gene silent archive in Trypanosoma brucei reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure. *Genome Research*, 17(9), 1344–1352. <http://doi.org/10.1101/gr.6421207>
- Marr, J. J. (1978). Purine metabolism in Leishmania donovani and Leishmania braziliensis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 544(2), 360–371.
- Matsumoto, T. (2007). A thiol-reactive fluorescence probe based on donor-excited photoinduced electron transfer: key role of ortho substitution. *Organic Letters*, 9(17), 3375–3377. <http://doi.org/10.1021/ol071352e>
- Maya, J. D. (1997). Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of Trypanosoma cruzi. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 86(1), 101–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9178272>

- Meech, S. R. (2009). Excited state reactions in fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2922–34. <http://doi.org/10.1039/b820168b>
- Meyer, A. J. (2007). Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 52(5), 973–86. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03280.x>
- Meyer, A. J. (2010). Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(5), 621–50. <http://doi.org/10.1089/ars.2009.2948>
- Mitra, S. (2009). Oxidative Disassembly of the [2Fe-2S] Cluster of Human Grx2 and Redox Regulation in the Mitochondria †, 3813–3815. <http://doi.org/10.1021/bi900112m>
- Miyahira, Y. (2008). Trypanosoma cruzi infection from the view of CD8+ T cell immunity--an infection model for developing T cell vaccine. *Parasitology International*, 57(1), 38–48. <http://doi.org/10.1016/j.parint.2007.07.005>
- Montemartini, M. (1998). Sequence analysis of the tryparedoxin peroxidase gene from *Crithidia fasciculata* and its functional expression in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(9), 4864–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9478927>
- Moreira, D. (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1861–1875. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.63081-0>
- Morgan, B. (2011). Measuring E(GSH) and H₂O₂ with roGFP2-based redox probes. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(11), 1943–51. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.035>
- Morrison, L. J. (2014). DNA Recombination Strategies During Antigenic Variation in the African Trypanosome. *Mobile DNA III*, (1), 409–435. <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0016-2014>
- Moutiez, M. (1995). Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical Journal*, 310 (Pt 2), 433–437.
- Mugnier, M. R. (2015). The in vivo dynamics of antigenic variation in *Trypanosoma brucei*. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6229), 1470–1473. <http://doi.org/10.1126/science.aaa4502>
- Musunda, B. (2015). Glutaredoxin-deficiency confers bloodstream *Trypanosoma brucei* with improved thermotolerance. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 204(2), 93–105. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.02.001>
- Namangala, B. (2012). Contribution of innate immune responses towards resistance to african trypanosome infections. *Scandinavian Journal of Immunology*, 75(1), 5–15. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02619.x>
- Nare, B. (1997). The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13883–13891.
- Nie, L. (2003). Direct chemiluminescence determination of cysteine in human serum using quinine-Ce(IV) system. *Talanta*, 59(5), 959–964. [http://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00649-5](http://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00649-5)
- Nishimura, K. (2011). Effect of *Trypanosoma brucei brucei* on erythropoiesis in infected rats. *The Journal of Parasitology*, 97(1), 88–93. <http://doi.org/10.1645/GE-2522.1>
- Niwa, K. (2010). Applications of luciferin biosynthesis: Bioluminescence assays for l-cysteine and

- luciferase. *Analytical Biochemistry*, 396(2), 316–318. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.014>
- Noireau, F. (2009). Trypanosoma cruzi: Adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research*, 40(2). <http://doi.org/10.1051/vetres/2009009>
- Nok, A. J. (2005). Effective measures for controlling trypanosomiasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 6(15), 2645–2653. <http://doi.org/10.1517/14656566.6.15.2645>
- Nour, A. M. M. (2009). The antiprotozoal activity of sixteen asteraceae species native to Sudan and bioactivity-guided isolation of xanthanolides from Xanthium brasiliicum. *Planta Medica*, 75(12), 1363–1368. <http://doi.org/10.1055/s-0029-1185676>
- O'Donnell, K. C. (2013). WldS and PGC-1alpha regulate mitochondrial transport and oxidation state after axonal injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(37), 14778–14790. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1331-13.2013>
- Oketch-Rabah, H. A. (1998). Antiprotozoal properties of 16,17-dihydrobrachycalixolide from Vernonia brachycalix. *Planta Medica*, 64(6), 559–562. <http://doi.org/10.1055/s-2006-957514>
- Østergaard, H. (2001). Shedding light on disulfide bond formation: Engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO Journal*, 20(21), 5853–5862. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5853>
- Østergaard, H. (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *The Journal of Cell Biology*, 166(3), 337–45. <http://doi.org/10.1083/jcb.200402120>
- Ouellette, M. (2002). Pterin transport and metabolism in Leishmania and related trypanosomatid parasites. *International Journal for Parasitology*, 32(4), 385–398.
- Oza, S. L. (2005). Trypanothione biosynthesis in Leishmania major. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 139(1), 107–16. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.10.004>
- Piacenza, L. (2008). Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *The Biochemical Journal*, 410(2), 359–68. <http://doi.org/10.1042/BJ20071138>
- Piñeyro, M. D. (2011). Tryparedoxin peroxidases from Trypanosoma cruzi: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507(2), 287–95. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.014>
- Piñeyro, M. D. (2008). Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene*, 408(1-2), 45–50. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.014>
- Piñeyro, M. D. (2011). Molecular characterization and interactome analysis of Trypanosoma cruzi tryparedoxin 1. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1683–92. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.006>
- Prolo, C. (2014). Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *BioFactors (Oxford, England)*, 40(2), 215–225. <http://doi.org/10.1002/biof.1150>
- Pullela, P. K. (2006). Fluorescence-based detection of thiols in vitro and in vivo using dithiol probes. *Analytical Biochemistry*, 352(2), 265–273. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.047>
- Raether, W. (2003). Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research*, 90 Supp 1, S19–39. <http://doi.org/10.1007/s00436-002-0754-9>
- Rahlfs, S. (2001). Plasmodium falciparum possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37133–40. <http://doi.org/10.1074/jbc.M105524200>
- Rezaei, B. (2007). A simple and rapid flow injection chemiluminescence determination of cysteine with

