



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Caracterización bioquímica y estudio de las propiedades inmunológicas de la triparredoxina peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi*

Lucía López

Programa de Posgrado PEDECIBA Maestría en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias, Institut Pasteur de Montevideo, Facultad de
Medicina

Universidad de la República - Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

Setiembre de 2018



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Caracterización bioquímica y estudio de las propiedades inmunológicas de la triparredoxina peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi*

Lucía López

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado PEDECIBA Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Maestría en Ciencias Biológicas.

Directores:

Dra. Prof. Adj María Dolores Piñeyro

Dra. Prof. Adj Teresa Freire

Montevideo – Uruguay

Setiembre de 2018

López, Lucía

Caracterización bioquímica y estudio de las propiedades inmunológicas de la triparredoxina peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi* / Lucía López. - Montevideo: Universidad de la República, Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Institut Pasteur de Montevideo, Facultad de Medicina, 2018.

XIV, 126 p. 29, 7cm.

Directores:

María Dolores Piñeyro

Teresa Freire

Tesis de Maestría – Universidad de la República, Programa PEDECIBA Maestría en Ciencias Biológicas, 2018.

Referencias bibliográficas: p. 118 – 126.

1. *Trypanosoma cruzi*, 2. Triparredoxina peroxidasa citosólica, 3. Respuesta Inmune, 4. Células dendríticas, 5. Respuesta de células T, 6. Macrófagos. I. Piñeyro, María Dolores, Freire, Teresa, . II. Universidad de la República, Programa de Posgrado PEDECIBA Maestría en Ciencias Biológicas. III. Título.

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dr. Prof. Adj Gerardo Ferrer

Dra. Prof. Karina Gómez

Dr. Prof. Agdo Álvaro Díaz

Montevideo – Uruguay
Setiembre de 2018

A mi familia, AMDG.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que generosamente compartieron y sembraron en mí, sus conocimientos, sus experiencias y su tiempo. Quisiera agradecer de forma muy particular a mis dos tutoras quienes dedicaron, no sólo su tiempo sino también, su infinita paciencia en mi formación. Quisiera destacar la generosidad con la que ambas me recibieron y desearía agradecerles de forma particular por permitirme explorar (en el acierto y en el error), permitiéndome así aprender el método científico desde el constante ejercicio de plantear hipótesis basadas en la revisión bibliográfica y el análisis de resultados.

A su vez, desearía agradecer a mis compañeras del laboratorio de Inmunomodulación y Desarrollo de vacunas del Departamento de Inmunobiología de la Facultad de Medicina. Ellas, de forma muy amena, me integraron a su equipo y me permitieron compartir muy gratos momentos. A su vez, quisiera agradecer su invaluable apoyo en los experimentos.

Además desearía agradecer a mis compañeros de la Unidad de Biología Molecular. Todos y cada uno dejaron en mí una huella indeleble. Quisiera agradecerles por haberme recibido y por haberme hecho sentir parte del laboratorio. En particular, quisiera agradecer a María Laura, por darme la oportunidad de trabajar juntas, por haberse dedicado también a mi formación con una infinita paciencia y cariño. A su vez, desearía agradecer a Florencia, por su cariño, su complicidad, su compañerismo y su amistad. A María Eugenia, por sembrar en las personas constantemente, por su continuo afán por el progreso de los demás. Ella volcó en mí todas sus energías para que mi experiencia en la ciencia continúe. Realmente conozco pocas personas que tengan su generosidad a la hora de compartir el conocimiento y experiencias. A Adriana, por el cariño constante. A Carlos, por haber apostado en mí.

No puedo olvidar, al personal técnico de ambas instituciones. La calidad de su trabajo es la base del nuestro. A Miguel por su alegría constante. A Beatriz

y Mirtha por su disposición constante. A Sabina y Claudia por la paciencia.

A las personas que formaron parte de mi formación académica de grado, ya que sin ellos esta etapa no hubiese sido posible.

A mis amigas por su apoyo.

A mi familia, por su eterna comprensión.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi* y constituye un problema sanitario mayor en América Latina. En la actualidad, no hay vacunas disponibles y los fármacos utilizados muestran una eficacia variable con efectos secundarios indeseables.

La eficacia en la infección por parte del parásito está asociada a su capacidad de resistir el ataque oxidativo del hospedero y a la capacidad para evadir el sistema inmune. La detoxificación de hidroperóxidos de tripanosomátidos depende exclusivamente del tripanotión, un ditiol ausente en mamíferos. La reducción de hidroperóxidos por *T. cruzi* es llevada a cabo por enzimas peroxidasas, entre ellas la triparredoxina peroxidasa citosólica un miembro de la familia de las peroxirredoxinas. Ha sido descrito que algunas peroxirredoxinas pueden generar respuestas inmunes. A su vez, fue reportado que la triparredoxina peroxidasa citosólica de *T. cruzi* se secreta durante la infección y que constituye un factor de virulencia. Sin embargo, no existen reportes acerca de las propiedades inmunomoduladoras de esta proteína.

En base a estos antecedentes nos propusimos dilucidar si esta enzima es capaz de generar una respuesta inmunológica en un modelo murino y si dicha respuesta estaba asociada a la actividad peroxidasa. Los resultados mostraron que esta enzima fue capaz de generar una respuesta inmunológica en células del sistema inmune innato y adaptativo. La respuesta generada fue de tipo pro-inflamatorio con secreción de IL-12 por parte de las células dendríticas y una respuesta T CD8 y T CD4 Th1. Esta respuesta estuvo asociada a la actividad peroxidasa o diferencias bioquímicas asociadas a la pérdida de dicha actividad debido a que se obtuvo una respuesta diferencial cuando se utilizó un mutante inactivo de la enzima.

El principal aporte de este trabajo surge al proveer evidencias que colaboran en dilucidar la respuesta generada por una molécula parasitaria; y así contribuir a la búsqueda de moléculas que permitan la generación de herramientas para

el control efectivo de la enfermedad.

Palabras claves:

Trypanosoma cruzi, Triparredoxina peroxidasa citosólica, Respuesta Inmune, Células dendríticas, Respuesta de células T, Macrófagos.

ABSTRACT

Chagas disease is a life-threatening disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and is considered one of the major health problems in Latin America. No vaccines are available at the present and drugs used show variable efficacy with undesirable side effects. The effectiveness of the parasite in the infection is associated to its capacity to resist the oxidative attack of the host and its ability to evade the immune system.

Detoxification of reactive oxygen species in trypanosomiasis depends exclusively on trypanothione, a dithiol absent in mammals. The reduction of hydroperoxides by *T. cruzi* is carried out by peroxidase enzymes, among them the cytosolic trypanothione peroxidase, a member of the peroxiredoxin family. It has been described that some peroxiredoxins can generate immune responses. In turn, it was reported that cytosolic trypanothione peroxidase from *T. cruzi* is secreted during infection and that it constitutes a virulence factor. However, there are no reports about the immunomodulatory properties from it.

Based on these antecedents, we proposed to elucidate if this enzyme is capable of generating an immunological response in a murine model and if this response was associated with peroxidase activity. The results showed that this enzyme was able to generate an immune response in cells of the innate and adaptive immune system. The response generated was pro-inflammatory with secretion of IL-12 by the dendritic cells and a T CD8 and T CD4 Th1 response. This response was associated to the peroxidase activity or biochemical differences associated with the lack of activity as the fact that a differential response was obtained when an inactive mutant of the enzyme was used.

The main contribution of this work comes from providing evidence that helps to elucidate the response generated by a parasitic molecule; and thus contribute to the search for molecules that allow the generation of tools for the effective control of the disease.

Keywords:

Trypanosoma cruzi, Cytosolic tryparedoxin peroxidase, Immune response,
Dendritic cells, T cell response, Macrophages.

Tabla de contenidos

1	Introducción	1
2	Fundamentos teóricos	5
2.1	Enfermedad de Chagas	5
2.1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	6
2.1.2	Ciclo de vida	7
2.1.3	Detoxificación de hidroperóxidos y peroxinitrito por parte de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
2.1.4	Triparedoxina peroxidasa citosólica	12
2.1.5	c-TXNPx como factor de virulencia	14
2.2	Respuesta inmune	15
2.2.1	Sistema inmune	15
2.2.2	Inmunidad innata y adaptativa	16
2.2.3	Células dendríticas	17
2.2.4	Inmunidad adaptativa	18
2.2.5	Respuesta de células T	18
2.2.6	Respuesta inmune frente a la infección por <i>T. cruzi</i> . . .	19
2.2.7	Propiedades inmunomoduladoras de las peroxirredoxinas	22
2.3	Estado del arte	24
2.4	Hipótesis	25
2.5	Objetivo	25
3	Metodología	26
3.1	Obtención del plásmido	26
3.2	Producción de proteínas recombinantes	27
3.3	Remoción de endotoxinas	28
3.4	Cuantificación de endotoxinas	29
3.5	Ensayos de actividad enzimática	29

3.5.1	Reducción de proteínas	29
3.5.2	Análisis de datos	29
3.6	SDS-PAGE	30
3.7	Western Blot	31
3.8	Cromatografía de exclusión molecular	32
3.9	Animales	32
3.10	Purificación de células CD11c ⁺ esplénicas naïve	33
3.11	Condicionamiento de células CD11c ⁺ purificadas	33
3.12	Determinación de citoquinas por ELISA	33
3.13	Inoculaciones	34
3.14	Titulación de anticuerpos específicos	34
3.15	Obtención de PEC	35
3.16	Caracterización del fenotipo de las células de la cavidad peritoneal	35
3.17	Obtención de esplenocitos totales	36
3.18	Análisis de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo	36
3.19	Ensayos de proliferación	37
3.20	Ensayos de presentación antigénica	38
3.21	Ensayos de modulación de la presentación antigénica de OVA	39
4	Resultados	40
4.1	Obtención y caracterización bioquímica de c-TXNPx y su mutante inactiva c-TXNPxC52S	40
4.1.1	c-TXNPx y su mutante inactiva c-TXNPxC52S	40
4.1.2	Producción de proteínas recombinantes y remoción de endotoxinas	41
4.1.3	Remoción de endotoxinas	45
4.1.4	Caracterización Bioquímica	49
4.2	Caracterización de propiedades inmunomoduladoras de las proteínas sobre células innatas APC	57
4.2.1	Efecto modulador de la c-TXNPx en células dendríticas en ensayos <i>in vitro</i>	58
4.2.2	Efecto inmunomodulador de la c-TXNPx en células dendríticas en ensayos <i>in vivo</i>	61
4.3	Caracterización de la respuesta T inducida por las proteínas	73
4.3.1	Análisis de linfocitos T esplénicos	73

4.3.2	Análisis del efecto de c-TXNPx y c-TXNPxC52S sobre la proliferación de células T	78
4.3.3	Análisis de la capacidad presentadora de antígenos de DCs y su capacidad de expandir respuestas T CD4 y T CD8 específicas	84
4.4	Respuesta humoral inducida por las proteínas	92
4.4.1	Respuesta humoral específica	93
5	Discusión	96
5.1	Caracterización de c-TXNPx y su mutante inactiva c-TXNPxC52S	96
5.1.1	Producción de las proteínas y remoción de endotoxinas .	96
5.1.2	Análisis del estado de oligomerización de las proteínas .	100
5.1.3	Rol de la actividad enzimática de c-TXNPx y c-TXNPxC52S	103
5.2	Propiedades inmunomoduladoras de c-TXNPx y c-TXNPxC52S	105
5.2.1	Propiedades inmunomoduladoras de las proteínas sobre células dendríticas y macrófagos	105
5.2.2	Caracterización de la respuesta T inducida por las proteínas	109
5.2.3	Capacidad de presentación de antígenos de las CDs y su capacidad de expandir respuestas TCD4 y TCD8 específicas	112
5.3	Respuesta humoral inducida por las proteínas	114
6	Consideraciones finales	116
	Referencias bibliográficas	118

Capítulo 1

Introducción

La enfermedad de Chagas, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y constituye un problema sanitario mayor en América Latina. En la actualidad, no hay vacunas disponibles y los fármacos utilizados muestran una eficacia variable con efectos secundarios indeseables [OMS](#) ([Organización Mundial de la Salud](#)). Su ciclo de vida alterna entre un hospedero intermediario (*Triatoma infestans*) y un hospedero definitivo (humano) [Cantey et al. \(2018\)](#). En este último *T. cruzi* es capaz de infectar múltiples tipos celulares entre ellos células del sistema inmune [Cardoso et al. \(2016\)](#). La eficacia en la infección por parte del parásito está asociada a su capacidad de resistir el ataque oxidativo del hospedero [Gadelha et al. \(2013\)](#), y a la capacidad para evadir el sistema inmune [Flavia Nardy et al. \(2015\)](#). La detoxificación de hidroperóxidos de tripanosomátidos depende exclusivamente del tripanotión, un ditiol ausente en mamíferos [Carnieri et al. \(1993\)](#). La reducción de hidroperóxidos por *T. cruzi* es llevada a cabo por enzimas peroxidadas, entre ellas las triparredoxinas peroxidadas (estas pertenecen a la familia de peroxirredoxinas de 2-Cys (Prx)) [Piñeyro et al. \(2011\)](#). Resultados de nuestro grupo de investigación así como de otros grupos muestran que las triparredoxinas peroxidadas (TXNPx) constituyen factores de virulencia, ya que su sobreexpresión aumenta significativamente la infectividad, sobrevivencia y replicación de *T. cruzi* [Piñeyro et al. \(2008\)](#). Asimismo, fue descrito la secreción de esta proteína por parte de *T. cruzi* en vesículas o libre cuando los parásitos son expuestos peróxido de hidrógeno [Gadelha et al. \(2013\)](#) [Chiribao \(2016\)](#). En este sentido, este trabajo buscó abordar el estudio de las propiedades inmunológicas de la triparredoxina peroxidasa citosólica

(c-TXNPx) de *T. cruzi* y si el efecto sobre el sistema inmune estaba mediado por su actividad peroxidasa. Con este fin, se utilizó la proteína salvaje recombinante (c-TXNPx) y otra con una mutación en el sitio activo, en la cisteína 52 (cisteína peroxidática) que pierde la actividad enzimática (c-TXNPxC52S). Esta proteína mutante permitió disecar el aporte de la actividad peroxidasa en la respuesta inmune generada. A su vez, se utilizó un control con el vector de expresión sin inserto al que se denominó Mock. Las proteínas y el Mock fueron expresados y purificados en una cepa bacteriana *Cleaver coli*TM, que genera un LPS modificado menos activador de las células del sistema inmune y que no es reconocido por el TLR4 humano.

En una primera etapa se buscó caracterizar la proteína desde un punto de vista enzimológico y conformacional. Se estudió la actividad enzimática de las proteínas salvaje y mutante mediante ensayos acoplados de actividad enzimática, con todos los componentes del sistema: NADPH, Tripanotión reductasa, Tripanotión, Triparredoxina, triparredoxina peroxidasa y se utilizó H₂O₂ como sustrato. En estos ensayos se pudo observar que c-TXNPx presenta actividad peroxidasa y no así c-TXNPxC52S. Asimismo, se estudió si la c-TXNPx presentaba actividad peroxidasa cuando se oxida o se sobreoxida (estado donde la cisteína peroxidática se sobreoxida a sulfínico). Se determinó que la c-TXNPx no presentó actividad peroxidasa cuando se sobreoxida, mientras que si presentó actividad cuando la proteína está oxidada y en condiciones de regeneración. El estado de oligomerización de ambas proteínas se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular. Se pudo determinar que ambas proteínas presentan dos formas predominantes, que se corresponden con oligómeros de alto peso molecular (HMW) y con decámeros en el caso de la proteína mutante y con oligómeros de mayor peso que el decámero y HMW, en el caso de c-TXNPx. A su vez, se estudió, la proporción de proteína c-TXNPx purificada en estado sobre-oxidado, sin actividad peroxidasa. mediante western blot usando un anticuerpo que reconoce el ácido sulfínico de la cisteína peroxidática cuando esta está sobreoxidada. Los resultados muestran que sólo una pequeña proporción de la proteína se encuentra sobreoxidada. Estos resultados fueron obtenidos sin realizar ningún tratamiento reductor u oxidante sobre las proteínas, ya que se buscaba conocer el estado de las proteínas que luego fueron utilizados en los ensayos inmunológicos. También se realizaron ensayos de cuantificación de endotoxinas bacterianas mediante un kit comercial.

En una segunda etapa se realizaron los ensayos inmunológicos *in vitro*.

Para ello, se caracterizó las propiedades inmunológicas de c-TXNPx y c-TXNPxC52S en células dendríticas esplénicas. Se observó que las células dendríticas cultivadas en presencia de c-TXNPx presentan una mayor expresión de MHCII, CD40 y CD80 y de la citoquina IL-6 con respecto a c-TXNPxC52S. Además, confirmamos que las células dendríticas y macrófagos expresan mayores niveles de MHCII *in vivo*, cuando los ratones son inyectados con c-TXNPx en comparación con c-TXNPxC52S.

A continuación se realizaron estudios para determinar la respuesta inmune adaptativa a través del estudio de la respuesta humoral y celular. Se pudo determinar que tanto los ratones inoculados con c-TXNPx y con c-TXNPxC52S generaron anticuerpos específicos anti c-TXNPx. Este resultado permite asumir que ambas proteínas actúan como inmunógenos capaces de inducir una respuesta humoral específica.

Por otro lado, observamos que los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺, provenientes de ratones inmunizados con c-TXNPx presentan mayores índices de proliferación con respecto a los provenientes de c-TXNPxC52S. A su vez, estos resultados son acompañados con mayores niveles de producción de IFN- γ por parte de los esplenocitos provenientes de c-TXNPx.

En su conjunto los resultados inmunológicos demuestran que la c-TXNPx posee una actividad pro-inflamatoria, que favorece la proliferación de linfocitos T y su polarización a Th1, asociado a una mayor expresión del MHCII de las células innatas presentadoras de antígeno.

Con el fin de evaluar si la mayor activación de linfocitos T se debía a un incremento en la presentación antigénica por parte de las células dendríticas, se realizaron ensayos de presentación antigénica *in vitro*. Los resultados de estos ensayos sugieren que c-TXNPx favorece la presentación antigénica, en un sistema antígeno específico.

En conclusión, en este trabajo se determinó que la c-TXNPx genera una respuesta tipo inflamatoria con mayores índices de proliferación por parte de linfocitos T, favoreciendo su diferenciación a Th1, y que ello se encuentra asociado a una mayor presentación antigénica, en comparación con la proteína mutante, por parte de células dendríticas.

Esta tesis contribuye a la comprensión de la respuesta inmunológica inducida por factores de virulencia de *T. cruzi*, y podría contribuir a la búsqueda de estrategias de prevención de la Enfermedad de Chagas.

El manuscrito se divide en capítulos y secciones, en el primer capítulo se

presenta un marco teórico y antecedentes que aportan conceptos generales y resultados obtenidos previamente por nuestro grupo u otros autores en relación: 1) Enfermedad de Chagas, 2) *T. cruzi*, 3) el metabolismo de especies reactivas del oxígeno, 4) la triparredoxina peroxidasa citosólica de *T. cruzi*, 5) el sistema inmune y sus principales componentes, 6) la inmunidad innata, 7) las células dendríticas, 8) la inmunidad adaptativa 9) y por último las propiedades inmunomoduladoras de algunas proteínas pertenecientes a la familia de las peroxirredoxinas.

En el segundo capítulo se presentan la hipótesis y los objetivos de trabajo. En el tercer capítulo se presentan la metodología empleada para cada uno de los ensayos realizados, tanto para la caracterización bioquímica de las proteínas como los estudios de respuesta inmunológica generada por las proteínas.

En el capítulo cuatro se presentan los resultados obtenidos en este trabajo, se muestran en una primera parte la producción de las proteínas recombinantes y la posterior caracterización bioquímica y enzimológica de las mismas. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la respuesta generada por las proteínas en células del sistema inmune innato en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente, se muestran los resultados vinculados a la respuesta inmune adaptativa generada por las proteínas en un modelo murino. En este sentido, se muestran las poblaciones linfoides presentes en los ratones inoculados con las proteínas, la capacidad de proliferación de los linfocitos *ex vivo* y la respuesta humoral específica.

En el capítulo cinco se presenta una discusión de los resultados obtenidos, en base a resultados previos del laboratorio, a hallazgos encontrados por otros autores y a conceptos generales de inmunología.

A continuación, se presentan las conclusiones a las que se arribó en este trabajo con perspectivas que se abren a partir del mismo.

Por último, se presentan las referencias bibliográficas de las que se hace mención a lo largo del manuscrito y los anexos y apéndices que soportan algunos resultados.

Capítulo 2

Fundamentos teóricos

Este capítulo incluye la revisión de la literatura, de los enfoques, teorías o conceptos pertinentes en que se fundamenta la investigación. Se basa fundamentalmente en la exposición de otros trabajos sobre el tema estudiado.