- Ru(phen)₃(2+)-Ce(IV) system. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66(2), 359–363. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2006.03.005>
- Riddles, P. W. (1979). Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination. *Analytical Biochemistry*, 94(1), 75–81.
- Riener, C. K. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(4-5), 266–276. <http://doi.org/10.1007/s00216-002-1347-2>
- Ross, R. (1910). A Case of Sleeping Sickness showing Regular Periodical Increase of the Parasites Disclosed. *British Medical Journal*, 1(2582), 1544–5. <http://doi.org/10.1136/bmj.1.2582.1544>
- Salmon, D. (2012). Adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei* inhibit the innate immune response of the host. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6093), 463–466. <http://doi.org/10.1126/science.1222753>
- Samalova, M. (2014). Robust anti-oxidant defences in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* confer tolerance to the host oxidative burst. *The New Phytologist*, 201(2), 556–573. <http://doi.org/10.1111/nph.12530>
- Schaffroth, C. (2016). The cytosolic or the mitochondrial glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidase is sufficient to protect procyclic *Trypanosoma brucei* from iron-mediated mitochondrial damage and lysis. *Molecular Microbiology*, 99(1), 172–187. <http://doi.org/10.1111/mmi.13223>
- Schlecker, T. (2007). Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidase of *Trypanosoma brucei*. *The Biochemical Journal*, 405(3), 445–54. <http://doi.org/10.1042/BJ20070259>
- Schlecker, T. (2005). Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 14385–94. <http://doi.org/10.1074/jbc.M413338200>
- Schmidt, T. J. (2002). Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. *Planta Medica*, 68(8), 750–751. <http://doi.org/10.1055/s-2002-33799>
- Schmidt, T. J. (2009). Quantitative structure--antiprotozoal activity relationships of sesquiterpene lactones. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(6), 2062–2076. <http://doi.org/10.3390/molecules14062062>
- Schwarzländer, M. (2015). Dissecting Redox Biology using Fluorescent Protein Sensors. *Antioxidants & Redox Signaling*, 00(00), 150413084017007. <http://doi.org/10.1089/ars.2015.6266>
- Schwarzländer, M. (2008). Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *Journal of Microscopy*, 231(2), 299–316. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02030.x>
- Schwarzlander, M. (2008). Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *Journal of Microscopy*, 231(2), 299–316. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02030.x>
- Seiler, C. (2012). Smooth muscle tension induces invasive remodeling of the zebrafish intestine. *PLoS Biology*, 10(9), e1001386. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001386>
- Shahi, S. K. (2002). Overexpression of the putative thiol conjugate transporter TbMRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, 43(5), 1129–1138.
- Shao, J. (2011). Styryl-BODIPY based red-emitting fluorescent OFF-ON molecular probe for specific detection of cysteine. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(6), 3012–3017. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2010.12.004>

- Shenton, D. (2003). Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 2), 513–519. <http://doi.org/10.1042/BJ20030414>
- Simpson, A. G. B. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*, 22(4), 168–74. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.006>
- Smith, K. (1992). Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*, 874–883.
- Steenkamp, D. J. (2002). Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4(1), 105–121. <http://doi.org/10.1089/152308602753625906>
- Stefani, M. (2016). (1)H, (13)C and (15)N resonance assignment of the cytosolic dithiol glutaredoxin 1 from the pathogen *Trypanosoma brucei*. *Biomolecular NMR Assignments*, 10(1), 85–88. <http://doi.org/10.1007/s12104-015-9643-x>
- Stockdale, C. (2008). Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: Joining the DOTs. *PLoS Biology*, 6(7), 1386–1391. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060185>
- Sugiura, K. (2015). Redox sensor proteins for highly sensitive direct imaging of intracellular redox state. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 457(3), 242–248. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.095>
- Tamarit, J. (2003). Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25745–51. <http://doi.org/10.1074/jbc.M303477200>
- Tang, B. (2007). A rhodamine-based fluorescent probe containing a Se-N bond for detecting thiols and its application in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 129(38), 11666–11667. <http://doi.org/10.1021/ja072572q>
- Tang, B. (2009). A fast-response, highly sensitive and specific organoselenium fluorescent probe for thiols and its application in bioimaging. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (35), 5293–5295. <http://doi.org/10.1039/b909542j>
- Tang, Y. (2013). Rational design of an “OFF-ON” phosphorescent chemodosimeter based on an iridium(III) complex and its application for time-resolved luminescent detection and bioimaging of cysteine and homocysteine. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 19(4), 1311–1319. <http://doi.org/10.1002/chem.201203137>
- Taylor, M. C. (2006). pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnology*, 6, 32. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-6-32>
- Thomson, L. (2003a). The trypanothione–thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412(1), 55–64. [http://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00745-2](http://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00745-2)
- Thomson, L. (2003b). The trypanothione–thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412(1), 55–64.
- Torri, A. F. (1988). Posttranscriptional regulation of cytochrome c expression during the developmental cycle of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*, 8(11), 4625–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=365551&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tovar, J. (1996). Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its

- complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*, 24(15), 2942–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146039&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Trochine, A. (2014). Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2844. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002844>
- Trujillo, M. (2004). *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* trypanothione peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34175–82. <http://doi.org/10.1074/jbc.M404317200>
- Tschudi, C. (1985). Calmodulin genes in trypanosomes are tandemly repeated and produce multiple mRNAs with a common 5' leader sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 3998–4002.
- Tyler, K. M. (n.d.). THE LIFE CYCLE OF *TRYPANOSOMA CRUZI*.
- Voncken, F. (2003). Depletion of GIM5 causes cellular fragility, a decreased glycosome number, and reduced levels of ether-linked phospholipids in trypanosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35299–35310. <http://doi.org/10.1074/jbc.M301811200>
- Wang, L. (2012). Glutathione regulates the transfer of iron-sulfur cluster from monothiol and dithiol glutaredoxins to apo ferredoxin. *Protein & Cell*, 3(9), 714–21. <http://doi.org/10.1007/s13238-012-2051-4>
- Wang, S. (2006). Direct determination of reduced glutathione in biological fluids by Ce(IV)-quinine chemiluminescence. *Talanta*, 70(3), 518–521. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.12.052>
- Wang, X. (2014). Developmental stage oxidoreductive states of *Chlamydia* and infected host cells. *mBio*, 5(6), e01924. <http://doi.org/10.1128/mBio.01924-14>
- Wilkinson, S. R. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), 5022–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0711014105>
- Wilkinson, S. R. (2002). substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides , is localized to the endoplasmic reticulum, 794, 787–794.
- Wirtz, E. (1994). Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. *Nucleic Acids Research*, 22(19), 3887–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=308385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wolf, A. M. (2014). Real-time monitoring of oxidative stress in live mouse skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(6), 1701–9. <http://doi.org/10.1038/jid.2013.428>
- Xiong, Y. (2011). S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(1), 233–270. <http://doi.org/10.1089/ars.2010.3540>
- Yaeger, R. G. (1996). Protozoa: Structure, Classification, Growth, and Development. In S. Baron (Ed.), . Galveston (TX).
- Yano, T. (2010). A novel fluorescent sensor protein for visualization of redox states in the cytoplasm and in peroxisomes. *Molecular and Cellular Biology*, 30(15), 3758–3766. <http://doi.org/10.1128/MCB.00121-10>

- Zilberstein, D. (1985). Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(6), 1716–1720.
- Zilberstein, D. (1989). Maintenance of cytoplasmic pH and proton motive force in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36(2), 109–117.
- Zimmermann, S. (2013). Cynaropicrin targets the trypanothione redox system in *Trypanosoma brucei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(22), 7202–9. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.052>

7. Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a Marcelo, por abrirme las puertas de su laboratorio ya hace unos cuatro años. Por la confianza, paciencia y todo lo que he podido aprender junto a él. Esta experiencia fue sumamente enriquecedora para mí.

A mis compañeros de laboratorio, por siempre estar ahí, por todas las catársis que hemos compartido cuando las cosas no salían y la motivación para seguir intentándolo.

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

A mis amigos y amigas con las cuales he compartido gran parte de mi vida hasta el día de hoy, por escucharme cuando las cosas no salen como uno quiere y cuando las cosas salen como uno sí quiere.

A mi familia, el apoyo incondicional de todos los años, por apoyarme en el trabajo aún sin entender del todo lo que hacemos en el laboratorio y sin embargo, siempre preocuparse porque esté bien.

A mi novio, que me ha dado para adelante todos estos años desde que entre en el laboratorio, por escucharme y motivarme cuando los resultados no salen y uno quiere dejar todo. Que además me ha acompañado en todo este proceso y etapa de mi vida. No lo hubiera logrado sin ti.

A los integrantes del tribunal, Dra. Dinorah Gambino, Dra. María Noel Álvarez, y Dr. Carlos Robello, por la gentileza de aceptar leer mi trabajo y la gran disposición que han tenido para conmigo dado los contratiempos.