2.1. Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el protozooario, *Trypanosoma cruzi* [Chagas \(1909\)](#). Este parásito es transmitido por un insecto triatomino de las especies *Triatoma infestans*, *Triatoma rubrovaria* y *Rhodnius prolixus*, conocido como vinchuca. Sin embargo, la infección también puede ser contraída a través de transfusiones de sangre, órganos trasplantados de donantes infectados, a través de transmisión vertical y oral [Cantey et al. \(2018\)](#). En la actualidad, pese a algunos antígenos han sido evaluados como vacunas, no existen vacunas disponibles [Bontempi et al. \(2017\)](#), y los fármacos que se utilizan presentan distintas eficacias según la fase la enfermedad [OMS \(Organización Mundial de la Salud\)](#).

Esta enfermedad es endémica en muchas partes de México, Centroamérica y Sudamérica, donde se calcula que hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas [OMS \(Organización Mundial de la Salud\)](#). Los triatominos proliferan en casas de condiciones precarias (por ejemplo, con muros de barro y techos de paja) [Cantey et al. \(2018\)](#), razón por la cual las personas que viven en áreas rurales en algunos países donde la enfermedad es endémica están expuestas a un mayor riesgo de contraer la infección. Los esfuerzos de salud pública diri-

gidos a prevenir la transmisión de esta enfermedad han reducido la cantidad de personas que contraen la infección por primera vez y, en algunas áreas, han detenido la transmisión por vectores [OMS](#) ([Organización Mundial de la Salud](#)). Este es el caso de Uruguay donde el vector portador fue erradicado y así fue controlada la incidencia de esta enfermedad [Salvatella \(2016\)](#). Pese a este esfuerzo, la infección contraída por el uso de productos derivados de la sangre, trasplante de órganos o transmisión congénita sigue representando una amenaza [Basmadján \(2012\)](#).

2.1.1. *Trypanosoma cruzi*

Según las últimas revisiones acerca de la taxonomía de *T. cruzi*, éste se encuentra en: Eukarya, Protista, Excavata, Discoba, Discricristata, Euglenozoa, Kinetoplastea, Trypanosomatida, Trypanosomatidae, Trypanosoma, cruzi [Votýpka et al. \(2015\)](#).

Los integrantes de la familia Trypanosomatidae, presentan algunas características morfológicas únicas como la presencia de una estructura denominada bolsillo flagelar, la cual está vinculada a actividades de endocitosis o exocitosis. Un flagelo que dependiendo del estadio se insertará por delante o por detrás del núcleo y que favorece la motilidad del parásito. Otra de las estructuras presentes es el kinetoplasto, una mitocondria que se extiende por todo el cuerpo celular. Sobre la porción basal de este organelo se puede encontrar una compleja red de fibras de ADN circular, dispuestas en una fila apretada de fibras paralelas al eje longitudinal del parásito. Estudios de microscopía electrónica mostraron que en esta estructura se encuentra alrededor de 20.000 o 30.000 moléculas circulares, las cuales se pueden clasificar como maxi o minicírculos, dependiendo del tamaño. La información contenida en estas moléculas está involucrada en la edición génica, un posible mecanismo de regulación génica presente en *T. cruzi* [Souza \(2002\)](#).

Además, presenta una estructura denominada glicosoma constituida por una membrana, de aspecto homogéneo en su interior y ligeramente denso en la matriz, en los que se identificó enzimas glucolíticas encargadas de la conversión de glucosa a 3-fosfoglicerato. El ácido calcisoma, estructuras electrón-densas que contienen sodio, calcio, magnesio, zinc, hierro y una Ca^+H^+ -ATPasa [Souza \(2002\)](#).

Por otro lado, presenta los organelos típicos de los eucariotas, tales como

el núcleo, el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y los ribosomas.

2.1.2. Ciclo de vida

T. cruzi tiene un complejo ciclo de vida en el que alterna entre el insecto triatominio, su hospedero intermediario y un mamífero, su hospedero definitivo. Cuando una vinchuca se alimenta de la sangre del mamífero infectado ingiere los tripomastigotas y estos pasan al sistema digestivo de la vinchuca en donde se diferencia a la forma epimastigota. Este nuevo estadio se replica en el intestino medio y migra al intestino posterior donde se diferencian a la forma infectiva tripomastigota. Cuando la vinchuca pica a un mamífero para alimentarse, excreta al lado del sitio de la picadura y junto a las heces son excretados los tripomastigotas que ingresan al torrente sanguíneo a través de una lesión en la piel o por membranas mucosas sanas. Los parásitos invaden células nucleadas y allí se diferencian a amastigotas y se replican. Dentro de la célula los amastigotas se diferencian a tripomastigotas no replicativos y lisan la célula retornando al torrente sanguíneo donde se cierra el ciclo [Cortez et al. \(2012\)](#) figura 2.1.

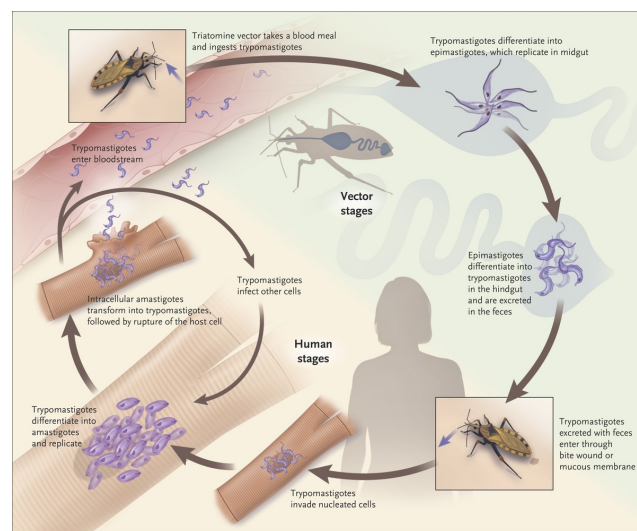


Figura 2.1: Ciclo de vida de *T. cruzi*, alternancias de estadios entre el hospedero intermediario y el hospedero mamífero. El parásito se desarrolla en el intestino del vector de donde es expulsado en las heces de este, una vez que el insecto pica a un mamífero para alimentarse dado sus hábitos hematófagos. Las heces son depositadas en la cercanía de la picadura por donde ingresan al torrente sanguíneo del mamífero y alternan entre una forma replicativa intracelular, denominada amastigota y una forma sanguínea. Esta última es la que cierra el ciclo cuando un triatominio pica a un mamífero infectado.

2.1.3. Detoxificación de hidroperóxidos y peroxinitrito por parte de *Trypanosoma cruzi*

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* sufre grandes cambios bioquímicos y morfológicos que le permiten sobrevivir y adaptarse a cada ambiente [Díaz et al. \(2011\)](#). En el caso del hospedero mamífero, el parásito es capaz de infectar tanto las células fagocíticas como las no fagocíticas [Yoshida \(2006\)](#). Sin embargo, la infección de macrófagos presenta algunas características particulares como el ataque oxidativo dentro de la vacuola parasitófora (unión del lisosoma a vesículas) [Kierszenbaum et al. \(1974\)](#) [Sibley & Andrews \(2000\)](#) [Andrade & Andrews \(2005\)](#). Este ambiente puede ser tóxico para el parásito, por lo tanto, su capacidad para hacer frente a dicho entorno oxidativo determinará el éxito y la persistencia del proceso de infección [Linares et al. \(2001\)](#) [Thomson et al. \(2003\)](#) [Piacenza et al. \(2013\)](#). En la figura 2.2 se muestran algunas de las moléculas oxidantes involucradas en el ataque oxidativo a las que se enfrenta el parásito en la vacuola parasitófora dentro de un macrófago. Entre estas moléculas encontramos al superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito [Cardoso et al. \(2016\)](#).

Todos los organismos presentan defensas anti-oxidantes que permiten la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno. En este sentido, *T. cruzi* presenta 5 diferentes peroxidases que varían en su localización subcelular y en especificidad por distintos sustratos [Piacenza et al. \(2013\)](#). Entre ellas podemos encontrar: la glutatión peroxidasa I y II que permiten detoxificar hidroperóxidos e hidroperóxidos lipídicos, respectivamente; las triparredoxinas peroxidases, citosólica y mitocondrial, que detoxifican hidroperóxidos, peroxinitrito y peróxido de hidrógeno; y finalmente, una hemo-peroxidasa dependiente de ascorbato, quien también se encarga de la detoxificación de H_2O_2 . A su vez, *T. cruzi* posee 4 superóxidos dismutasas dependientes de Fe (Revisado en [Piacenza et al. \(2013\)](#)), éstas se encargan de la detoxificación de anión superóxido. El rol de estas enzimas ha sido menos caracterizado que el de las otras enzimas presentadas anteriormente. Estas vías se esquematizan en la figura 2 en donde se presentan las principales defensas antioxidantes del parásito.

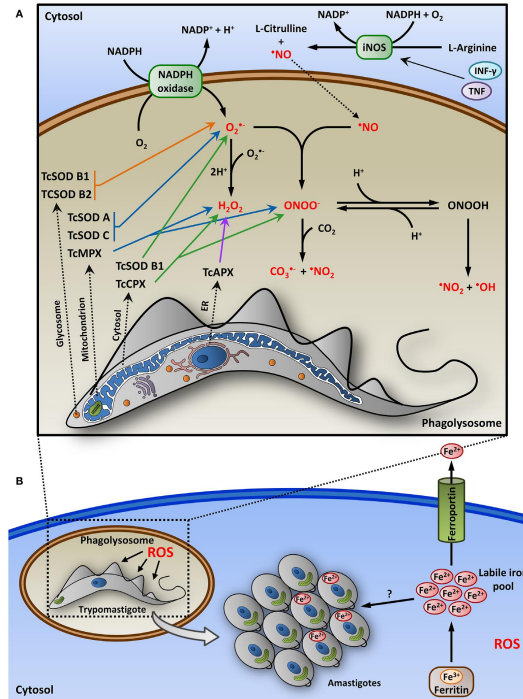


Figura 2.2: Esquema de algunas de las vías implicadas en el ataque oxidativo por parte del mamífero hacia el parásito y de las defensas antioxidantes de este. A. Una vez dentro del fagolisosoma se activa NADPH oxidasa asociada a la membrana del macrófago, produciendo el radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ que puede convertirse en H_2O_2 . Los macrófagos estimulados con citoquinas proinflamatorias ($IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$) inducen la expresión de la óxido nítrico sintasa (iNOS), que genera óxido nítrico ($\bullet NO$) en el citoplasma como producto de la oxidación de la L-arginina. El $\bullet NO$ difunde en la vacuola de fagolisosoma y reacciona con $O_2^{\bullet-}$ para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente oxidante. Los radicales libres secundarios, como los radicales carbonato $CO_3^{\bullet-}$, dióxido de nitrógeno ($\bullet NO_2$) e hidroxilo ($\bullet OH$), se producen a partir de $ONOO^-$. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS, indicadas en rojo) pueden causar diversos daños celulares y la muerte del parásito dentro del fagolisosoma. El parásito posee varias enzimas encargadas de neutralizar este ataque y así sobrevivir, entre ellas encontramos: la hemoperoxidasa dependiente de ascorbato, la triparredoxina peroxidasa citosólica y mitocondrial (TcAPX, TcCPX y TcMPX, respectivamente); y las superóxido dismutasas (SOD). Estas actúan en la desintoxicación de ROS, y se distribuyen en varios compartimentos celulares, como glicosomas, mitocondria, citosol y retículo endoplásmico (ER). Las enzimas derivadas del glucosoma, la mitocondria, el citosol y la ER se indican con flechas naranja, azul, verde y morada, respectivamente. B. Luego de resistir el ataque oxidativo del mamífero los tripomastigotas pueden diferenciarse a amastigotas y abandonar el fagolisosoma. Una vez en el citosol los parásitos incorporan Fe^{2+} quien se encuentra en el citosol como Fe^{3+} asociado a ferritina. El Fe^{2+} también se puede exportar fuera de la célula vía de la ferroportina. Ambas enzimas se expresan frente a la presencia de ROS Cardoso et al., (2016).

En este trabajo nos centraremos en la c-TXNPx, que como fue presentada en el capítulo 1 se localiza en el citosol del parásito. Esta enzima detoxifica hidroperóxidos, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito y es regenerada por el sistema dependiente de tripanotión (N1,N8-bisglutathionilperimidina) [Piacenza et al. \(2013\)](#). Éste es un ditiol de bajo peso molecular exclusivo de tripanosomátidos. El tripanotión se mantiene reducido a expensas de una flavoproteína dependiente del NADPH, la tripanotión reductasa y otras enzimas. A su vez, el tripanotión reduce a la triparredoxina I, quien transfiere equivalentes de reducción a la triparredoxina peroxidasa. Esta enzima es la que reduce los hidroperóxidos o el peroxinitrito; revisado en [Krauth-Siegel & Comini \(2008\)](#) [Leroux & Krauth-Siegel \(2016\)](#). El sistema dependiente de tripanotión en el que está involucrada la c-TXNPx se esquematiza en la figura 2.3.

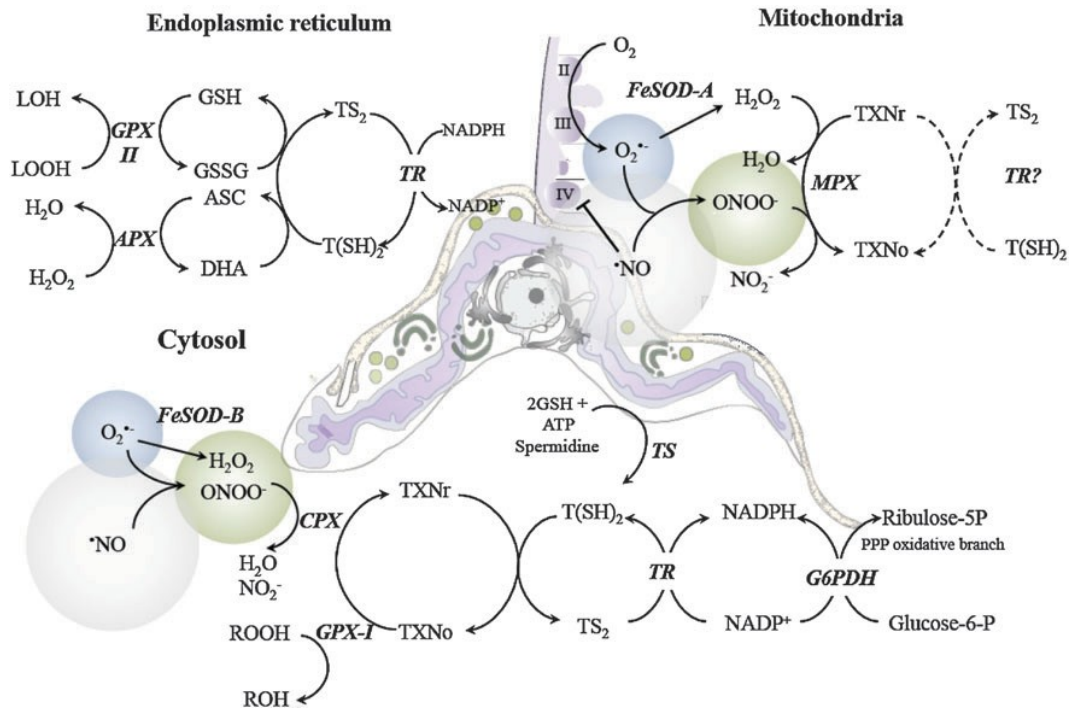


Figura 2.3: Distribución subcelular de las principales defensas antioxidantes de *T. cruzi*. Estas defensas están constituidas por enzimas y moléculas no enzimáticas distribuidas en el citosol, la mitocondria y el retículo endoplasmático. El NADPH es el aceptor de electrones final de todas las vías esquematizadas. Los equivalentes de reducción se canalizan a través del tripanotión ($T(SH)_2$), el glutatión (GSH) o el ascorbato (ASC). Es así que en la mitocondria se presume la tripanotión reductasa (TR) reduce a la triparredoxina (TXN) y esta recicla a la triparredoxina peroxidasa mitocondrial (MPX). Esta enzima se encarga de la detoxificación del peroxinitrito ($ONOO^-$) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este último formado por la dismutación del O_2^- proveniente de la cadena respiratoria (II y III), a través la superóxido dismutasa dependiente de Fe. En el retículo endoplasmático el H_2O_2 es detoxificado a través de la hemoperoxidasa dependiente de ASC (APX), en esta reacción se forma dehidroascorbato (DHA), el cual es reducido directamente por el $T(SH)_2$ y este es nuevamente reducido por la TR. Esta enzima cede sus equivalentes de reducción al NADPH. Además, el H_2O_2 en presencia de metales puede reaccionar con lípidos generando hidroperóxidos orgánicos, que son detoxificados por la peroxidasa dependiente de glutatión II (GPX II). Esta enzima oxida glutatión (GSH) y este es reciclado por el $T(SH)_2$, quien es reducido por la TR. En el citosol: se encuentran la triparredoxina peroxidasa citosólica (CPX) (antes mencionada como c-TXNPx), quien detoxifica H_2O_2 y $ONOO^-$ formados por la superóxido dismutasa B dependiente de Fe (FeSOD-B). CPX como GPX-1 son recicladas por la TXN y esta por el $T(SH)_2$, quien es reducido por la TR y cede sus equivalentes de reducción al NADPH proveniente de la vía de las pentosas fosfato (Piacenza et al. 2013).

2.1.4. Triparredoxina peroxidasa citosólica

La enzima triparredoxina peroxidasa se presenta en dos formas, una mitocondrial y una citosólica (c-TXNPx) [Wilkinson et al. \(2000\)](#), esta última protagonista principal de esta tesis de Maestría. Esta enzima pertenece a la familia de las peroxirredoxinas de 2 cisteínas típicas y detoxifica hidroperóxidos, peróxido de hidrógeno o peroxinitrito [Trujillo et al. \(2004\)](#) [Piñeyro et al. \(2011\)](#). Las cisteínas características de esta familia están involucradas en la catálisis, se les denominan peroxidática (C_P) y resolutive (C_R), y se encuentran en las posiciones 52 y 173 respectivamente [Piñeyro et al. \(2005\)](#). La cisteína 52 se encuentra en el sitio activo y la 173 se encuentra envuelta por un entorno hidrofóbico generado por aminoácidos de su entorno.

El mecanismo de acción para estas enzimas corresponde al de las Prx de 2 Cys típicas: donde se da un ataque nucleofílico de la Cys⁵² al hidroperóxido y se forma un derivado en la cisteína ácido sulfénico (Cys-SOH). Este residuo es atacado posteriormente por la Cys¹⁷³ de la otra subunidad para formar un enlace disulfuro estable entre ambas subunidades, que luego se reduce mediante una proteína de la familia de las tiorredoxinas, la triparredoxina I [Poole \(2007\)](#) [Castro & Tomás \(2008\)](#) [Poole et al. \(2011\)](#).

El modelo cinético de reacción muestra que esta enzima es bi-sustrática, de orden obligatorio sin formación de complejo ternario o también denominado ping-pong, con un mecanismo de sustitución enzimática que cataliza la reducción de estas especies reactivas del oxígeno a expensas de la oxidación de la triparredoxina I [Piñeyro et al. \(2011\)](#). El sitio activo de esta enzima está constituido por un bolsillo inmerso en la interfaz monómero-monómero cercano a las Cys⁵². Este residuo catalítico se coloca dentro del bolsillo del sitio activo formado por los residuos Met⁴⁶, Phe⁵⁰, Val⁵¹, Pro⁴⁵ y Thr⁴⁹. El grupo sulfidril de Cys⁵² está a una distancia de enlace de hidrógeno Thr⁴⁹ y de Arg¹²⁸ [Piñeyro et al. \(2005\)](#). Vale destacar que estas interacciones, predichas para estabilizar el estado iónico y disminuir el pKa de la Cys⁵², son esenciales para la actividad catalítica de la enzima en *Leishmania donovani* [Flohe et al. \(2002\)](#). El otro residuo reactivo, Cys¹⁷³ de la segunda molécula del homodímero, se localiza en un entorno hidrofóbico excluido del disolvente formado por los residuos Ala¹⁶², Phe¹⁶⁵, Trp¹⁷⁷ y Thr¹⁸³. La exclusión de solvente de la cisteína de resolución es crucial para completar actividad de la enzima ya que impide la oxidación [Piñeyro et al. \(2005\)](#).

Esta enzima fue cristalizada en su estado reducido por [Piñeyro et al. \(2005\)](#), se observó que la estructura del monómero tiene forma elipsoidal y que está compuesto por 7 hojas β en sentidos paralelos y antiparalelos. A su vez, estas hojas β se encuentran rodeadas por 6 α -hélices. El extremo N-terminal está compuesto por una extensa estructura seguida de un giro β en forma de horquilla, un segmento de 3 hélices y dos motivos $\beta\alpha\beta$. Por otra parte, el extremo C-terminal está compuesto por una pequeña α -hélice. La unidad funcional de esta enzima es el homodímero, en el que se unen dos monómeros mediante interacciones no covalentes entre hojas β .

Con respecto a su estructura cuaternaria, esta proteína es capaz de formar estructuras estables basadas en el ensamblaje de 5 homodímeros simétricos, formando así un homodecámero [Piñeyro et al. \(2005\)](#). A su vez, en condiciones reductoras puede presentarse como homodímeros y homodecámeros, y en condiciones oxidantes presentarse como oligómeros de mayor peso que el decámero y estructuras de alto Peso Molecular (HMW) según lo descrito por [Piñeyro et al. \(2005\)](#). De forma complementaria, ha sido reportado que otros factores como el pH pueden estar involucrados en la formación de HMW [Morais et al. \(2015\)](#).

De forma particular, el estado redox de la C_P ha sido ampliamente caracterizado como un factor que regula la oligomerización en la familia de las peroxirredoxinas (10, 13). En este sentido cuando se reduce la C_P durante el ciclo catalítico se extiende la porción C-terminal y adopta una conformación completamente plegada (FF), que estabiliza la forma decamérica. Al reducir los peróxidos, la C_P se oxida a ácido sulfénico (C_P -SOH) y el sitio activo se despliega localmente (LU), permitiendo la formación de un enlace disulfuro entre C_P -SOH y la C_R , ubicado en la otra subunidad que forma la interfaz catalítica [Morais et al. \(2015\)](#). Este fenómeno también está presente en la enzima de *T. cruzi* y fue descrito por [Piñeyro et al. \(2005\)](#). Sin embargo, cuando la C_P -SOH reacciona con otra molécula de peróxido, dicha cisteína se sobreoxida y este fenómeno produce cambios conformacionales en los que se produce la formación de HMW. De este modo, la sobreoxidación de la C_P aparece como uno de los principales mecanismos de formación de estas estructuras cuaternarias para las peroxirredoxinas [Perkins et al. \(2014\)](#). Una comparación de estructuras entre las peroxirredoxinas eucariotas y procariotas mostró diferencias entre los dominios, que han sido asignados a la susceptibilidad a la sobreoxidación. Estas características estructurales diferentes incluyen motivos conservados en

dos regiones, un motivo “GGLG” insertado justo después de una hélice 3_{10} y un motivo “YF” en el C-terminal presente en las proteínas eucarióticas, y ausente en procariotas [Wood, Z. A. et al. \(2003\)](#). En este sentido, las peroxirredoxinas de eucariotas han sido clasificadas como sensibles a la sobreoxidación y las de procariotas como resistentes [Perkins et al. \(2014\)](#). Estos dominios están vinculados a un enlentecimiento en la formación del puente disulfuro entre la C_P y la C_R , permitiendo que una segunda molécula de H_2O_2 que genera la sobreoxidación de la C_P [Wood, Z. A. et al. \(2003\)](#).

Además, la fosforilación de la Thr⁹⁰ también se ha reportado como responsable de este cambio conformacional en la peroxirredona I humana [Jang et al. \(2006\)](#). Por su parte, estos cambios conformacionales y la formación de HMW ha sido ampliamente asociado a un cambio en la función de estas enzimas, en el que se ha descrito una migración desde la actividad peroxidasa a la actividad chaperona (revisado en [Barranco-Medina et al. \(2009\)](#)). La actividad chaperona consiste en la capacidad de determinadas proteínas de favorecer el correcto plegamiento de las proteínas. El abordaje de esta actividad es posible realizarlo a través del estudio de la prevención de la agregación, o de la prevención de la pérdida de la actividad en el caso que se analice una enzima [Hristozova et al. \(2016\)](#). Estudios posteriores han atribuido nuevas funciones a c-TXNPx como la actividad chaperona [Jang et al. \(2004\)](#) [Jang et al. \(2006\)](#) [Castro & Tomás \(2008\)](#). Esta asociación entre la formación de HMW en las peroxirredoxinas y la actividad chaperona ha sido reportada para humanos, levaduras y parásitos [Barranco-Medina et al. \(2009\)](#).

Estudios recientes realizados por la Dra. Piñeyro y la Dra. Parodi, en nuestro laboratorio, han evidenciado que c-TXNPx es sensible a estos cambios conformacionales frente a altas concentraciones de H_2O_2 y DTT ya que evidenciaron la formación de HMW. A su vez, han mostrado que esta enzima presenta actividad chaperona incluso en el estado decamérico (Datos no publicados).

2.1.5. c-TXNPx como factor de virulencia

Estudios posteriores describieron a esta enzima como factor de virulencia, debido a que parásitos sobreexpresantes mostraban ser más infectivos, tanto en células fagocíticas como no fagocíticas [Piñeyro et al. \(2008\)](#). En este estudio se mostró que la sobreexpresión de esta enzima no afectó la capacidad de

invasión, sino la persistencia y la capacidad de resistir el ataque por parte de la célula hospedera. A su vez, un estudio utilizando la técnica de ARNi en *Trypanosoma brucei* mostró que esta enzima es esencial para la sobrevivencia del parásito. Se observó que los parásitos mueren luego de las 48 horas del silenciamiento del gen de esta enzima [Wilkinson et al. \(2000\)](#). Se ha asociado la sobreexpresión de c-TXNPx con un incremento en la resistencia al H₂O₂ y peroxinitrito endógeno, tanto en *L. donovani* como *T. cruzi* [Iyer et al. \(2008\)](#) [Piacenza et al. \(2008\)](#).

Cabe destacar que trabajos de nuestro y otros laboratorios mostraron que esta enzima es secretada por los parásitos, tanto en vesículas como libre durante la exposición a peróxido de hidrógeno [Gadelha et al. \(2013\)](#) [Chiribao \(2016\)](#). Los autores de este trabajo proponen que, al igual que fue demostrado para enzimas con actividad proteolítica o antioxidante en otros tripanosomátidos como *Leishmania donovani*, la secreción de esta enzima podría contribuir a la sobrevivencia o a la patogenicidad del parásito [Gadelha et al. \(2013\)](#). A su vez, en el trabajo de Chiribao y colaboradores se estudió en profundidad la interacción de esta enzima con células epiteliales y se pudo determinar que la enzima se internaliza y modifica la expresión génica de las células infectadas [Chiribao \(2016\)](#).

2.2. Respuesta inmune

En esta sección se pretende abordar algunos aspectos de inmunología general que aportan los fundamentos teóricos que apoyan los objetivos y los resultados de esta tesis. En este sentido, se presentarán aspectos generales del sistema inmune como ser la respuesta inmune innata y su vínculo con la respuesta inmune adaptativa. Se pondrá especial énfasis en la respuesta inmune pro-inflamatoria tanto a nivel innato como adaptativo y su rol en la eliminación de parásitos.

2.2.1. Sistema inmune

La inmunidad es un poderoso mecanismo homeostático para eliminar patógenos y otras sustancias antigénicas extrañas, así como mantener la tolerancia durante la homeostasis [Castro & Tomás \(2008\)](#) [Murphy et al. \(2017\)](#). Ésto se logra gracias a diferentes funciones o propiedades que caracterizan al

Sistema Inmune: i) el reconocimiento inmunitario, ii) contener y eliminar la infección a través de funciones efectoras, iii) la regulación inmunitaria para que el sistema no dañe el organismo, y iv) proteger al individuo contra enfermedades recurrentes debidas al mismo agente patógeno (memoria inmunológica) [Murphy et al. \(2017\)](#).

El sistema inmune de mamíferos presenta componentes solubles (como proteínas, lípidos y glúcidos) y celulares que llevan a cabo las mencionadas funciones del sistema.

2.2.2. Inmunidad innata y adaptativa

El sistema inmune está compuesto por dos grandes ramas, el sistema inmune innato y el adaptativo [Murphy et al. \(2017\)](#) [Rich et al. \(2008\)](#). El primero de estos está ampliamente representado en los fila multicelulares, se centra en el reconocimiento de patrones moleculares comunes de patógenos denominados PAMPs (del inglés pathogen-associated molecular pattern) [Murphy et al. \(2017\)](#).

Los elementos de la inmunidad innata son diversos. Incluyen barreras físicas a la invasión de patógenos (como piel, membranas mucosas, cilios y moco), así como una variedad de factores celulares y séricos que pueden ser activados por productos del patógeno secretados o de la superficie celular así como moléculas propias derivadas del daño celular (DAMPs, del inglés Damage-associated molecular patterns). La activación consiguiente de estas células induce una respuesta inflamatoria que utiliza mecanismos efectores, algunos de los cuales son compartidos con los del sistema inmune adaptativo. Entre estos, se encuentran la citotoxicidad mediada por células asesinas naturales (NK), la activación de células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), la secreción de elementos tóxicos y vasoactivos por parte de los granulocitos (basófilos, eosinófilos y mastocitos) las células T $\gamma\delta$, el procesamiento de antígenos por parte de las células presentadoras (células dendríticas y macrófagos), la secreción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas, y las acciones de los muchos participantes en la cascada del complemento [Rich et al. \(2008\)](#).

Con respecto a los componentes moleculares, además de las proteínas del complemento, se encuentran también los receptores tanto de superficie como séricos. Estos receptores, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) reconocen los PAMPs y DAMPs y tienen varias funciones además

del reconocimiento. Por ejemplo, algunos son receptores fagocíticos que estimulan la ingestión de los patógenos que reconocen. Otros son receptores quimiotácticos, que guían células hacia sitios de infección. Una tercera función es inducir la producción de moléculas efectoras que contribuyen a las respuestas inducidas más tardías de inmunidad innata, y también a inducir proteínas que influyen sobre el inicio y la naturaleza de cualquier respuesta inmunitaria adaptativa subsiguiente [Murphy et al. \(2017\)](#).

El sistema inmune adaptativo, presente únicamente en vertebrados, está especializado para el desarrollo de una respuesta inflamatoria basada en el reconocimiento de macromoléculas específicas que son predominantemente, pero no exclusivamente, proteínas o péptidos. Sus principales actores son los anticuerpos, los linfocitos T y los linfocitos B. Las células presentadoras de antígenos vinculan la inmunidad innata con la adaptativa permitiendo la activación de linfocitos T [Rich et al. \(2008\)](#).

2.2.3. Células dendríticas

Las células dendríticas (CDs) son células del sistema inmune innato capaces de internalizar, procesar y presentar antígenos a las células T vírgenes [Gil-pulido et al. \(2017\)](#). Se encuentran en la periferia, y gracias a la expresión de una gran variedad de PRRs, son capaces de detectar la presencia de moléculas derivadas de patógenos o de daño celular. Ello puede promover o desencadenar la internalización de moléculas que luego serán procesadas y presentadas a las células T, así como también cascadas de señalización que conducen a la expresión de grupos de moléculas (como las citoquinas, quimioquinas y moléculas de co-estimulación) que les permite migrar, dirigirse a los órganos linfoides secundarios e interactuar con los linfocitos T vírgenes y activarlos.

Las CDs murinas en particular expresan una serie de marcadores que las caracteriza, como CD11c, así como moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40, y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (MHC I y MHC II). Además, los marcadores de células T CD4 y CD8 se expresan en CDs de ratón y son útiles para clasificar subtipos. CD8 en CDs está en forma de un α -homodímero en lugar de un $\alpha\beta$ -heterodímero que es típico de las células T. Otro marcador que es útil para identificar subtipos de CDs de ratón es CD11b [Shortman & Liu \(2002\)](#).

Al encontrar moléculas derivadas de patógenos o de daño, las CDs pue-

den comenzar un proceso de maduración, durante el cual adquieren cambios fenotípicos y funcionales (como el aumento de las moléculas de MHCII y de co-estimulación de superficie) para permitir la presentación de antígenos a las células T.

2.2.4. Inmunidad adaptativa

Una respuesta inmunitaria adaptativa comprende la selección y amplificación de clones de linfocitos que portan receptores que reconocen el antígeno extraño. Hay dos tipos principales de linfocitos: linfocitos B, que maduran en la médula ósea y son la fuente de anticuerpos circulantes, y los linfocitos T, que maduran en el timo y reconocen péptidos de agentes patógenos presentados por moléculas del MHC sobre células infectadas o células presentadoras de antígeno. Cada linfocito porta receptores de superficie con una especificidad de antígeno única [Murphy et al. \(2017\)](#).

La inmunidad adaptativa se inicia cuando una respuesta inmunitaria innata no elimina una infección nueva, y células presentadoras de antígeno activadas que portan antígenos del agente patógeno se liberan hacia los tejidos linfoides drenantes. Para respuestas de ambos tipos, los mecanismos efectores pueden basarse en la elaboración de productos solubles que actúan sistémicamente (inmunidad humoral) o pueden requerir contacto directo de célula a célula o la actividad de citoquinas y quimioquinas que actúan en el microambiente celular (inmunidad celular) [Rich et al. \(2008\)](#).

2.2.5. Respuesta de células T

Existen varios subconjuntos de células T que se pueden diferenciar por las proteínas que expresan en su superficie una vez que culmina su desarrollo en el timo. En este sentido se encuentran dos grupos principales que son los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺. Las células T citotóxicas expresan moléculas de superficie CD8, mientras que la clase de células T colaboradoras portan moléculas de superficie CD4 [Murphy et al. \(2017\)](#).

Las células T CD8 pueden convertirse en células T citotóxicas para el momento en que abandonan el timo como linfocitos indiferenciados. En contraste, las células T CD4 después de ser activadas y diferenciadas (en distintos subtipos efectores), desempeñan un importante papel en la respuesta inmune mediadora a través de la secreción de citoquinas específicas [Luckheeram](#)

[et al. \(2012\)](#). Estas células llevan a cabo múltiples funciones, que van desde la activación de las células del sistema inmune innato, linfocitos B, células T citotóxicas, así como células no inmunes, y también juegan un papel crítico en la supresión de reacción inmune [Luckheeram et al. \(2012\)](#). Los tipos principales de células T efectoras CD4 se clasifican en T-helper 1 (Th1) y células T-helper 2 (Th2). Estos incluyen T-helper 17 (Th17), células T auxiliares foliculares (Tfh), células T de regulación inducida (iTreg), y las células tipo 1 reguladoras (Tr1), así como el T-helper 9 (Th9). La diferenciación de los diferentes linajes depende de la compleja red de factores específicos de señalización y transcripción, de las citoquinas presentes en el ambiente y de modificaciones epigenéticas [Luckheeram et al. \(2012\)](#).

Las células Th1 activan macrófagos infectados, mediante contacto celular y la secreción focal de IFN- γ . Esto genera una serie de respuestas bioquímicas que convierten el macrófago en una potente célula efectora antimicrobiana (figura 2.2). Los macrófagos activados fusionan de manera más eficiente sus lisosomas con los fagosomas, lo cual expone microorganismos intracelulares o recién ingeridos a una variedad de enzimas lisosómicas microbicidas. Los macrófagos activados también producen radicales de oxígeno y óxido nítrico (NO), ambos con potente actividad antimicrobiana [Murphy et al. \(2017\)](#).

2.2.6. Respuesta inmune frente a la infección por *T. cruzi*

La respuesta inmune innata puede operar en al menos tres niveles en el control de la infección: (1) la detección y destrucción directa de parásitos por células del sistema inmune innato, en particular macrófagos y células dendríticas, (2) la activación de células dendríticas y macrófagos para convertirse en potentes células presentadoras de antígenos y así activadores de inmunidad adaptativa y (3) la detección de infección por células no hematopoyéticas [Tarleton \(2007\)](#).

Por otro lado, *T. cruzi* cuenta con un amplio repertorio de estrategias para la evasión del sistema inmune, entre ellas podemos citar: la evasión del sistema de complemento, la evasión de la respuesta celular de la inmunidad innata y diversas estrategias para retrasar la generación de una respuesta inmune adaptativa efectiva [Tarleton \(2007\)](#) [Kayama & Takeda \(2010\)](#) [Cardoso et al. \(2016\)](#).

La infección en mamíferos por parte de este parásito evoca una fuerte respuesta de citoquinas de tipo I, asociada a la producción de IL-12, IFN- γ e iNOS. Esta respuesta está vinculada al control del parásito durante la infección [Sibley & Andrews \(2000\)](#). A su vez, la secreción de estas citoquinas muestra la interacción entre factores del parásito y los receptores de tipo toll (TLRs) . Estos receptores juegan un rol muy importante en la respuesta celular que se genera en las células del sistema inmune innato, en particular el TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9, y en el mecanismo de transducción de señales que se genera por la activación del receptor [Kayama & Takeda \(2010\)](#).

Una de las características inmunológicas comunes a las infecciones con parásitos protozoarios intracelulares es la inducción de una respuesta T fuerte y persistente polarizada hacia T helper 1 [Sibley & Andrews \(2000\)](#) [Junqueira et al. \(2010\)](#). Aunque en la mayoría de los casos, esta fuerte respuesta Th1 está asociada con inmunidad protectora, se puede asociar también con la patogénesis debido a una reacción inflamatoria exuberante. El desarrollo de esta respuesta polarizada Th1 durante la infección con parásitos protozoarios es a menudo dependiente de las funciones de MyD88 e IL-12, y en el caso de la infección por *T. cruzi* implica la activación de los receptores TLR9 y TLR7 [Junqueira et al. \(2010\)](#). Para el caso de *T. cruzi* la activación de estos receptores en células dendríticas puede permitir la maduración de estas células favoreciendo que polaricen la respuesta T hacia una respuesta Th1 [Bafica et al. \(2006a\)](#) [Bartholomeu et al. \(2008\)](#).

En los últimos años, diferentes trabajos han demostrado el papel de las CDs durante la infección por *T. cruzi*. Se observó que la expresión de moléculas de superficie como MHC, CD80 o CD86 se reduce cuando las CDs reconocen antígenos de *T. cruzi* y esta respuesta es cepa específica. Esto limita la maduración de las CDs y la capacidad de presentación del antígeno a células T [Gil-Jaramillo et al. \(2016\)](#). Esta respuesta a los antígenos de *T. cruzi*, puede ser diferente de acuerdo a la cepa que invade, se ha observado que la variación de la respuesta está asociada a la virulencia de la cepa. Por ejemplo, durante la fase aguda las CDs esplénicas infectadas por la cepa Tehuantepec muestran baja expresión de moléculas CD86 y no pueden migrar hacia órganos o tejidos linfoides. En tanto, la cepa de alta virulencia de TcVI induce una regulación a la baja de la producción de citoquinas y de la capacidad endocítica en CDs derivadas de médula ósea. Estos resultados se acompañan con una supresión de MHCII de superficie, en comparación con las células no infectadas

Poncini et al. (2008). En base a estos resultados Gil-Jaramillo et al. (2016) proponen que las CDs pueden estar implicadas en la evasión del sistema inmune por parte de *T. cruzi*.

Por su parte, los macrófagos también juegan un rol importante en el control de la infección principalmente durante la fase aguda Cardillo et al. (2015). *T. cruzi* puede ser fagocitado por células fagocíticas profesionales como los macrófagos residentes cercanos al sitio de la infección, y una vez dentro debe enfrentarse y resistir a un ambiente hostil como es la vacuola parasitófora Cardoso et al. (2016). El ingreso puede ser mediante diversos mecanismos de endocitosis, en particular el ingreso mediante fagocitosis por parte del parásito ha sido ampliamente caracterizado (Barrias, Carvalho and De Souza, 2014). En líneas generales, receptores y moléculas de superficie de la célula hospedera (TLRs, galectinas, fibronectina, ácido siálico, entre otras), interactúan con moléculas presentes en la superficie del parásito (proteínas de superficie de la familia GP, mucinas, trans sialidasa, entre otras), y de esta manera se forma una vesícula que contiene al parásito. A esta vesícula se le unen lisosomas, formando así la vacuola parasitófora (revisado en Barrias, Carvalho and De Souza, 2014). Dentro de esta, la NADPH oxidasa asociada a membrana de macrófagos se activa, lo que lleva a la producción del radical superóxido, quien puede estimular la producción de H_2O_2 o bien reaccionar con el óxido nítrico (NO) derivado de la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible del macrófago, formando así peroxinitrito ($ONOO^-$) Piacenza et al. (2013). Este último es un potente agente citotóxico que puede actuar como tripanocida. La supervivencia del parásito depende, en parte, del control de los niveles de esta molécula dentro de la vacuola parasitófora. En este sentido, las defensas antioxidantes del parásito pueden reducir los niveles del peroxinitrito y así favorecer su supervivencia Piacenza et al. (2013). Ensayos de nuestro grupo mostraron que parásitos que sobreexpresan moléculas antioxidantes como c-TXNPx o su versión mitocondrial (m-TXNPx), presentan mayores tasas de supervivencia durante la infección de macrófagos murinos J774 Piñeyro et al. (2008). Una vez que los parásitos logran evadir el primer ataque del sistema inmune pueden dispersarse e invadir otros tipos celulares u otros órganos, como el corazón o el tracto digestivo. Otro mecanismo implicado en la evasión de la respuesta generada en macrófagos es la acidificación de la vacuola parasitófora; este mecanismo se ha descrito como clave en el pasaje de las formas tripomastigotas, presentes en la vacuola, a las formas amastigotas (forma re-

plicativa), en el citoplasma [Cardoso et al. \(2016\)](#). Los macrófagos al igual que las CDs son claves en la comunicación entre la inmunidad innata y adaptativa. En el contexto de la infección por parte de *T. cruzi*, los macrófagos pueden secretar IL-12 y esta citoquina ha sido descrita como un potente activador de la secreción de IFN- γ por parte de las células NK y los linfocitos T [Piacenza et al. \(2013\)](#).

Al inicio de la infección el parásito se vuelve un objetivo para el sistema de complemento del hospedero activando principalmente la vía alternativa y la vía de las lectinas [Cardoso et al. \(2016\)](#). Esta última, se inicia mediante la unión de lectinas de unión a manosa a carbohidratos de la superficie del parásito. Esta vía es responsable de casi el 70 % de la lisis mediada por el complemento del parásito durante la infección [Cestari & Ramirez \(2010\)](#). Por su parte, la vía alternativa se activa por una baja tasa de inactivación de C3 a C3b. Asimismo, como la infección progresa y se comienzan a generar anticuerpos anti *T. cruzi*, estos se pueden comenzar a unir a la superficie del parásito y así interactuar con la molécula C1 del complemento activando la vía clásica [Cestari & Ramirez \(2010\)](#) [Cardoso et al. \(2016\)](#).

A grandes rasgos, la evasión del complemento de *T. cruzi* se centra en diversas moléculas que interrumpen o inhiben la formación de la convertasa C3, una paso clave en todas las vías del complemento. Como todas las vías del complemento convergen con la formación de convertasa C3, al interrumpir su formación el parásito consigue una forma eficiente de alterar todas las respuestas mediadas por el complemento al mismo tiempo. Además de ser importante en la cascada del complemento, C3b también es una opsonina que es reconocida por los macrófagos e induce la fagocitosis. Por lo tanto, la inhibición de la formación de C3b también puede reducir la lisis del parásito a cargo de los macrófagos durante la infección [Cardoso et al. \(2016\)](#) [Ramírez-Toloza & Ferreira \(2017\)](#).

2.2.7. Propiedades inmunomoduladoras de las peroxirredoxinas

En la actualidad, no existen reportes sobre la respuesta inmune generada por c-TXNPx de *T. cruzi*. Sin embargo, diferentes trabajos se han realizado para determinar las propiedades inmunomoduladoras de peroxirredoxinas de otros parásitos e incluso, de algunas proteínas humanas de esta familia.

Estudios de la década del 90, demostraron que las Peroxirredoxinas 1 y 2 de mamíferos pueden comportarse como factores citosólicos de los glóbulos rojos que potencian la actividad citotóxica de las células asesinas naturales por lo que se denominaron “factor potenciador de las células asesinas naturales” [Shau et al. \(1993\)](#). Por otra parte, para la peroxirredoxina 4 humana se ha encontrado que una vez que es secretada puede actuar como una citoquina, activando NF- κ B y regulando positivamente la expresión de los genes dependientes de esta vía [HARIDAS et al. \(1998\)](#).

En cuanto a las peroxirredoxinas parasitarias, existen varios reportes que caracterizan las propiedades inmunes generadas por estas proteínas. En el caso de la peroxirredoxina del trematodo *Fasciola hepatica*, se observó que la misma favorece la inducción de macrófagos identificados como alternativamente activados que producen altos niveles de IL-10 y potencia la inducción de una respuesta de tipo Th2, capaz de inhibir respuestas celulares Th1. Asimismo, los macrófagos condicionados con la peroxirredoxina de *F. hepatica* promovieron la diferenciación de las células Th2 y suprimieron el desarrollo de células Th1 a partir de células T CD4⁺ naïve [Donnelly et al. \(2008\)](#).

En el mismo sentido, en *Toxoplasma gondii*, un parásito protozoario de relevancia en la salud humana, se ha demostrado que la peroxirredoxina es capaz de inducir un fenotipo de macrófagos alternativamente activados en un modelo murino promoviendo la liberación de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 e inhibiendo la activación del inflammasoma vía caspasa-1 [Castro & Tomás \(2008\)](#).

Las propiedades inmunomoduladoras de las peroxirredoxinas de miembros de la familia de los Tripanosomátidos también han sido estudiadas. Para el caso de la triparredoxina peroxidasa citosólica de *Leishmania infantum*, se observó que es capaz de generar anticuerpos específicos en pacientes que padecieron la infección [Santarém et al. \(2007\)](#). Sin embargo, pese a esto no se observaron propiedades inmunomoduladoras de esta enzima por sí misma. Cabe destacar que la triparredoxina peroxidasa citosólica de *Leishmania infantum* y *T. cruzi* sólo comparten un 60 % de similitud en su secuencia [Iyer et al. \(2008\)](#).

Por otro lado, datos de nuestro grupo revelaron que la interacción de c-TXNPx de *T. cruzi* con células epiteliales mostraron que la proteína es capaz de unirse e ingresar a las células y que dicha interacción promueve la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-8, IL-6 e IL-1 α) en células epiteliales. La interacción de las células hospederas con c-TXNPx produce un aumento de

la susceptibilidad a la infección en estas células así como un incremento en la proliferación celular [Chiribao et al. \(2014\)](#).

Por último, durante el transcurso de esta tesis se publicó un trabajo acerca de la respuesta generada por c-TXNPx de *T. cruzi* en ratones, en el que se mostró que la inyección con esta proteína en presencia de adyuvante de Freud, es capaz de generar anticuerpos específicos de los isotipos IgG2a e IgG1 [Bontempi et al. \(2017\)](#). A su vez, se observó que el balance de estos isotipos mostró evidencias de una respuesta de tipo Th1 con mayor producción de anticuerpos de IgG2a [Bontempi et al. \(2017\)](#).

2.3. Estado del arte

Aunque se han dedicado esfuerzos para descifrar la interacción entre el sistema inmune y antígenos de *T. cruzi*, aún hay mucho por investigar antes de la comprensión completa del papel la inmunidad innata y de la adaptativa en la inducción de la inmunidad contra estos antígenos [Gil-Jaramillo et al. \(2016\)](#). En este contexto, el estudio de las diferentes propiedades inmunomoduladoras de moléculas parasitarias es de particular interés. En particular, las TXNPxs resultan interesantes ya que poseen propiedades antioxidantes y últimamente se les ha atribuido propiedades inmunomoduladoras.

La función de las TXNPxs en proteger a *T. cruzi* del daño celular por especies reactivas del oxígeno ha sido bien caracterizada y estudiada, sus posibles propiedades inmunomoduladoras se desconocen en la actualidad. Es así que la caracterización de la respuesta inmune innata y adaptativa generada por la c-TXNPx permite aportar al conocimiento de la respuesta inmune que generan factores secretados por el parásito durante la infección. A su vez, el rol de las células dendríticas como nexo entre la inmunidad innata y adaptativa presenta particular interés debido a que ofrece un excelente modelo para conocer cómo esta proteína puede influir en la una respuesta inmune adaptativa específica [Piacenza et al. \(2013\)](#).

En este sentido, esta tesis busca aportar datos que colaboren en el esclarecimiento de la respuesta inmune generada por uno de los factores de virulencia de *T. cruzi*, y de esta manera contribuir en la búsqueda de moléculas que permitan la eliminación efectiva del parásito durante la infección.

2.4. Hipótesis

Estudios previos del grupo mostraron que c-TXNPx se secreta en el contexto de la infección, y que otras peroxirredoxinas de parásitos presentan propiedades inmunomoduladoras.

En este trabajo hipotetizamos que la c-TXNPx de *T. cruzi* posee propiedades inmunomoduladoras, en particular sobre las células dendríticas y que dichas propiedades dependen de su actividad enzimática.

2.5. Objetivo

Analizar la capacidad inmunomoduladora de la proteína c-TXNPx en un modelo murino, con foco en células presentadoras de antígenos y en la respuesta inmune adaptativa a nivel celular y humoral. Se estudiará la expresión de moléculas co-estimuladoras y citoquinas sobre células de la inmunidad innata, así como su capacidad para activar la respuesta inmune adaptativa. En este sentido se abordará la respuesta generada en poblaciones linfoides y la generación de respuesta humoral.

En particular los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Producir en un sistema heterólogo las proteínas recombinantes, c-TXNPx salvaje y mutante c-TXNPxC52S, libres de endotoxinas.
- Caracterizar las proteínas desde un punto de vista enzimológico y conformacional, a través del estudio del estado de oligomerización, el estudio del estado de oxidación, y su posible sobre-oxidación de las proteínas y la actividad peroxidasa.
- Analizar de las propiedades inmunomoduladoras de la c-TXNPx wild type y c-TXNPxC52S en CDs condicionadas en presencia o ausencia a estímulos de maduración.
- Analizar la capacidad de las c-TXNPx wild type y c-TXNPxC52S de inducir anticuerpos específicos.
- Determinar el tipo de respuesta de tipo T que generan las c-TXNPx salvaje y c-TXNPxC52S.
- Investigar si las propiedades inmunomoduladoras estudiadas dependen de la actividad peroxidasa de c-TXNPx.

Capítulo 3

Metodología

3.1. Obtención del plásmido

Se utilizó el plásmido pQE30 con el inserto correspondiente a la secuencia de c-TXNPx [Piñeyro et al. \(2005\)](#) y de c-TXNPxC52S (sustitución de la cisteína peroxidática por una serina), que contiene la secuencia codificante de la enzima sin actividad peroxidasa. Este plásmido agrega a la secuencia de interés una cola de 6 Histinas en la porción N-terminal, con alta afinidad por el Niquel, lo que permite la purificación de las proteínas recombinantes mediante una cromatografía de afinidad. El plásmido fue obtenido mediante miniprep a partir de bacterias *Escherichia coli* XL1 Blue y transformado mediante electroporación en bacterias *Clear coli*TM K12 con el fin de propagar el plásmido. Posteriormente, se purificó el plásmido y se transformó en bacterias *Clear coli*TM BL21 (DE3) con el fin de producir las proteínas recombinantes. A su vez, se realizó el mismo procedimiento pero con el plásmido sin inserto a modo de control. Este control se denominará Mock y se utilizó como control de purificación en los ensayos inmunológicos.

El interés en la cepa *Clear coli*TM de bacterias surge en el marco de la necesidad de obtener las proteínas recombinantes libres de endotoxinas bacterianas, para que de esta manera se pudiera analizar la respuesta inmune generada por las proteínas sin la interferencia del LPS. En líneas generales, las proteínas producidas en estas células se consideran virtualmente libres de endotoxinas debido a que las células poseen el LPS modificado y este no actúa como agonista del TLR4 humano [Mamat et al. \(2013\)](#). La generación de esta cepa se logró gracias a la delección de 7 genes involucrados en la síntesis de la

molécula del LPS y a una mutación de compensación adicional (msbA148) que permite la viabilidad de las células *Cleaver coli*TM en presencia del lípido IV_A, una molécula no glicosilada precursora de la biosíntesis de LPS que carece de las dos cadenas acilo secundarias del LPS Mamat et al. (2008) Mamat et al. (2015). Este lípido IV_A no induce la formación del complejo heterotetramérico entre el TLR4 humano y el factor de diferenciación mieloide-2; por lo tanto no desencadena la respuesta dependiente de NF- κ B con posterior producción de citoquinas proinflamatorias Mamat et al. (2013). Además, la falta de la cadena de oligosacáridos en el lípido IV_A permite su remoción de forma rápida.

En base a estos datos, se seleccionó esta cepa para la producción de las proteínas recombinantes y el Mock.

3.2. Producción de proteínas recombinantes

Las bacterias transformadas fueron cultivadas en 40 mL de medio de cultivo LB Miller con Ampicilina (50 μ g/mL) y Glucosa (0,5 %) durante una noche a 37° C. A continuación, se utilizó el cultivo como inóculo y se lo colocó en 1 L de medio de cultivo LB Miller. Luego de alcanzar una densidad óptica de 0,6 se indujo la expresión con 0,5 mM de IPTG durante una noche a 20 ° C. Posteriormente, se cosecharon las células mediante centrifugación a 4000 g durante 20 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en buffer de lisis (buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,6 conteniendo NaCl 500 mM e Imidazol 20 mM) e incubado durante 30 min con lisozima (1 mg/mL) en hielo. Luego se sonicó durante 1 min con 6 pulsos de 10 segundos con 10 % de potencia y se centrifugó a 15000 g durante 25 min con el fin de obtener una fase soluble libre de membranas y organelos. Una vez obtenida se filtró con un filtro de 0,45 μ m.

La cromatografía de afinidad se realizó con columnas HisTrapTM HP 5 mL (GE), se equilibraron con Buffer de lisis y recirculó el lisado durante 30 minutos, se realizaron dos lavados, el primero con 10 volúmenes de columna con buffer de lisis y el segundo con 5 volúmenes de buffer de lavado (buffer fosfato pH 7,6 conteniendo 50 mM, NaCl 500 mM e Imidazol 100 mM). A continuación, se eluyó mediante cambios en la fuerza iónica con buffer de elución (buffer fosfato 50 mM pH 7,6 conteniendo NaCl 500 mM e Imidazol 400 mM) y las fracciones obtenidas se unieron para dializar y concentrar usando tubos Vivaspín (Vivasciences) con buffer Hepes 50 mM pH 7,4 conteniendo NaCl 100 mM en agua apirogénica. La pureza de las proteínas se verificó mediante

SDS-PAGE.

3.3. Remoción de endotoxinas

La remoción de endotoxinas se realizó mediante cromatografía de afinidad con una columna de Polimixina B con afinidad por el LPS. A modo de preparación de la columna, se realizó un lavado de 5 volúmenes de columna con Deoxicolato de Sodio 1 %, de esta manera se remueven posibles trazas de endotoxinas de la columna. Posteriormente, se equilibró la columna con buffer Hepes 50 mM pH 7,4 conteniendo NaCl 100 mM y se aplicó la proteína. Luego de colectar el volumen muerto de la columna, se incubó la muestra durante 30 min de modo de favorecer la interacción entre las endotoxinas y la Polimixina B. A continuación, se colectó la proteína libre de endotoxinas y se realizaron 2 lavados con Buffer Hepes 50 mM pH 7,4 conteniendo NaCl 100 mM y por último se eluyeron las endotoxinas retenidas en la columna con Deoxicolato de Sodio 1 %.

A su vez, se analizó otro método de remoción de endotoxinas descrito por Aida y Pabst en que se utilizó el detergente Tritón X-114 (Aida and Pabst, 1990). Para la remoción de endotoxinas se adicionó Tritón X-114 al 1 % y se mezcló con vortex vigorosamente hasta que la muestra estuviera homogénea. Luego incubó en hielo durante 5 min y nuevamente se mezcló. A continuación, se incubó la muestra 5 min a 37° C y se centrifugó 7 s. Por último, se colectó la fracción soluble sin irrumpir el pellet. Este procedimiento se repitió tres veces con el fin de remover completamente las endotoxinas de la muestra proteica.

Las proteínas obtenidas se cuantificaron mediante el método de Bradford (Quick Start™ Bradford 1X Dyereagent de Bio-Rad Laboratories). Para ello, se utilizaron dos diluciones seriadas 1:10 y 1:20 que se sembraron por duplicado en una placa de 96 pocillos, utilizando un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (Albuminfraktion V pH 7,0 de AppliChem), de concentración conocida, en un rango de 0 a 1 mg/mL. Se aplicaron 5 μ L de muestra y 150 μ L del reactivo de Bradford y luego de 5 min se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro a temperatura ambiente.

3.4. Cuantificación de endotoxinas

La cuantificación de endotoxinas se realizó mediante el kit comercial LAL Pyrochrome® (Associates of Cape Cod Incorporated). En líneas generales este ensayo usa un lisado de amebocitos de *Limulus*, que es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). En presencia de endotoxinas, ciertos factores presentes en el lisado de amebocitos se activan en una cascada proteolítica que produce la escisión de un sustrato peptídico artificial incoloro presente en el kit. La escisión proteolítica del sustrato libera para-nitroanilina (pNA), que es amarilla y absorbe a $\lambda=405$ nm.

La prueba se realiza añadiendo un volumen de Pyrochrome® a un volumen de muestra e incubando la mezcla de reacción a 37 °C durante 28 min. Se utilizaron diluciones de las proteínas con el fin de obtener absorbancias que pudiesen interpolarse dentro de una curva estándar. Se realizó una dilución 1 en 100; a su vez, se utilizó un estándar de concentraciones crecientes de 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5; 5 y 50 UE/mL. Luego de la incubación se midió la absorbancia a 405 nm.

3.5. Ensayos de actividad enzimática

3.5.1. Reducción de proteínas

Se realizó el ensayo acoplado de actividad enzimática tanto con la proteína c-TXNPx como c-TXNPxC52S con modificaciones del publicado por Piñeyro [Piñeyro et al. \(2011\)](#). Se utilizó H₂O₂ como sustrato y se trabajó en condiciones de estado estacionario. La mezcla de reacción contuvo NADPH, Tripanotión reductasa de *T. cruzi* (TcTR), tripanotión (T(SH)₂) y Triparredoxina de *T. cruzi* (TXNI). El curso de la reacción se siguió mediante la oxidación del NADPH a través de absorbancia a $\lambda=340$ nm ($\epsilon=6220$ M⁻¹cm⁻¹) en placas de 384 pocillos en un lector de placas *Multiskan Ascent one-channel vertical light-path filter photometer* (Thermo Electron Co.).

3.5.2. Análisis de datos

Se calcularon velocidades iniciales a partir de las gráficas de $\Delta\text{Abs}_{340\text{nm}}$ vs tiempo. Las velocidades iniciales se calcularon como la pendiente del gráfico

en la fase lineal, en donde se supone que aún no se ha consumido el 10 % del sustrato según la ecuación 3.1.

$$v_0 = \frac{\Delta_{Abs340nm}}{Tiempo(min)} \quad (3.1)$$

Estas velocidades fueron expresadas en unidades de $\mu\text{M NADPH/min}$, para ello se utilizó la ecuación de Lambert-Beer en donde se dividió la pendiente obtenida en el gráfico antes mencionado por el producto entre el coeficiente de extinción molar del NADPH ($\epsilon=6220 \mu\text{M}^1\text{cm}^{-1}$) y el camino óptico (0,5 cm) según la ecuación 3.2.

$$v_0(\mu\text{M NADPH/min}) = \frac{v_0}{\epsilon \times \lambda} \quad (3.2)$$

En el capítulo resultados se presentan los gráficos de v_0 vs concentración de sustrato, para las concentraciones 50, 75, 100 y 200 μM de H_2O_2 .

A continuación se calculó la actividad enzimática (U) y la actividad específica (U_{esp}). La primera se calculó mediante el producto de la velocidad inicial y el volumen de reacción (50 μL), (ver ecuación 3.3). Por su parte, la actividad específica se calculó como en producto entre la actividad enzimática y el volumen de proteína (5 μL), dividido la concentración de proteínas (ver ecuación 3.4).

$$U(\mu\text{mol NADPH/min}) = v_0 \times Vol\ de\ reaccion\ (mL) \quad (3.3)$$

$$U_{esp}(U/mg) = \frac{U \times Concentracion\ de\ proteinas\ (mg/mL)}{Volumen\ de\ proteinas\ (mL)} \quad (3.4)$$

3.6. SDS-PAGE

Se realizaron geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) con el fin de analizar el estado de oligomerización y conocer el estado de pureza de las proteínas de las proteínas recombinantes, respectivamente.

Los SDS-PAGEs se realizaron con geles de acrilamida de 12 % en el gel separador (acrilamida 12 %; Tris-HCl pH 8,8 400 mM; Dodecilsulfato sódico 0,1 %; persulfato de amonio 0,1 %; N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina 0,1 %), y 5 % en el gel concentrador (acrilamida 5 %; Tris-HCl pH 6,8, 125 mM; Dodecilsulfato sódico 0,1 %; persulfato de amonio 0,1 %; N,N,N',N'-

tetrametiletenodiamina 0,1 %). Se utilizó un buffer de corrida que contiene buffer Tris (25 mM)-Glicina (192 mM) pH 8,3. La técnica se realizó en una cuba de corrida de geles (Amersham Biosciences), con un voltaje de 300 V y una intensidad de 25 mA, por el lapso de 1h- 1h 10 min. Las muestras se prepararon en un buffer de muestra compuesto por Tris-Cl pH 6,8, 500 mM; dodecilsulfato sódico 2 %, azul de bromofenol 0,1 %, dithotreitól 100 mM; β -mercaptoetanol 100 mM. Luego de la corrida los geles se tiñeron durante 10 min con Azul de Coomassie.

3.7. Western Blot

Una vez separadas las proteínas en base a su peso molecular, fueron transferidas a una membrana de PVDF (Biorad Laboratories 0.45 μ m) en la cuba de transferencia TE 22 *Tank Transfer Unit* de Amersham Biosciences, con un Buffer de transferencia (Tris 25 mM Glicina 192 mM Etanol 20 %), en el que se equilibró la membrana y el gel durante 10 min, y se transfirió durante 1 hora y 30 min a 4° C. El voltaje y la intensidad que se utilizaron fueron de 100 V y 300 mA, respectivamente.

Finalmente, se procedió a teñir la membrana con Rojo Ponceau, y el gel con Azul de Coomassie para evidenciar la eficiencia de la transferencia.

La membrana con las proteínas transferidas, se bloqueó durante toda una noche a 4°C con una solución PBS- Leche 5 % pH 7,4. Se incubó con un anticuerpo específico que reconoce un anticuerpo que reconoce la cisteína peroxidática hiperoxidada a ácido sulfínico para evaluar la sobreoxidación de la molécula (α -SOOH), por lo que en c-TXNPx52S no está presente el epítipo que reconoce dicho anticuerpo. Se utilizó a una concentración de 1:2000 en solución de buffer fosfato salino (PBS) con BSA 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBS-Tween (0,1 %) se incubó con un anticuerpo α -IgG de conejo acoplado a peroxidasa a una concentración 1:10.000 en la misma solución que el anticuerpo primario. El revelado se realizó utilizando un sustrato luminiscente con el kit ECL (*SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* de Thermo Scientific). La detección se hizo por autorradiografía y la señal se cuantificó con el software ImageJ.

Luego se realizó un *stripping* de la membrana con una solución que contuvo 100 mM de β -mercaptoetanol, 2 % SDS en buffer Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7, durante 15 min a 50°C. Luego se realizaron 2 lavados con PBS y se bloqueó la

membrana nuevamente como se describió en el párrafo anterior. A continuación se incubó la membrana con un anticuerpo contra la proteína Tc c-TXNPx generado en conejo por Dra. Dolores Piñeyro y Dr. Carlos Robello, a una concentración 1:5000 en solución de buffer fosfato salino (PBS) con BSA 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa, a una concentración 1:10000, en la misma solución que el anticuerpo primario. El revelado se realizó utilizando un sustrato luminiscente con el kit ECL (*SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* de Thermo Scientific). La detección se hizo por autorradiografía y la señal se cuantificó con el software ImageJ.

3.8. Cromatografía de exclusión molecular

Este ensayo se realizó con el fin de profundizar acerca del estado de oligomerización de las proteínas recombinantes, que posteriormente se utilizaron en los ensayos inmunológicos. Las proteínas a ensayar c-TXNPx y c-TXNPxC52S se analizaron sin alterar su estado de reducción u oxidación luego de la purificación.

Se utilizó un equipo ÄKTA pureTM (GE) en el cual se acopló una columna de Sephadex 200 10/300. La misma se equilibró con buffer Hepes 50 mM pH 7,4 en el cual contuvo NaCl 100 mM. Posteriormente, se inyectaron las proteínas en los distintos estados de oxidación y se colectaron los picos que presentaban mayor absorbancia a $\lambda=280$ nm.

3.9. Animales

En este trabajo se utilizaron ratones machos y hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Los animales fueron provistos por el bioterio del Institut Pasteur de Montevideo y por la Unidad de Reactivos Biológicos y de Experimentación de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República. El punto final de todos los animales se realizó mediante dislocación cervical. Todos los experimentos realizados se encuentran al amparo del protocolo Exp. N° 070153-000320-13 “Evaluación de la Capacidad inmunomoduladora y otras propiedades inmunológicas por parte de proteínas de Trypanosomacruzi” aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal.

3.10. Purificación de células CD11c⁺ esplénicas naïve

La obtención de CDs se realizó a partir de bazos de animales vírgenes. Luego de extraídos los bazos se cortaron en fragmentos pequeños y se colocaron en medio completo (medio de cultivo RPMI y suero fetal bovino (SFB) al 10 %, β -mercaptoetanol 0,1 %), con colagenasa (0,28 unidades/mg). A continuación, se incubaron 30 minutos a 37° C y se disgregaron. Posteriormente, se lisaron los glóbulos rojos con buffer Amonio-Cloruro-Potasio (ACK; NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 10 mM, EDTA 1 mM) pH 7,4 durante 1 minuto. Se detuvo la lisis con PBS 1X y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. De esta manera se obtuvieron los esplenocitos totales a partir de los cuales se purificaron las células CD11c⁺ mediante el kit *MojoSortTM Mouse CD11c Nanobeads* (Biolegend).

3.11. Condicionamiento de células CD11c⁺ purificadas

Las células CD11c⁺ esplénicas (20.000 por pocillo) se incubaron con concentraciones crecientes (1,2; 6 y 30 μ g/mL), de c-TXNPx salvaje, c-TXNPxC52S y Mock, a modo de control negativo, durante toda una noche a 37°C a 5 % CO₂. Al día siguiente se colectó el sobrenadante para la cuantificación de IL-6, IL-10 e IL-12 por ELISA. A su vez, las células se colectaron y se marcaron con anticuerpos específicos de moléculas co-estimuladoras [α -CD40 (HM40-03), α -MHCII (M5/114.15.2), α -CD80 (16-10 A1) y α -CD68 (GL1)] para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Las células fueron analizadas con un citómetro CyAn ADP (Beckman-Coulter), se adquirieron 30.000 eventos y se analizaron mediante el software Summit 4.3.

3.12. Determinación de citoquinas por ELISA

Los ensayos de ELISA se realizaron en placas de 96 pocillos. Se sensibilizó con anticuerpos α -IL-6, α -IL-12p23/40, o α -IFN γ según la citoquina que se buscaba interrogar en Buffer Fosfato pH 9 durante una noche a 4° C. En el caso de α -IL-10 se utilizó buffer fosfato pH 6,5. Al día siguiente, se bloqueó con PBS-Tween (0,1 %)- Gelatina (1 %) durante 1 hora a 37° C.

Posteriormente se incubaron los sobrenadantes de cultivo durante 1 hora a 37° C, para el caso de la cuantificación de IL-10, se incubó durante una noche a 4° C. A su vez, se incubó un estándar de citoquinas de concentraciones crecientes con el fin de construir una curva estándar que permitió estimar la concentración en la muestra problema. A continuación, se incubó con anticuerpos biotilados anti-citoquinas (α -IL-6, α -IL-12, α -IL-10 o α -IFN γ , según el caso), se incubó 1 hora a 37° C. Luego, se incubó con streptavidina 1:1000 (Biolegend) durante 45 minutos a 37° C. Por último, se realizó el revelado con o-Fenilenediaminadihidroclorhídrico (OPD) 10 mg (Sigma Aldrich), en 20 mL de buffer citrato-fosfato pH 5. A su vez, se adicionó 80 μ L de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La reacción se cortó con ácido clorhídrico (HCl) 3 M. Se midió mediante absorbancia a λ =492 nm en lector de placas *Multiskan Go* (Thermo Scientific).

3.13. Inoculaciones

Los animales recibieron entre 6 y 11 inoculaciones intra-peritoneales de c-TXNPx salvaje, c-TXNPX C52S (10-20 μ g por inoculación) y Mock, utilizando PBS como vehículo.

Luego de 2 días después de la última inoculación, los animales fueron sacrificados, sangrados (para recuperar el suero), y se recolectó el bazo y las células de la cavidad peritoneal (PEC).

3.14. Titulación de anticuerpos específicos

Con el fin de evaluar el nivel de anticuerpos específicos generados (de isotipos IgM, IgG, IgG1 e IgG2a), se sensibilizaron placas con c-TXNPx (10 μ g/mL) en buffer carbonato/bicarbonato 100 mM pH 6,5 durante toda una noche a 4° C. A continuación, se bloqueó la placa con Gelatina (Sigma Aldrich) 1 % en PBS, durante 1 hora a 37° C. Posteriormente, se incubaron los sueros provenientes de los animales inoculados en diluciones seriadas 1:100, 1:300, 1:900 y 1:2700 realizadas en PBS conteniendo Tween 0,1 % y gelatina 0,5 %, durante 2 horas a 37° C. Luego, se incubó con anticuerpos α -IgM, IgG IgG1 e IgG2 durante 1 hora a 37° C. Finalmente, se realizó el revelado con OPD 10 mg, en 20 mL de buffer citrato-fosfato pH 5. A su vez, se adicionó 80 μ L de H₂O₂. La

reacción se cortó con HCl 3 M y se midió mediante absorbancia a 492 nm.

3.15. Obtención de PEC

Para la recolección de PEC se cortó la piel exterior de los animales sacrificados a la altura de la pelvis y suavemente se tiró de la piel hacia arriba para exponer la piel interna que recubre la cavidad peritoneal. Se inyectaron 5 ml de PBS frío en la cavidad peritoneal usando una aguja 27G. Después de la inyección, se masajeó suavemente el peritoneo para desalojar las células unidas en la solución de PBS. A continuación, se insertó una aguja 25G con el bisel hacia arriba y se colectó el líquido. Se centrifugó la suspensión celular recogida a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C.

3.16. Caracterización del fenotipo de las células de la cavidad peritoneal

Se caracterizó el fenotipo de las poblaciones presentes en la cavidad peritoneal de los animales inoculados mediante citometría de flujo. Para ello, se utilizaron marcadores de superficie tales como: CD11c (N418), F4/80 (BM8), MHCII (M5/114.15.2), CD40 (HM40-3), CD80 (16-10A1), CD68 (GL1), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), Ly6G (RB6-8C5), Ly6C (M1/70) y CD11b (M1/70) en buffer FACS (FBS 2 % en PBS). La marcación con estos anticuerpos se realizó en una placa de fondo cónico a 4°C y en oscuridad durante 30 min. Posteriormente se lavaron las células y se fijaron con Formaldehído al 0,1 % durante 20 min. Las células fueron analizadas con un citómetro CyAn ADP (Beckman-Coulter), se adquirieron 30.000 eventos y se analizaron mediante el *software* Summit 4.3.

A su vez, se utilizaron células de la cavidad peritoneal para la marcación de citoquinas intracelulares en células CD11c⁺ y F4/80⁺. Para ello, se realizó un ensayo con Brefeldina A, la cual inhibe el transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi. La incubación de las células con esta droga permite cuantificar la expresión de citoquinas de forma intracelular, y de esta manera poder asociar dicha expresión al fenotipo celular mediante el uso de anticuerpo que reconocen moléculas de superficie.

En este sentido, las células fueron incubadas con brefeldina 1:1000 duran-

te 6 horas. Luego de la incubación se realizaron lavados con buffer FACS y se comenzó con el protocolo de tinción intracelular de las citoquinas IL-10 e IL-12. En una primera instancia, se realizó la marcación de las moléculas de superficie con anticuerpos α -CD11c (N418), α -F4/80 (BM8). La marcación se realizó en buffer FACS durante 20 min a 4°C. A continuación, se realizaron lavados y posteriormente, se realizó la fijación y la permeabilización de las células con buffer comercial “*Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set*” (eBiosciences) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se realizó la marcación de las citoquinas intracelulares con anticuerpos α -IL-10 (JES5-16E3) y α -IL-12 (C15.6). La marcación se realizó 30 min a temperatura ambiente. Por último, se lavaron las células y se resuspendieron en buffer FACS. Las células fueron analizadas con un citómetro CyAn ADP (Beckman-Coulter), se adquirieron 30.000 eventos y se analizaron mediante el software Summit 4.3.

3.17. Obtención de esplenocitos totales

Con el animal en la posición decúbito dorsal, se realizó un corte longitudinal de la piel que abarcó todo el abdomen del animal. Se removió el bazo con la ayuda de tijeras y pinzas y se colocó en medio completo. A continuación, se disgregó el bazo con placas esmeriladas y lisaron los glóbulos rojos con buffer ACK. Una vez lisados se contaron los esplenocitos viables (con Tripan blue) y se reservaron para posteriores ensayos *in vitro*.

3.18. Análisis de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo

Los esplenocitos totales fueron marcados con anticuerpos de superficie para caracterizar poblaciones de origen linfóide y mieloide presente en los bazos de los animales inoculados. Los marcadores que se utilizaron para la línea linfóide fueron: α -CD3 (17A2), α -CD4 (RM4-5), α -CD8 (53-6.7), α -CD19 (eBio1 D3), α -CD25 (PC61.5) y α -FoxP3 (FJK-16s).

A su vez, se utilizaron esplenocitos totales para la marcación de citoquinas intracelulares en células T CD4⁺. Para ello, se realizó un ensayo con Brefeldina A como se explicó anteriormente. En este sentido, los esplenocitos fueron

incubados con brefeldina 1:1000 y con Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 50 ng/mL durante 6 horas. A diferencia de las células de la cavidad peritoneal, el PMA se adiciona a los esplenocitos con el fin de proporcionar un estímulo policlonal e inespecífico, y así fomentar la activación de las células. Luego de la incubación se realizaron lavados con buffer FACS y se comenzó con el protocolo de tinción intracelular de las citoquinas IL-4, IL-17 e IFN- γ , y del factor de transcripción FoxP3 en el caso de los linfocitos T reguladores.

En una primera instancia, se realizó la marcación de las moléculas de superficie con anticuerpos α -CD3 (17A2), α -CD4 (RM4-5) y α -CD25 (PC61.5) para la búsqueda de linfocitos T reguladores y con anticuerpos α -CD3 (17A2) y α -CD4 (RM4-5) para el análisis de la polarización de los linfocitos T CD4⁺. La marcación se realizó en buffer FACS durante 20 min a 4°C. A continuación, se realizaron lavados y posteriormente, se realizó la

fijación y la permeabilización de las células con buffer comercial “*Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set*” (eBiosciences) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se realizó la marcación del factor de transcripción FoxP3 con un anticuerpo α -FoxP3 (FJK-16s) y con anticuerpos para las citoquinas intracelulares α -IFN- γ (XM61.2), α -IL-4 (11B11) y α -IL-17 (TC11-18H10.1). La marcación se realizó 30 min a temperatura ambiente. Por último, se lavaron las células y se resuspendieron en buffer FACS. Las células fueron analizadas con un citómetro CyAn ADP (Beckman-Coulter), se adquirieron 30.000 eventos y se analizaron mediante el *software* Summit 4.3.

3.19. Ensayos de proliferación

Se estudió la proliferación de los esplenocitos provenientes de los animales inoculados. Con este fin, se incubaron los mismos con la sonda Carboxifluoresceinasuccinimidilester (CFSE) durante 30 min a 37° C según las indicaciones del fabricante. A continuación se dispuso 1x10⁶ células/pocillo en una placa de 96 y se incubaron durante 5 días con c-TXNPx (10 μ g/mL), c-TXNPxC52S (10 μ g/mL), Mock (igual volumen que c-TXNPx), Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y Ionomicina (respectivamente), como activador de la proteína quinasas C. Se incubaron las células con medio completo a modo de control. Luego de 5 días se colectó el sobrenadante para la cuantificación de IFN- γ mediante ELISA y se marcaron las células con anticuerpos α -CD4 y α -CD8. Las células se analizaron mediante citometría de flujo.

Dado que la sonda CFSE se diluyó a medida que las células se dividieron, la desaparición de la tinción permitió tener una aproximación al porcentaje de células que proliferaron frente a un estímulo determinado. Estas se definieron como $CD4^+$ o $CD8^+/CFSE^{low}$. El análisis de los datos se realizó mediante el cálculo de un índice de proliferación (IDP). Para ello, se obtuvo la relación entre el porcentaje de células $CD4^+/CFSE^{low}$ en la condición estimulada y sin estimular (medio), ver 3.5.

$$IDP = \frac{CD4^+ \text{ o } CD8^+ / CFSE^{low} \text{ frente a estímulo}}{CD4^+ \text{ o } CD8^+ / CFSE^{low} \text{ frente a medio}} \quad (3.5)$$

3.20. Ensayos de presentación antigénica

Con el fin de profundizar acerca de la presentación de los antígenos analizados en este trabajo se realizó un ensayo de presentación antigénica por parte de células $CD11c^+$. Mediante este ensayo se buscó elucidar si existía alguna diferencia entre c-TXNPx y c-TXNPxC52S, en modular la presentación de epítopes por parte de células $CD11c^+$ a linfocitos específicos. En este sentido, se incubaron células $CD11c^+$ purificadas a partir de bazos de animales naïve (ya descrito anteriormente), con c-TXNPx, c-TXNPxC52S (1,2; 6 y 30 $\mu\text{g/ml}$) y Mock a modo de control durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente, se colectó el sobrenadante de cultivo con el fin de cuantificar IL-6, IL-12 e IL-10 y posteriormente, las células fueron lavadas.

En paralelo, se inocularon ratones con las proteínas y mock (una por semana durante tres semanas, con 20 μg de proteína, vía intraperitoneal) en presencia de adyuvante de Freund incompleto, para obtener linfocitos T específicos. Luego de una semana de la última inoculación se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se disecaron los bazos para obtención de esplenocitos totales. Éstos, se marcaron con CFSE y se incubaron en la proporción 1:50 con respecto a las células $CD11c^+$. El co-cultivo de células $CD11c^+$ y esplenocitos específicos se mantuvo durante 5 días y al cabo de este tiempo se colectó el sobrenadante con el fin de cuantificar IFN- γ . A su vez, las células se marcaron con anticuerpos α -CD4 y α -CD8 para de analizar mediante citometría de flujo la proliferación de estas poblaciones. En este ensayo se realizaron controles de proliferación de los esplenocitos sin antígenos y sin células $CD11c^+$ con el fin de conocer la tasa de proliferación basal de los mismos en los diferentes grupos.

El análisis de los datos se realizó mediante el cálculo de un índice de pro-

liferación (IDP). Para ello, se obtuvo la relación entre el porcentaje de células $CD4^+$ /CFSE^{low} en la condición estimulada y sin estimular (medio), ver 3.5.

3.21. Ensayos de modulación de la presentación antigénica de OVA

Continuando en la línea del objetivo que se buscó elucidar con el ensayo anterior se realizó un ensayo de modulación de la presentación de un antígeno específico. Para ello se utilizó la presentación de la ovoalbúmina (OVA) por parte de células $CD11c^+$ y posteriormente se las co-cultivo con esplenocitos provenientes de ratones OT-II (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn/Crl). Estos ratones fueron gentilmente cedidos por el Dr. Álvaro Díaz. En líneas generales, estos ratones transgénicos expresan las cadenas alfa y beta del receptor de células T que en conjunto con el co-receptor $CD4$ se unen específicamente al péptido de ovoalbúmina 323-329 aviar, cuando este es presentado por el MHCII. Luego del reconocimiento del péptido se produce una proliferación los linfocitos T $CD4^+$. Este modelo animal resulta de gran utilidad a la hora de estudiar distintos aspectos de la biología de células T *in vivo* tales como: las interacciones de TCR-ligando, la activación de células T, la selección tímica, la presentación cruzada de antígenos y la tolerancia e inducción de células T centrales y periféricas (The Jackson Laboratory, 2018).

El ensayo consistió en incubar células $CD11c^+$ con la proteína OVA (0,3 mg/mL) y distintas concentraciones de c-TXNPx, c-TXNPxC52S (0; 1,2; 6 y 30 μ g/mL) y Mock (mismo volumen que c-TXNPx), en presencia o ausencia de CpG, un agonista de TLR9. La incubación se realizó durante una noche a 37°C. Al día siguiente se colectó el sobrenadante para la cuantificación de IL-6, IL-12 e IL-10 y posteriormente se incubó las células $CD11c^+$ con los esplenocitos totales o con células T $CD4^+$ provenientes de animales OT-II. Estos fueron marcados con CFSE. Luego de tres días se colectó el sobrenadante para la cuantificación de IFN- γ y se marcaron las células con un anticuerpo α - $CD4$. Las células marcadas fueron analizadas mediante citometría de flujo.

El análisis de los datos se realizó mediante el cálculo de un índice de proliferación (IDP). Para ello, se obtuvo la relación entre el porcentaje de células $CD4^+$ /CFSE^{low} en la condición estimulada y sin estimular (medio), ver 3.5.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Obtención y caracterización bioquímica de c-TXNPx y su mutante inactiva c-TXNPxC52S

En este capítulo se resumen los principales resultados obtenidos con respecto a la caracterización bioquímica de las proteínas, que posteriormente fueron utilizadas en los ensayos inmunológicos. Se presentan resultados de la obtención de las proteínas recombinantes y la remoción de endotoxinas del preparado proteico. Por otro lado, se presenta una caracterización bioquímica de ambas proteínas que incluye: la actividad peroxidasa, el estudio del estado de sobreoxidación de la Cisteína 52 en c-TXNPx y del estado de oligomerización de ambas proteínas.

4.1.1. c-TXNPx y su mutante inactiva c-TXNPxC52S

El clonado a partir de ADN genómico de la cepa CL Brener, y la versión del mutante inactivo estuvo a cargo de la Dra. Piñeyro [Piñeyro et al. \(2011\)](#). En la figura [4.1](#) se presenta un alineamiento entre las secuencias proteicas de la enzima salvaje y mutante. El alineamiento se realizó con el software en línea “*Pairwise Sequence Alignment*” el cual utiliza un algoritmo basado en LA-LIGN. El alineamiento mostró que la única diferencia entre ambas secuencias es en la cisteína peroxidática en la posición 52, la cual fue sustituida por una serina. Esta mutación sustituye el grupo tiol de la cisteína por un hidroxilo en la serina, lo que permite disecar el rol del grupo tiol en la actividad pe-

roxidasa y en el estado de oligomerización. En la imagen, se destacan en azul los aminoácidos que forman el sitio activo y en naranja aquellos involucrados en la actividad peroxidasa. Estos últimos forman un bolsillo alrededor de la cisteína resolutive (en la posición 173, señalada con una flecha en la imagen), formando así un entorno hidrofóbico que mantiene a dicha cisteína en estado reducido.

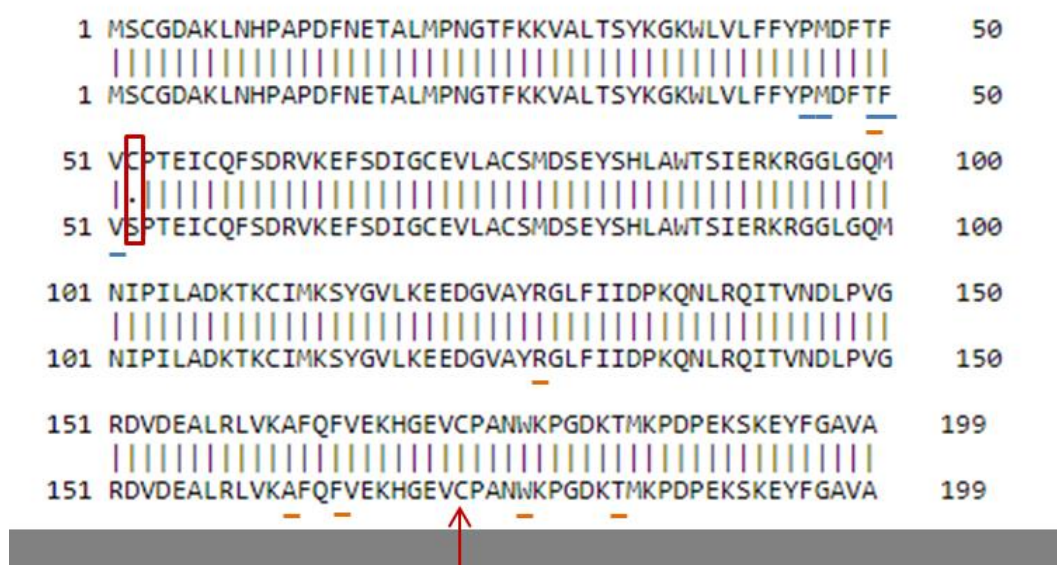


Figura 4.1: Alineamiento local entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas c-TXNPx y c-TXNPxC52S. Se utilizó el software “*Pairwise Sequence Alignment*”. Se señala la cisteína peroxidática en la posición 52 y en la proteína mutante denotado con un cuadro rojo en la figura. Con la flecha se indica la cisteína resolutive en la posición 173. En azul se destacan los aminoácidos que forman al sitio activo (P, M, T, F y V); y en naranja se muestran aminoácidos con relevancia en el mecanismo de actividad (A, F, W y T).

4.1.2. Producción de proteínas recombinantes y remoción de endotoxinas

Expresión y determinación de la solubilidad de las proteínas expresadas c-TXNPx y cTXNPxC52S

La producción de c-TXNPx salvaje c-TXNPxC52S y Mock se realizó en bacterias *Cleaver coli*TM. Cabe recordar de los capítulos anteriores que el Mock se corresponde a un control, en el que se utilizó bacterias transformadas con el vector de expresión sin inserto y se realizaron los mismos procedimientos de inducción y purificación que se utilizaron para c-TXNPx y c-TXNPxC52S.

Para la producción de las proteínas o el Mock, se realizó un cultivo inicial de 20 mL que se incubó durante 1 noche a 37° C en presencia de ampicilina y glucosa. Al día siguiente, este cultivo se inoculó en 1 litro de medio y se dejó crecer hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.6. A continuación, se realizó la inducción de la expresión con IPTG 0.5 mM. Se dejó la inducción durante una noche y se cosecharon las células. Estas, a su vez, se incubaron con lisozima 1 mg/mL y se sonicaron con el fin de romperlas. Además, se centrifugaron a 15000 g con el fin de separar la fase soluble e insoluble y así obtener un extracto que permitiera la purificación de la proteína. La selección de la cepa bacteriana utilizada se basó en la capacidad de estas células de generar un LPS modificado menos activador de las células del sistema inmune y que no es reconocido por el TLR4 humano.

En SDS-PAGE se observó que en el cultivo inducido (carril 2 de los geles B y C, figura 4.2) aparece una banda mayoritaria de 25 kDa que se corresponde con el monómero tanto de la proteína c-TXNPx como de c-TXNPxC52S.

Se determinó que las proteínas c-TXNPx y c-TXNPxC52s se expresan tanto en la fracción insoluble y soluble, como se observa en los geles B y C (carriles 3 y 4, respectivamente, figura 4.2). Se eligió la fracción soluble para la purificación de las proteínas debido a la facilidad para manipular dicha fracción y también debido a que en esta fracción se logra purificar la proteína c-TXNPx de forma nativa con actividad enzimática.

Con respecto al Mock (gel A de la figura 4.2), se observó la aparición de una proteína en el cultivo inducido (carril 2 del gel A). Esta proteína se podría corresponder con alguna proteína cuya expresión es inducible con el agregado de IPTG. Sin embargo, no presenta cola de histidina ya que no queda unida a la columna de afinidad de níquel. Esto se muestra en la figura 4.2.

En resumen, la expresión de las proteínas c-TXNPx salvaje y la mutante fue inducible con la adición de IPTG al cultivo de bacterias y ambas proteínas se expresan de forma soluble en este sistema. Pese a que en la fracción inducible del Mock se observó la inducción de la expresión de una proteína, esta inducción es inespecífica y no se corresponde con una secuencia inserta en el vector de expresión.

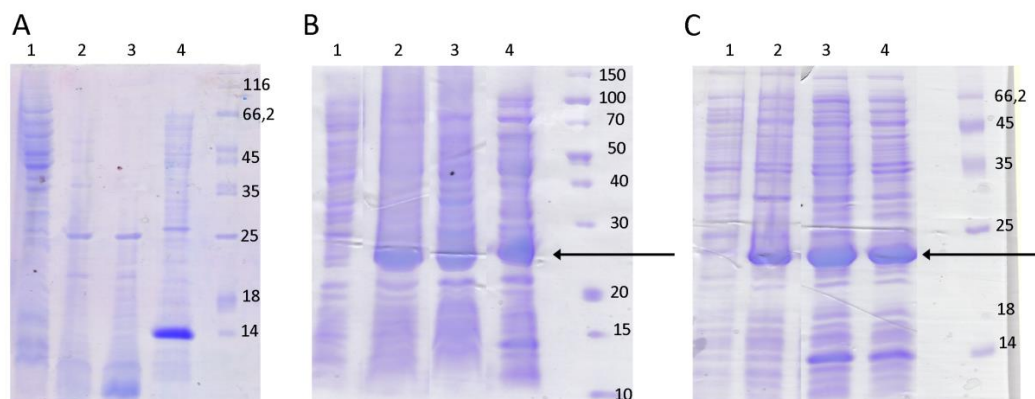


Figura 4.2: Expresión y determinación de la solubilidad de las proteínas c-TXNPx y c-TXNPxC52S en cultivos de bacterias *Clear coli* BL21 (DE3). A. Mock. B. c-TXNPx. C. c-TXNPxC52S. Carril 1: cultivo sin inducir; Carril 2 cultivo luego de la inducción con IPTG; Carril 3 fracción insoluble y Carril 4 la fracción soluble. Se señala con una flecha la banda de 25 kDa que se corresponde con el monómero de c-TXNPx o c-TXNPxC52S en las figuras B y C. SDS-PAGE al 5 % y 12 %.

Purificación de las proteínas recombinantes c-TXNPx y c-TXNPxC52S

A continuación, procedimos a purificar las proteínas recombinantes expresadas en el sistema heterólogo. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel. El vector donde fueron clonados los genes de la c-TXNPx salvaje y mutante les adiciona una secuencia 6 histinas en el extremo N-terminal, y las histidinas tienen afinidad para unirse al níquel. En este sentido, se equilibró la columna de níquel con buffer fosfato que contenía 20 mM de imidazol pH 7,6 y se inyectaron las fracciones solubles obtenidas de los cultivos bacterianos. Estas recircularon por las columnas y posteriormente se realizaron lavados con el fin de eliminar uniones inespecíficas. Por último, se realizó la elución de las proteínas con buffer fosfato que contuvo 400 mM de imidazol pH 7,6 (la composición de los buffers utilizados se detallan en materiales y métodos).

En la figura 4.3 se muestra el resultado de la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad en SDS-PAGE. Con respecto a las proteínas c-TXNPx y c-TXNPxC52S se observan bandas a partir del eluido 2 (carril 5, figura 4.3 B y C). Se observa una banda de alrededor de 25 kDa que se corresponde con monómeros de esta proteína. Sin embargo, se observan bandas de mayor tamaño que se corresponden con el peso molecular de homodímeros y

oligómeros de alto peso molecular (HMW) de la c-TXNPx y de c-TXNPxC52S (carril 5-9, figura 4.3 B y C). Este patrón ha sido observado para estas proteínas previamente en el laboratorio. Se puede observar que para el Mock (figura 4.3 A) no hay bandas en los eluidos y que la proteína inducible por la adición de IPTG no aparece en los mismos (carriles 4-9 del gel A figura 4.3).

Esta observación se corresponde con lo ya reportado para esta enzima por Piñeyro y col. cuando caracterizaron esta enzima. A su vez, varios miembros de la familia de las peroxirredoxinas presentan la capacidad de formar oligómeros Piñeyro et al. (2011).

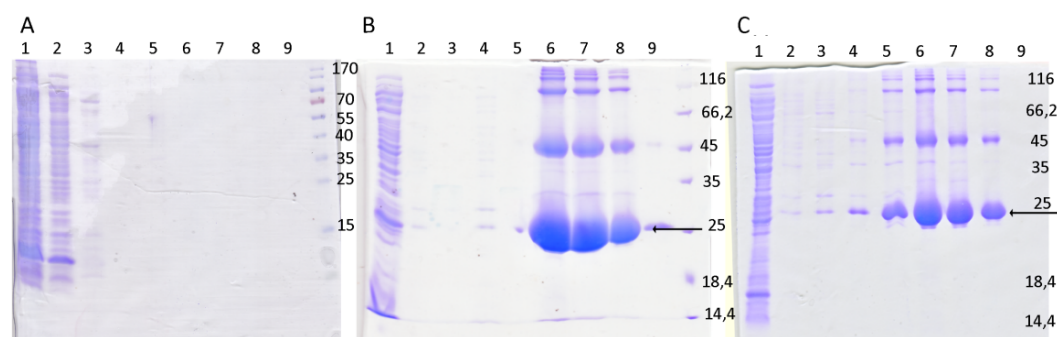


Figura 4.3: Purificación de las proteínas recombinantes c-TXNPx y c-TXNPxC52S. A) Mock. B) c-TXNPx. C) c-TXNPxC52S. SDS-PAGE al 12 % de acrilamida de las fracciones obtenidas mediante IMAC. Carril 1: fracción no unida; carriles 2 y 3: lavados, carriles 4 al 9: eluidos y carril 10: marcador de peso molecular Thermo Fisher. Con una flecha se señala el monómero de 25 kDa para c-TXNPx y c-TXNPxC52S.

Posteriormente, se analizó mediante SDS-PAGE la pureza de las proteínas luego de la purificación y se buscó conocer el aporte de los puentes disulfuro en la oligomerización de las de estas. En este sentido, se estudiaron las proteínas y el Mock en presencia o ausencia del agente reductor DTT.

En la figura 4.4 se muestran las proteínas luego de la purificación y diálisis en una SDS-PAGE. Se observó que las proteínas se encuentran en alto grado de pureza ya que las bandas que se observan se corresponden con el tamaño esperado para el monómero (25 kDa), dímero (50 kDa), y oligómeros de alto molecular. En los carriles 1 y 2 se puede observar el Mock en donde no se observan bandas en ninguna de las dos condiciones ensayadas.

Se puede observar que pese a las condiciones reductoras del buffer de carga con DTT y el tratamiento con calor, las formas de agregados de alto peso molecular y el dímero persistieron tanto en c-TXNPx como en c-TXNPxC52S.

Sin embargo, la forma que prevalece es el monómero (25 kDa) (carriles 4 y 6, respectivamente). Con respecto a las proteínas ensayadas sin DTT se observaron las mismas bandas que en los carriles de las proteínas tratadas con DTT. Sin embargo, no hay una forma predominante dado que la banda que se corresponde con el monómero persistió en menor proporción que en presencia de DTT (carril 3 para c-TXNPx y 5 para c-TXNPxC52S).

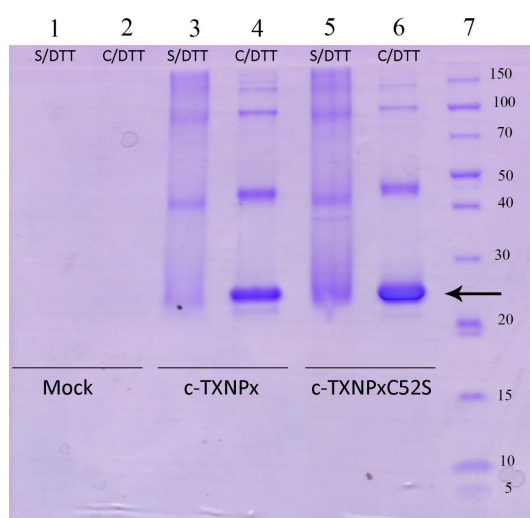


Figura 4.4: Análisis de la pureza y de la participación de puentes disulfuro de las proteínas recombinantes purificadas. SDS-PAGE al 12 %. Tinción con solución de coomasie. Mock (carriles 1 y 4), c-TXNPx (carriles 2 y 5) y c-TXNPxC52S (carriles 3 y 6).

Estos resultados sugieren que los puentes disulfuro no son las únicas interacciones responsables de la formación de oligómeros, ya que en presencia de un agente reductor como DTT aún persisten oligómeros de mayor peso que el monómero.

4.1.3. Remoción de endotoxinas

Dado que el objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune generada por parte de c-TXNPx, resultó de gran importancia obtener las proteínas libres de endotoxinas. Las endotoxinas bacterianas son potentes activadores del sistema inmune innato ya que pueden interactuar con el TLR-4 y el CD14, e inducir la activación de NF- κ B y de este modo desencadenar la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β (Biswas y Lopez-Collazo 2009).

En este trabajo se utilizaron dos métodos de remoción de endotoxinas: columnas de afinidad acoplados a polimixina B y Tritón X-114. El primero de estos métodos es ampliamente utilizado y ha sido reportado en la bibliografía [Vesentini et al. \(2010\)](#). El fundamento de esta técnica se basa en la interacción entre las cargas positivas del antibiótico polimixina B y las negativas del lípido A presente en el LPS [Vesentini et al. \(2010\)](#).

El segundo de estos métodos, fue descrito por Aida y colaboradores y se basa en la formación de micelas por parte del detergente Tritón X-114. A grandes rasgos este método se basa en la adición del detergente a la muestra en el que se desea remover las endotoxinas y se realizan choques de temperatura para favorecer la formación de micelas con las moléculas de LPS en su interior. La porción hidrofílica de la molécula de Tritón X-114 permanece hacia el solvente y las porciones hidrofóbicas quedan hacia el interior de la micela, interactuando con las moléculas de LPS, o lípido IVA en el caso de las muestras que provienen de bacterias *Cleaver coli* [Aida & Pabst \(1990\)](#).

Luego de realizar los métodos de remoción de endotoxinas, se realizó un ensayo de detección de endotoxinas bacterianas en las preparaciones proteicas. El ensayo utilizado se denomina Limulus amebocyte lysate (LAL) y se basa en un lisado de amebocitos de Limulus, que es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). En presencia de endotoxinas, ciertos factores presentes en el lisado de amebocitos se activan en una cascada proteolítica que produce la escisión de un sustrato peptídico artificial incoloro presente en el kit. La escisión proteolítica del sustrato libera para-nitroanilina (pNA), que es amarilla y absorbe a 405 nm.

Los resultados de este ensayo mostraron la concentración de endotoxinas en las proteínas y en el Mock (Tabla 4.1). Esta se expresa como unidades de endotoxinas por mililitro (UE/mL). Se detectaron 1275,13 UE/mL para c-TXNPx; 18,51 UE/mL para c-TXNPxC52S y 2,63 UE/mL para el Mock cuando el método de remoción fue columnas de polimixina B. Cuando el método de remoción fue Tritón X-114, se detectó mayor concentración de endotoxinas en las tres muestras analizadas. En c-TXNPx se detectaron 712,33 UE/mL, en c-TXNPxC52S 7879 UE/mL y 2790 para el Mock. En base a este resultado y a la concentración de las proteínas analizadas, se calculó el número de endotoxinas presentes en 20 μ g de proteína que es el mayor volumen que se inyectó en ratones. Se observó que c-TXNPx es la única muestra con presencia de endotoxinas en la dosis recibida por los ratones, según los resultados del

ensayo de LAL, quienes recibieron alrededor de 12 unidades de endotoxinas. Sin embargo, este valor se encuentra por debajo del valor permitido por dosis en ratones reportado por Malyala, en el que se reportan 15 unidades de endotoxinas como la dosis máxima de endotoxinas por inoculación por hora [Malyala & Singh \(2008\)](#).

Estos resultados muestran que las columnas de polimixina B fueron más eficientes en la remoción de endotoxinas que el método descrito por Aida con Tritón X-114 y a pesar de que la remoción no fue completamente efectiva el número de endotoxinas presentes en c-TXNPx se encuentra dentro del rango permitido. Aunque no está descrito que esta enzima sea capaz de unir LPS, este y otros ensayos realizados en el laboratorio aportan evidencia de que permiten hipotetizar que esta interacción es posible. También se ha observado que existieron diferencias entre la proteína salvaje y mutante y esto ya fue observado por la Dra. Chiribao en otras instancias de remoción de endotoxinas.

Tabla 4.1: Concentración de endotoxinas en las proteínas y en el Mock, luego de los métodos de remoción de endotoxinas.

Muestra	Concentración de endotoxinas (UE/mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	UE/mg	Número de endotoxinas presentes en 20 μ g de proteína
c-TXNPx P	1275,13	2	637,56	12,75
c-TXNPxC52S P	18,51	1,1	16,82	0,33
Mock P	2,63	2	1,31	0,02
c-TXNPx T	712,33	2,24	318,00	6,36
c-TXNPxC52S T	7879,54	4,38	1798,98	35,97
Mock T	4602,05	2,24	2054,48	41,08

De forma complementaria, también exploramos, de forma cualitativa, la eficiencia en la remoción de endotoxinas a través de la capacidad de activación de macrófagos por parte de las proteínas, luego de la remoción de endotoxinas. A su vez, se utilizó como control la proteína c-TXNPx expresada en *Escherichia coli* y *C. coli* sin posterior remoción de endotoxinas. Se seleccionó la proteína expresada en *E. coli* como control positivo de la presencia de endotoxinas, dado que esta cepa bacteriana contiene la molécula de LPS intacta la cual permanece luego de la purificación de proteínas expresadas en esta cepa. En el estudio se incubaron las proteínas con macrófagos murinos provenientes de la línea celular

RAW 264.7, y se cuantificaron citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) y anti-inflamatoria (IL-10) mediante ELISA. Las proteínas analizadas fueron c-TXNPx expresada en *E. coli* y *C. coli* sin remoción de endotoxinas; c-TXNPx expresada en *C. coli* con posterior remoción de endotoxinas con columnas de polimixina B y con Tritón X-114.

En la figura 4.5, se observa una disminución en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias asociado a un aumento en los niveles de IL-10, en las proteínas tratadas con columna de polimixina B y Triton X-114 con respecto a la proteína expresada en *E. coli* o *C. coli* sin posterior remoción de endotoxinas (figura 4.5 A, B C), indicando que las proteínas tratadas con los dos métodos utilizados para remover endotoxinas no indujeron niveles significativos de citoquinas proinflamatorias.

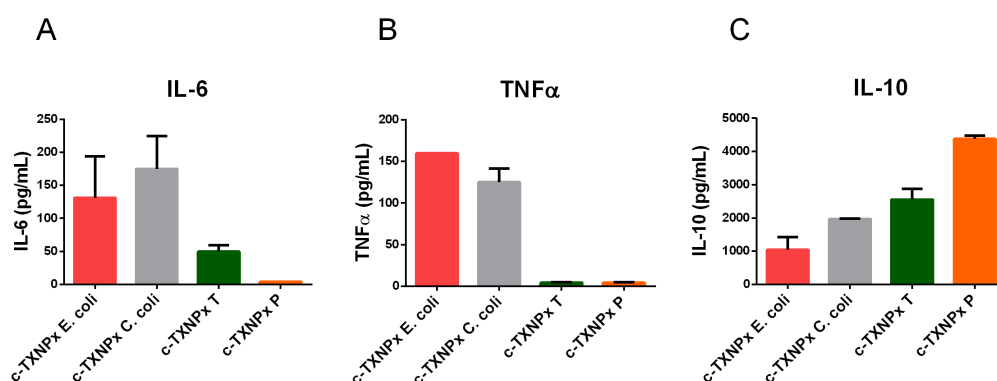


Figura 4.5: Niveles de citoquinas en sobrenadante de cultivo de macrófagos RAW 264.7 incubadas con la proteína c-TXNPx purificada de *E. coli* y de *Clear coli*TM. Se analizó además, la proteína purificada de *C. coli* luego de pasajes de remoción de endotoxinas con Tritón X-114 (c-TXNPx T) y polimixina B (c-TXNPx P). Los niveles de citoquinas se cuantificaron mediante ELISA. A) Niveles de IL-6. B) Niveles de TNF- α . C) Niveles de IL-10.

Los resultados de LAL mostraron que la columna de polimixina B fue más efectiva en la remoción de endotoxinas que las proteínas tratadas con Tritón X-114. A su vez, el análisis cualitativo en macrófagos mostró que la producción de citoquinas pro-inflamatorias se redujo de forma significativa en el cultivo con proteínas luego de la remoción de endotoxinas, y esto fue acompañado de un aumento en la producción de IL-10.

En base a este ensayo se continuó con las columnas de polimixina B como método de remoción de endotoxinas.

4.1.4. Caracterización Bioquímica

Estado oligomérico de las proteínas salvaje y mutante

Datos previos obtenidos de la bibliografía mostraron que varios miembros de la familia de las peroxirredoxinas muestran cambios en su estado oligomérico los cuales han sido correlacionados con cambios en su función; en donde, la sobreoxidación de las proteínas genera especies de alto peso y esto se correlaciona con un cambio de actividad desde la actividad peroxidasa, a la actividad chaperona [Barranco-Medina et al. \(2009\)](#). Estudios acerca de la sensibilidad a la sobreoxidación de estas enzimas muestran que este proceso podría ser atribuido a la presencia de motivos particulares en la estructura primaria de las proteínas, tales como motivos “GGLG” y “YF” (Revisado en [Barranco-Medina et al. \(2009\)](#)).

En este sentido, resultó de gran interés poder conocer el estado oligomérico de la proteína salvaje y mutante luego de la expresión en el sistema heterólogo y previo a los ensayos inmunológicos. Asimismo, como ha sido reportado que los cambios conformacionales pueden deberse a la sobreoxidación de la cisteína peroxidática [Yuan et al. \(2010\)](#), se evaluó en este trabajo la sobreoxidación de la cisteína peroxidática de c-TXNPx.

Cabe recordar que c-TXNPxC52S no tiene la cisteína peroxidática, por lo que esta proteína no es objeto de la sobreoxidación del mismo; no obstante, la exposición a altas concentraciones de peróxido podrían afectar el estado de oxidación de otros residuos de cisteína presentes en la proteína. Estos, sin embargo, no son objeto de estudio en este trabajo.

Se utilizó un anticuerpo que reconoce la cisteína peroxidática hiperoxidada a ácido sulfinico para evaluar la sobreoxidación de la molécula (α -SOOH), por lo que en c-TXNPxC52S no está presente el epítipo que reconoce dicho anticuerpo. La cisteína peroxidática es la más reactiva frente al peróxido de hidrógeno; sin embargo, existen otros residuos de cisteínas en la molécula que pueden estar siendo blancos de sobreoxidación y ser los responsables de la formación de oligómeros de alto peso molecular.

Con el fin de profundizar en la caracterización del estado oligomérico de ambas proteínas salvaje y mutante, en condiciones nativas se realizaron cromatografías de exclusión molecular en columnas Superdex 200 10/300. Se utilizó una calibración previa obtenida con esta columna en la que se utilizó: Dextran azul (7,89 mL), Tiroglobulina (669 kDa: 9,3 mL), Ferritina (440 kDa:

10,6 mL), Aldolasa (158 kDa: 12,6 mL), Conalbúmina (75 kDa: 14,17 mL) y Ovoalbúmina (43 kDa: 15,3 mL). A partir de esta se construyó una curva de calibración y se interpolaron los valores obtenidos para las proteínas estudiadas para el cálculo del peso molecular. Este ensayo se realizó en tres instancias independientes en los que se observó que c-TXNPx (figura 4.6 A) y c-TXNPxC52S (figura 4.6 B), presentan dos formas predominantes.

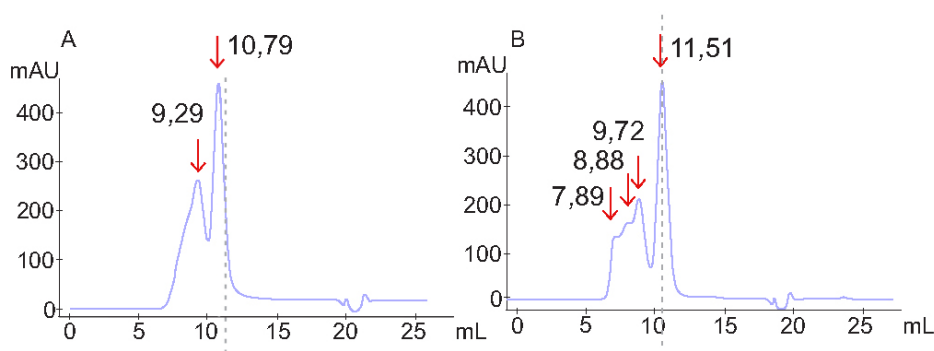


Figura 4.6: Cromatograma obtenido en el ensayo de las proteínas mediante cromatografía de exclusión molecular luego de la purificación. A) c-TXNPx. B) c-TXNPxC52S La cromatografía se realizó en un ÄKTA purifier con una columna Superdex 200 10/300, equilibrada con buffer Hepes 50 mM NaCl 100 mM a pH 7,4. Con la línea punteada se señala el peso teórico del decámero.

Estas dos formas predominantes eluyeron en dos picos cuyos volúmenes de elución se detallan en la Tabla 4.2. Como se puede observar las proporciones de ambas formas predominantes se encuentran en el entorno del 50 % tanto para el caso de c-TXNPx como c-TXNPxC52S. En este último caso la integración de los tres picos que no separan debido al rango de la columna, suman el 47 %.

Para el caso de la proteína salvaje, esta presentó dos picos cuyos volúmenes fueron 9,29 y 10,79 mL lo que se corresponde con oligómeros de alto peso molecular y con un oligómero de mayor peso que el decámero que se puede corresponder con una estructura de 14 monómeros según el peso de este último.

En el caso de c-TXNPxC52S el primer pico (correspondiente con oligómeros de alto peso molecular) eluye como un pico ancho con tres hombros, esto se puede deber a la resolución de la columna para los cuales deberíamos utilizar otra columna que permita definir mejor partículas de mayor tamaño. A su vez, se observa un segundo pico, el que según la calibración de la columna presentó un peso molecular de alrededor de 250 kDa. Este pico se corresponde

con una estructura decamérica (Ver Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Análisis de la cromatografía de exclusión molecular de c-TXNPx y c-TXNPxC52S. Se presentan los volúmenes de elución en mililitros (mL) $\pm$ SD, la proporción de que representa cada uno de los picos, el peso molecular al que se corresponden según la calibración y el número de monómeros presentes en cada fracción.

Muestra	Vol del pico (mL) $\pm$ SD	Proporción (%)	Peso Molecular (KDa)	Número de monómeros
c-TXNPx	9,29 $\pm$ 0,21	49,01	694,31	HMW
	10,79 $\pm$ 0,32	50,98	350,5	>Decámero
c-TXNPxC52S	7,89 $\pm$ 0,25	7,57	1312,25	HMW
	8,88 $\pm$ 0,20	15,81	837,43	HMW
	9,72 $\pm$ 0,30	23,66	571,99	HMW
	11,51 $\pm$ 0,06	52,96	251,95	Decámero

Estos resultados muestran que c-TXNPx se presenta como una mezcla de dos especies, ambas con mayor peso molecular que el decámero, luego de la purificación; y que c-TXNPxC52S también se presenta como una mezcla de especies, sin embargo, las especies son oligómeros de alto peso molecular y decámeros.

Resultados previos obtenidos en el laboratorio mostraron que cuando c-TXNPx se encontraba en estado oxidado (previamente tratada con H₂O₂ en una proporción 1:1), presentaba cambios en su estados de oligomerización con respecto al estado reducido. En estos ensayos Piñeyro observó un aumento de peso de la especie que en estado reducido eluía como decámero [Piñeyro et al. \(2005\)](#). La discusión de estos resultados se profundiza en la sección discusión.

Los resultados observados en este trabajo junto con estudios realizados previamente en el grupo sugieren que c-TXNPx se presenta en un estado oxidado luego de la purificación.

Estado de oxidación de la c-TXNPx

Tal como fue revisado por Barranco-Medina y colaboradores, varios miembros de la familia de las peroxirredoxinas son capaces de sufrir sobreoxidación en su cisteína peroxidática a ácido sulfínico, el cual ha sido reportado como el mecanismo responsable del cambio en la actividad enzimática, desde la actividad peroxidasa a la actividad chaperona [Barranco-Medina et al. \(2009\)](#). Ha

sido reportado que la sobreoxidación genera la agregación de la proteína y esto está asociado al cambio de actividad [Bolduc et al. \(2018\)](#).

En este sentido, resultó de gran interés evaluar en qué estado se encontraba la proteína luego de la purificación y de los pasos de remoción de endotoxinas, estudiando la proporción de cisteína peroxidática en estado ácido sulfínico. Este análisis se realizó mediante western blot utilizando un anticuerpo α -SOOH, que reconoce este grupo funcional en la cisteína peroxidática de la proteína salvaje. Dicho abordaje no se realizó con la proteína mutante debido a que el epítipo que reconoce el anticuerpo está ausente en dicha proteína, ya que no posee la cisteína peroxidática. Para este análisis nuevamente se utilizaron proteínas ensayadas en presencia o ausencia de DTT en el buffer de carga.

Este estudio permitió determinar que sólo una pequeña porción de la proteína purificada se encuentra con su cisteína 52 en estado sobreoxidado, luego de la remoción de endotoxinas, tanto con Tritón X-114 como con columnas de PolimixinaB (carriles 3-6 de figura [4.7 A](#)). Para este ensayo se utilizó como control positivo la proteína c-TXNPx tratada con 10 mM H_2O_2 y 10 mM DTT durante 30 minutos (carriles 1 y 2 de figura [4.7 A](#)), en donde se observa que la dicha cisteína es capaz de sobreoxidarse a ácido sulfínico. A su vez, la misma membrana con un anticuerpo α -c-TXNPx lo que permitió mostrar que la proteína se encontraba en alto grado de pureza (figura [4.7 B](#)). Además, este ensayo permitió confirmar que las bandas de mayor peso molecular que el monómero (25 kDa) son agregados de la enzima y que persisten aún en presencia de DTT.

Estos resultados mostraron que esta proteína se sobreoxida en su cisteína peroxidática cuando es incubada con H_2O_2 y DTT tal como se observa en los carriles 1 y 2 del figura [4.7 A](#). A su vez, cuando se estudia la proteína en ausencia de DTT en el buffer de carga, la porción que está sobreoxidada se encuentra en oligómeros de alto peso molecular, pese a que el inmunoensayo con α -TXNPx muestre la presencia de monómeros y dímeros en ese carril. Sin embargo, cuando se estudia la proteína en presencia de DTT en el buffer de carga se encuentran monómeros y dímeros sobreoxidados.

Se observó que una pequeña porción de la proteína c-TXNPx luego de la remoción de endotoxinas se encuentra sobreoxidada y que en ausencia de DTT la cisteína sobreoxidada se encuentra en oligómeros de alto peso molecular. Al igual que para la proteína sobreoxidada *in vitro*, con el anticuerpo α -c-TXNPx se evidenció la presencia de estructuras de menor peso como el dímero y monómero (carril 3 y 5 de la figura [4.7 B](#)). Cuando se estudia la proteína junto

a DTT en el buffer de carga aparecen estructuras de menor peso molecular sobreoxidadas, lo que evidencia el rol de los puentes disulfuro en la formación de oligómeros de alto peso en la proteína sobreoxidada (carril 6 de la figura 4.7 A).

Este resultado evidencia que una vez que se sobreoxida la enzima se forman oligómeros de alto peso molecular y que cuando se estudia la proteína en presencia de DTT en el buffer de carga (un agente reductor de los puentes disulfuro), la proteína se desensambla y aparecen dímeros y monómeros. Esta evidencia muestra que los puentes disulfuro no son los únicos responsables de la formación de oligómeros ya que en presencia de DTT aún persisten formas de mayor peso que el monómero.

Es de destacar que sólo una pequeña porción de la proteína se encuentra sobreoxidada luego de la remoción de endotoxinas y este es el estado en el que se encontraba la proteína previo a los ensayos inmunológicos.

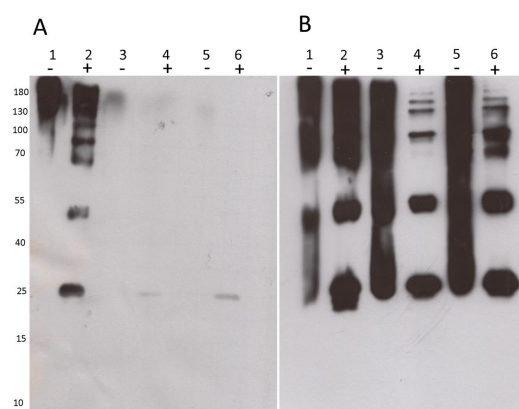


Figura 4.7: Estado de sobreoxidación de la cisteína 52 en c-TXNPx purificada y tratada para remoción de endotoxinas mediante ensayo de Western Blot. Se analizaron 4 μ g de proteínas en geles desnaturalizantes al 12 % y fueron transferidas a membranas de PVDF en ausencia (-) o presencia de DTT (+). El inmunoensayo se realizó con: A) un anticuerpo α -SOOH y B) un anticuerpo α -c-TXNPx Carril 1 y 2- cTXNPx sobre-oxidada, carril 3 y 4 c-TXNPx luego de la remoción de endotixinas con Polimixina B, carril 5 y 6 4 c-TXNPx luego de la remoción de endotixinas con Tritón X-114.

Estudio de la actividad enzimática

La última etapa de la caracterización bioquímica fue determinar si c-TXNPx presentaba actividad peroxidasa y si los métodos de remoción de endotoxinas alteraban dicha actividad enzimática.

c-TXNPx es capaz de detoxificar peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos y peroxinitrito [Piñeyro et al. \(2011\)](#). Luego de la reducción de los sustratos, la enzima es reciclada por la triparredoxina I para comenzar un nuevo ciclo catalítico. La triparredoxina I actúa a expensas de la oxidación del tripanotión, un ditiol de bajo peso molecular ausente en mamíferos. Este es reciclado a su estado reducido a expensas de la tripanotión reductasa, quien obtiene su poder reductor a expensas del NADPH. En el laboratorio contamos con estas enzimas purificadas y con tripanotión, de modo que se puede recrear el sistema de detoxificación de hidroperóxidos que usa el parásito y evaluar la capacidad de c-TXNPx de reducir peróxido de hidrógeno. A este ensayo se le denomina ensayo acoplado de actividad enzimática.

Para este ensayo se utilizaron las enzimas recombinantes triparredoxina I ($5\ \mu\text{M}$), tripanotión reductasa ($2\ \mu\text{M}$) y triparredoxina peroxidasa citosólica ($5\ \mu\text{M}$), previo y luego de los métodos de remoción de endotoxinas. A su vez, se utilizó tripanotión ($50\ \mu\text{M}$), NADPH ($300\ \mu\text{M}$) y H_2O_2 (50 , 75 , 100 y $200\ \mu\text{M}$). Se midió la caída de absorbancia a $340\ \text{nm}$, luego de la adición de peróxido a una premezcla realizada con todos los componentes del sistema: la triparredoxina peroxidasa citosólica, la triparredoxina I, la tripanotión reductasa y el tripanotión.

En estos ensayos se observó que c-TXNPx presenta actividad peroxidasa y no así la mutante (figura 4.8). Se pudo observar que la actividad no se vio afectada por los métodos de remoción de endotoxinas, ya que no se observaron diferencias en la velocidad inicial de las proteínas (figura 4.8).

Se realizó un análisis para evaluar el impacto de la remoción de endotoxinas en la actividad peroxidasa de c-TXNPx. Para ello, con los datos obtenidos, se calculó la actividad enzimática y la actividad específica para la concentración $100\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 , lo que permitió comparar entre la proteína previo a la remoción y luego de la remoción de endotoxinas. La elección de esta concentración se basa en que es una concentración de sustrato sub-inhibitoria; a su vez, esta es la concentración en la que se observó una menor dispersión de los resultados obtenidos de velocidad inicial.

En la figura 4.9 se puede observar que no existen diferencias entre los valores obtenidos de actividad enzimática (U) y actividad específica (U_{esp}) para la proteína salvaje luego de la remoción de endotoxinas con respecto a la proteína sin tratamientos de remoción. En esta figura también se puede notar que c-TXNPxC52S no presentó actividad peroxidasa.

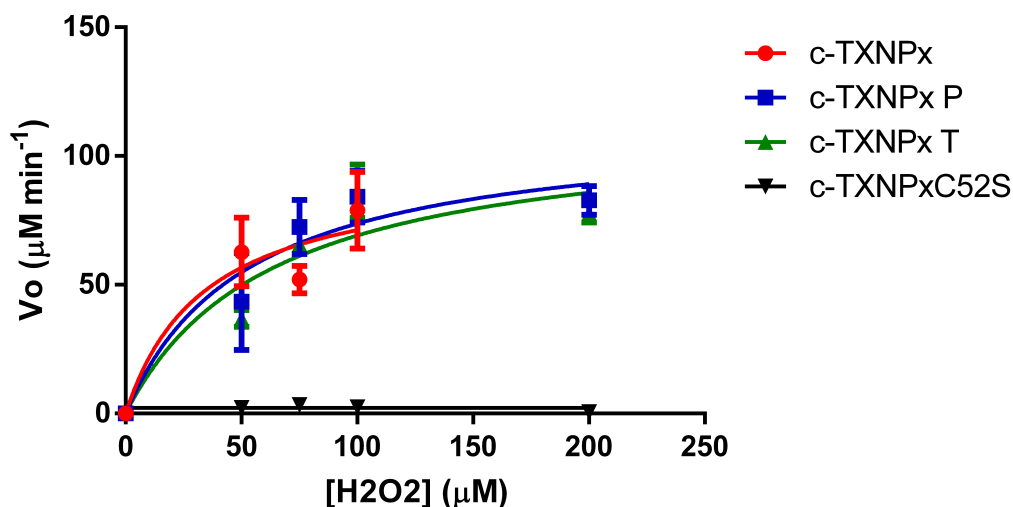


Figura 4.8: Análisis de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes mediante un ensayo acoplado. Se midió la desaparición del NADPH mediante absorbancia a λ 340 nm, con los siguientes componentes: tripanotión (50 μ M), NADPH (300 μ M) y H₂O₂ (50, 75, 100 y 200 μ M) triparredoxina I (5 μ M), tripanotión reductasa (2 μ M) y triparredoxina peroxidasa citosólica (5 μ M) a pH 7,6 y a 37°C. Se ensayó la proteína expresada en bacterias *Cleaver coli* (c-TXNPx), luego de la remoción de endotoxinas con columnas de Polimixina B (c-TXNPx P), luego de la remoción de endotoxinas con Tritón X-114 (c-TXNPx T) y la mutante c-TXNPxC52S.

Pese a haber presentado los datos de velocidad inicial en un ajuste michaeliano, este análisis no es el más adecuado a la hora de analizar la cinética de esta enzima. El ajuste más apropiado para las peroxirredoxinas sería un análisis de Dalziel. Para realizar un análisis de este tipo es necesario tener los datos de cómo varía la velocidad en función de concentraciones variables de la triparredoxina I, el otro sustrato de c-TXNPx. Estos datos no fueron realizados en este trabajo, habían sido realizados en el laboratorio por la Dra. Piñeyro y reportados en la bibliografía, sin embargo, fueron realizados con la triparredoxina I de *Trypanosoma brucei* y en este trabajo se utilizó la enzima de *T. cruzi*.

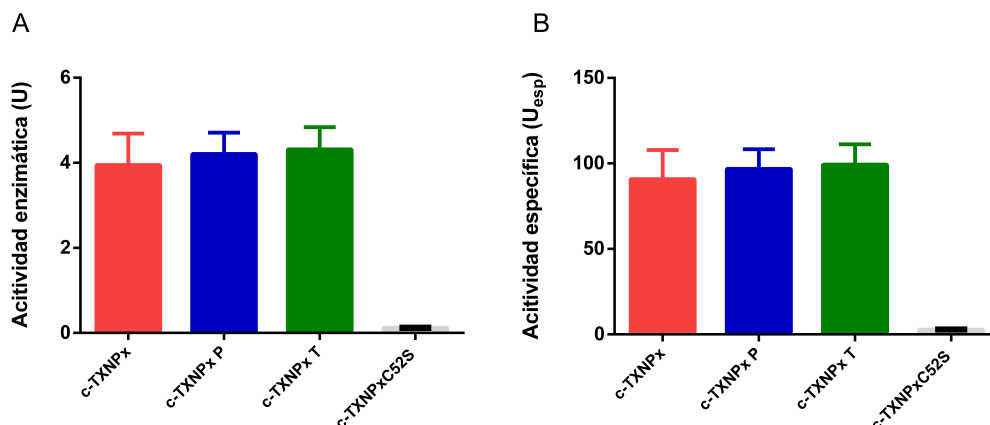


Figura 4.9: Análisis de la actividad peroxidasa de la c-TXNPx luego del tratamiento para remoción de endotoxinas. A), Actividad enzimática (U) y (B) actividad específica (U_{esp}). Se ensayó la proteína expresada en bacterias *Cleare coli*(c-TXNPx), luego de la remoción de endotoxinas con columnas de Polimixina B) (c-TXNPx P), luego de la remoción de endotoxinas con Tritón X-114 (c-TXNPx T) y la mutante c-TXNPxC52S. Se realizó el ensayo acoplado, midiendo la caída del NADPH a 340 nm con los siguientes componentes: tripanotión (50 μ M), NADPH (300 μ M) y H₂O₂ (50, 75, 100 y 200 μ M) triparredoxina I (5 μ M), tripanotión reductasa (2 μ M) y triparredoxina peroxidasa citosólica (5 μ M) a pH 7,6 y a 37°C.

En resumen, en este capítulo se presentaron los resultados de la caracterización bioquímica de ambas proteínas previo a los ensayos inmunológicos. Se pudo determinar que ambas proteínas se expresaron de forma nativa y que ambas presentaron estructuras oligoméricas. Estos se corresponden a dímeros, decámeros y agregados de alto peso molecular, según mostraron los ensayos en SDS-PAGE. En este sentido, la cromatografía de exclusión molecular evidenció que la proteína luego de la purificación se presenta principalmente como dos especies compuestas de oligómeros de mayor peso molecular que el decámero y agregados de alto molecular, pudiéndose notar diferencias entre c-TXNPx y c-TXNPxC52S. En esta última, pese a que también se presentó como una mezcla compleja de estructuras oligoméricas, estaban compuestas por oligómeros de alto peso molecular y decámero.

A su vez, se demostró que c-TXNPx purificada de bacterias *Cleare coli* presenta actividad peroxidasa y que c-TXNPxC52S que no posee la cisteína reactiva, no tiene esa actividad. De forma complementaria, se demostró que los métodos de remoción de endotoxinas no afectaron la actividad peroxidasa en la proteína salvaje.

Además se cuantificaron los niveles de endotoxinas en las muestras y se realizaron ensayos cualitativos de la eficiencia en la remoción de las mismas de las proteínas. Mediante este ensayo se pudo determinar que los métodos de remoción de endotoxinas fueron efectivos y se escogió las columnas acopladas a Polimixina B para continuar con la preparación de las proteínas previo a los ensayos inmunológicos.

4.2. Caracterización de propiedades inmuno-moduladoras de las proteínas sobre células innatas APC

A continuación se presentan los principales resultados obtenidos sobre la respuesta generada por parte de c-TXNPx y c-TXNPxC52S sobre células del sistema inmune innato tanto *in vitro* como *in vivo*. En este sentido se presentan resultados sobre la expresión de marcadores de superficie, de moléculas co-estimuladoras y de producción de citoquinas.

En una primera instancia se evaluó la respuesta generada sobre células obtenidas de bazos murinos, enriquecidas en células CD11c⁺, por parte de las proteínas c-TXNPx, c-TXNPxC52S y el control Mock. Esta respuesta se evaluó mediante el análisis por citometría de flujo de moléculas de superficie y mediante la cuantificación por ELISA de citoquinas en el sobrenadante de cultivos.

A continuación, se evaluó la respuesta generada por las proteínas antes mencionadas en un modelo *in vivo*. En este estudio se analizó el fenotipo generado sobre células del sistema inmune innato, en particular sobre células presentadoras de antígenos (APCs), por la inoculación de las proteínas o el Mock. Nuevamente, el efecto de las proteínas fue evidenciado mediante citometría de flujo.

4.2.1. Efecto modulador de la c-TXNPx en células dendríticas en ensayos *in vitro*

En este ensayo se buscó caracterizar, mediante citometría de flujo, la expresión de marcadores de superficie y así conocer el fenotipo generado por la estimulación *in vitro* de células CD11c⁺ de células esplénicas (enriquecidas en CD11c⁺), provenientes de ratones naïve: con c-TXNPx, c-TXNPxC52S, Mock y medio completo. Para ello, se obtuvieron bazos de ratones BALB/c naïve y a partir de estos se realizó un enriquecimiento de células CD11c⁺. Sobre las células obtenidas se incubaron las proteínas c-TXNPx, c-TXNPxC52S y el control Mock en las concentraciones 0; 1,2; 6 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al día siguiente se colectó el sobrenadante de cultivo y las células se marcaron con anticuerpos para su análisis mediante citometría de flujo.

Pese a que este ensayo se realizó para varias concentraciones de proteínas se presentan sólo los obtenidos para la concentración 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, debido a que es la concentración en la que se evidenció diferencias entre los tratamientos. La estrategia de *gating* que llevó a este análisis se resume en la figura 4.10 A. En esta figura se resumen los gráficos que llevaron a la obtención de la población de interés caracterizada por expresar CD11c⁺.

En una primera instancia se observó que los marcadores de superficie variaron su expresión según el tratamiento (c-TXNPx, c-TXNPxC52S, Mock) o sin estímulo (medio de cultivo completo). Se pudo observar que las células tratadas con c-TXNPx expresaron más CD40 que frente a los demás tratamientos, sin embargo, esta diferencia solo fue estadísticamente significativa con respecto al Mock (figura 4.10 B).

A su vez, se cuantificó la expresión de MHCII en el que se observó que el tratamiento con la proteína salvaje induce una mayor expresión del mismo en la superficie de estas células, con respecto a las células sin tratar (figura 4.10 C).

Con respecto a la expresión de CD80 se evidenció una fuerte expresión de este marcador cuando las células fueron estimuladas con c-TXNPx frente a la estimulación por parte de c-TXNPxC52S y los controles Mock y sin estímulo (figura 4.10 D).

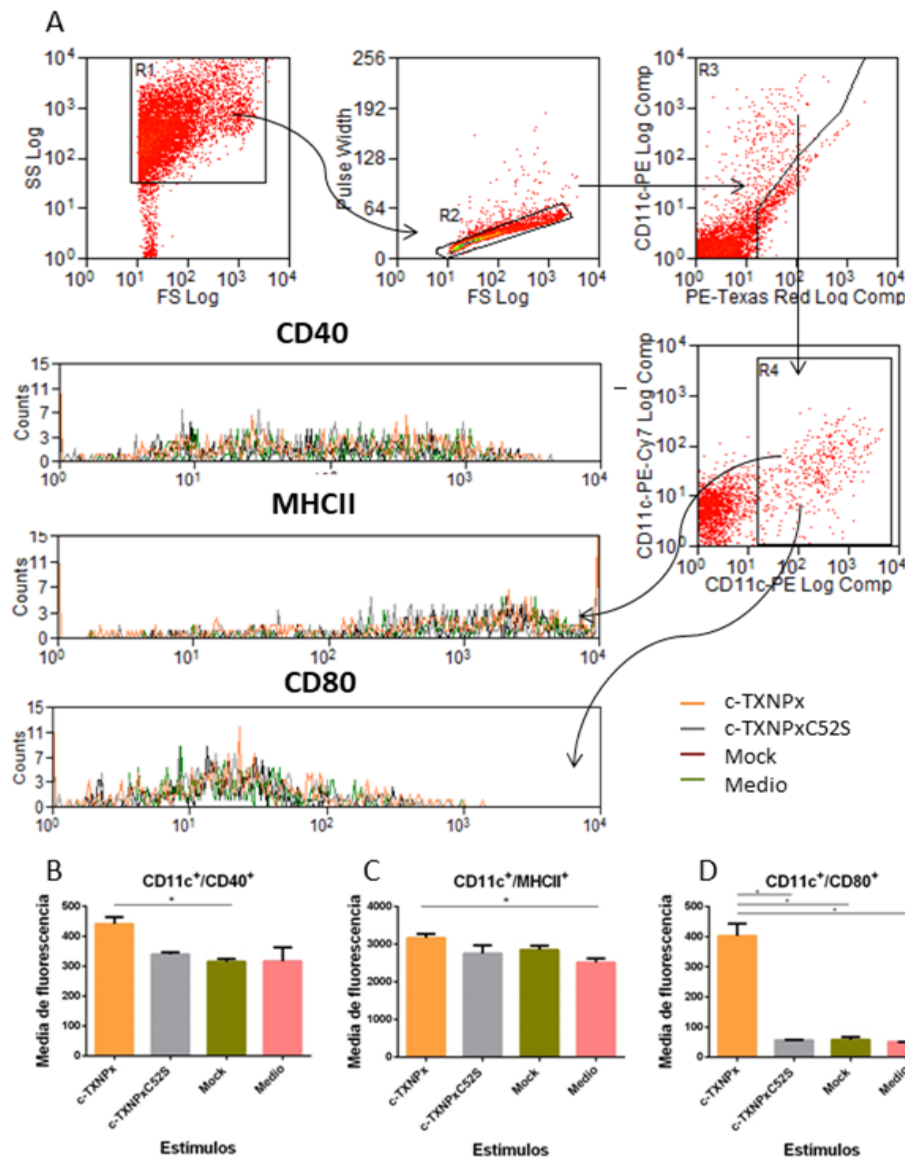


Figura 4.10: Expresión de moléculas de co-estimulación en células esplénicas enriquecidas en células CD11c⁺ tratadas con c-TXNPx, c-TXNPxC52S y Mock analizado mediante citometría de flujo. A) Estrategia de *gating* que permitieron la selección de la población de interés, CD11c⁺ B) Expresión de CD40 MHCII. B) CD40 C) CD80. Las células esplénicas se obtuvieron de bazos de ratones naïve, a partir de estos se realizó un enriquecimiento de células CD11c⁺ con un anticuerpo acoplado a beads magnéticas. A continuación, se incubaron dichas células con concentraciones crecientes (0; 1,2; 6 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de la proteína salvaje, mutante, Mock y medio a modo de control. Al día siguiente las células fueron colectadas y marcadas con anticuerpos de superficie α -CD11c, α -CD40, α -MHCII y α -CD80, mediante citometría de flujo. Se muestran los resultados obtenidos para la incubación con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína. La expresión de las moléculas de superficie se presenta como media de fluorescencia + Error estándar de triplicados biológicos. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey.

Estos ensayos se complementaron con la cuantificación de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-12) y anti-inflamatoria (IL-10), en el sobrenadante de cultivo, que muestran qué citoquinas secretan las células tratadas. Se pudo observar una mayor concentración de IL-6 e IL-12 en el sobrenadante de las células cultivadas en presencia de c-TXNPx con respecto a c-TXNPxC52S y a las células sin tratar. A su vez, se detectaron niveles de IL-10 en los sobrenadantes, sin embargo, sólo se observó una disminución de la producción de esta citoquina cuando las células fueron tratadas con c-TXNPxC52S figura 4.11.

Estos resultados evidencian que se produjeron cambios en el fenotipo que presentaron las células luego de la incubación con las proteínas. Estas expresaron más MHCII y CD40 en su superficie cuando fueron cultivadas con c-TXNPx, a su vez, la incubación con dicha proteína produjo una fuerte expresión de CD80 por parte de las células. Asimismo, estos resultados fueron acompañados con el aumento de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-12 cuando las células fueron incubadas con c-TXNPx.

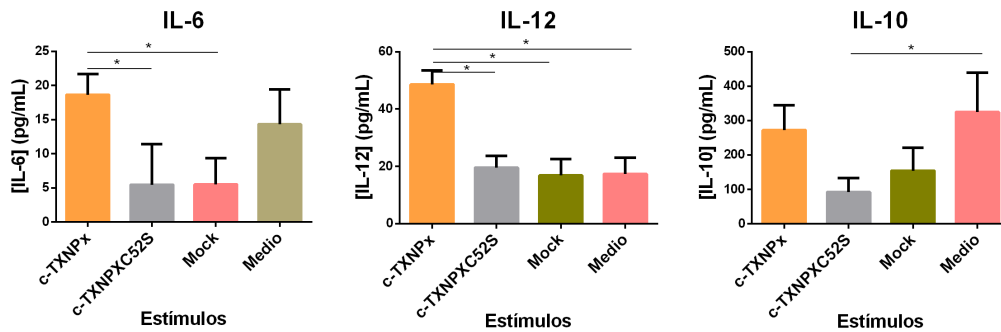


Figura 4.11: Evaluación de la respuesta generada por las proteínas sobre células esplénicas de ratones naïve. A) IL-6. B) IL-12 y C) IL-10. Se realizó la cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias mediante ELISA. Las células esplénicas se obtuvieron de bazo de ratones naïve, a partir de estos se realizó un enriquecimiento de células CD11c⁺ con un anticuerpo acoplado a *beads* magnéticas. A continuación, se incubaron dichas células con concentraciones crecientes (0; 1,2; 6 y 30 μ g/mL), de la proteína salvaje, mutante, Mock y medio a modo de control. Al día siguiente se colectó el sobrenadante de cultivos y se utilizó para la cuantificación de citoquinas mediante ELISA. Los niveles de citoquinas se expresan como media + Error estándar de triplicados biológicos. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con post hoc de Tukey.

4.2.2. Efecto inmunomodulador de la c-TXNPx en células dendríticas en ensayos *in vivo*

Fenotipo de células en la cavidad peritoneal de animales inoculados con c-TXNPx y c-TXNPxC52S

Con el fin de continuar con la caracterización de la respuesta generada frente a las proteínas, se estudió dicha respuesta luego de la inoculación de estas en ratones. Para ello se inocularon ratones BALB/c con 20 μ g de las proteínas o del mismo volumen del Mock y se obtuvieron las células de la cavidad peritoneal. En este sentido se caracterizó, mediante citometría de flujo usando marcadores de superficie, las poblaciones celulares presentes.

En una primera instancia se cuantificaron los porcentajes de células de dos poblaciones definidas como CD11c⁺ y F4/80⁺. La estrategia de *gating* que llevó a este análisis se resume en la figura 4.12 A en donde se puede apreciar los gráficos utilizados.

Se observó que las poblaciones varían según los grupos; en particular, se encontró un mayor porcentaje de células CD11c⁺ en el grupo inoculado con c-TXNPx con respecto al Mock y a c-TXNPxC52S (aunque no se observan diferencias significativas estadísticamente con respecto a este último).

Además, tanto las células provenientes de los animales inoculados con c-TXNPx como con c-TXNPxC52S presentaron mayor porcentaje de células F4/80⁺ que el control, siendo mayor el porcentaje de células F4/80⁺ obtenido con el tratamiento con la proteína mutada (figura 4.12).

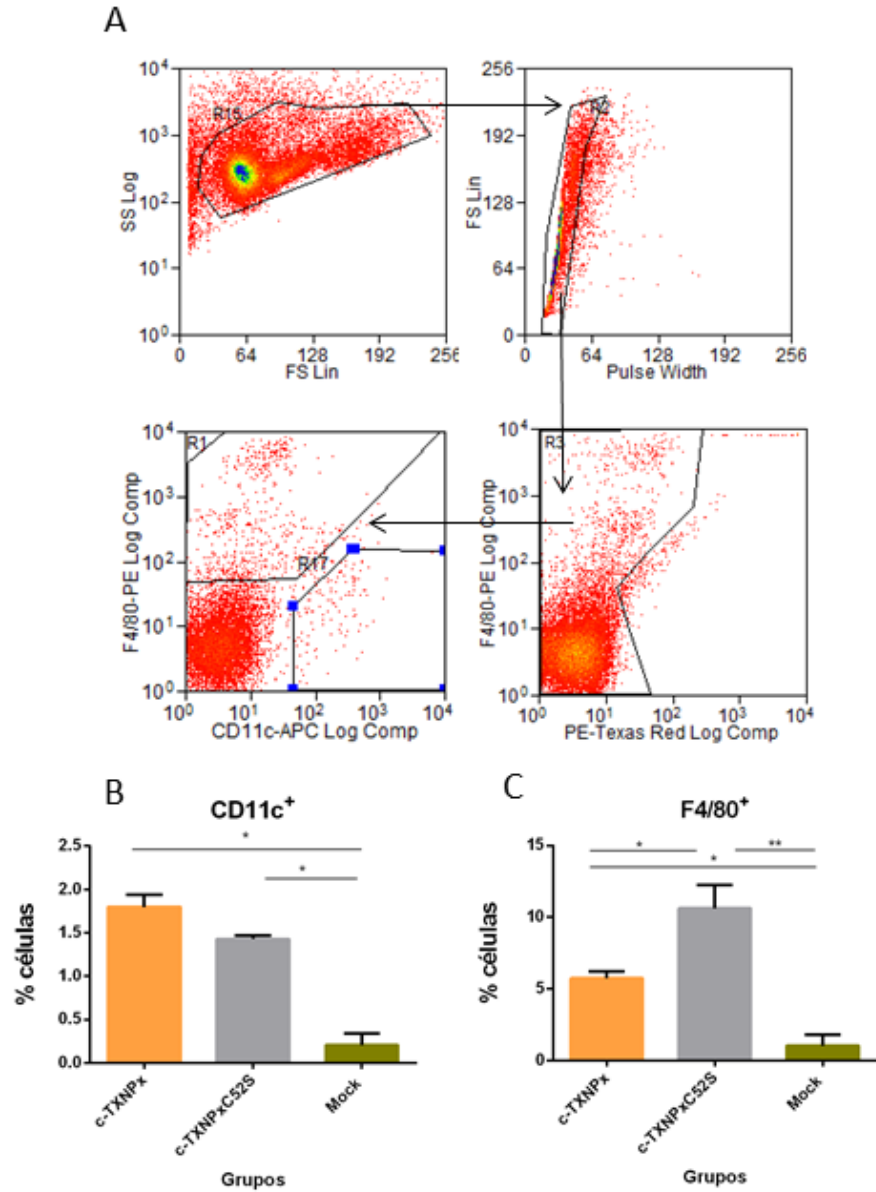


Figura 4.12: Análisis de las poblaciones presentes en cavidad peritoneal de animales inoculados. A) Resumen de los gráficos de citometría de flujo que permitieron el análisis de las poblaciones de interés. B) Células CD11c⁺. C) Células F4/80⁺. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de proteínas en PBS cada dos días. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron los animales y se obtuvieron las células presentes en la cavidad peritoneal. A continuación, se marcaron dichas células con anticuerpos específicos para moléculas de superficie. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. La expresión de las moléculas de superficie se presenta como media de fluorescencia + Error estándar de duplicados técnicos que se realizaron a partir de un pool de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey).

Análisis de las células CD11c⁺

Asimismo, se profundizó en la caracterización de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de los animales inoculados, mediante citometría de flujo. En una primera instancia se indagó en la expresión de marcadores de superficie de las células CD11c⁺ (figura 4.13). En este sentido se analizó los niveles de Ly6G, Ly6C y CD68 que definen poblaciones granulocíticas (Ly6G) o monocíticas (Ly6C, CD68). Las estrategias de *gating* utilizada para el análisis de estos marcadores se resumen en la figura 4.13 A.

Se observó una disminución de Ly6G en las células provenientes del peritoneo de ratones inoculados con c-TXNPx con respecto a los inoculados con c-TXNPxC52S (figura 4.13 B), demostrando que las proteínas inducen un fenotipo ligeramente diferente en las células CD11c⁺. En ambos casos la expresión de Ly6C y CD68 fue baja (figura 4.13 D).

Asimismo se continuó con la caracterización de las moléculas de superficie en las células CD11c⁺ presentes en la cavidad peritoneal de animales inyectados. En esta instancia se analizó la expresión de CD4 y CD8, ambos presentes en células T y en células dendríticas. El interés de determinar la expresión de estas moléculas reside en que se ha descrito que ambas poblaciones de células dendríticas tienen diferentes funciones. Las CDs CD8⁺ son capaces de cospresentar a linfocitos T CD8⁺, mientras que las CDs CD4⁺ estarían especializadas en interaccionar y activar linfocitos T colaboradores (Gil-Jaramillo). La estrategia de *gating* con la cual se analizó estos resultados se resume en la figura 4.14A.

En este sentido los resultados sugieren un aumento de CD4 en el grupo inoculado con c-TXNPx con respecto a c-TXNPxC52S y al grupo control, sin embargo esta diferencia no mostró significancia en un test de ANOVA de una vía (figura 4.14 B). Por otra parte, cuando se analizó la expresión de CD8, se observó una disminución de la expresión de dicho marcador en el grupo c-TXNPx con respecto al grupo c-TXNPxC52S y al grupo Mock (figura 4.14 C).

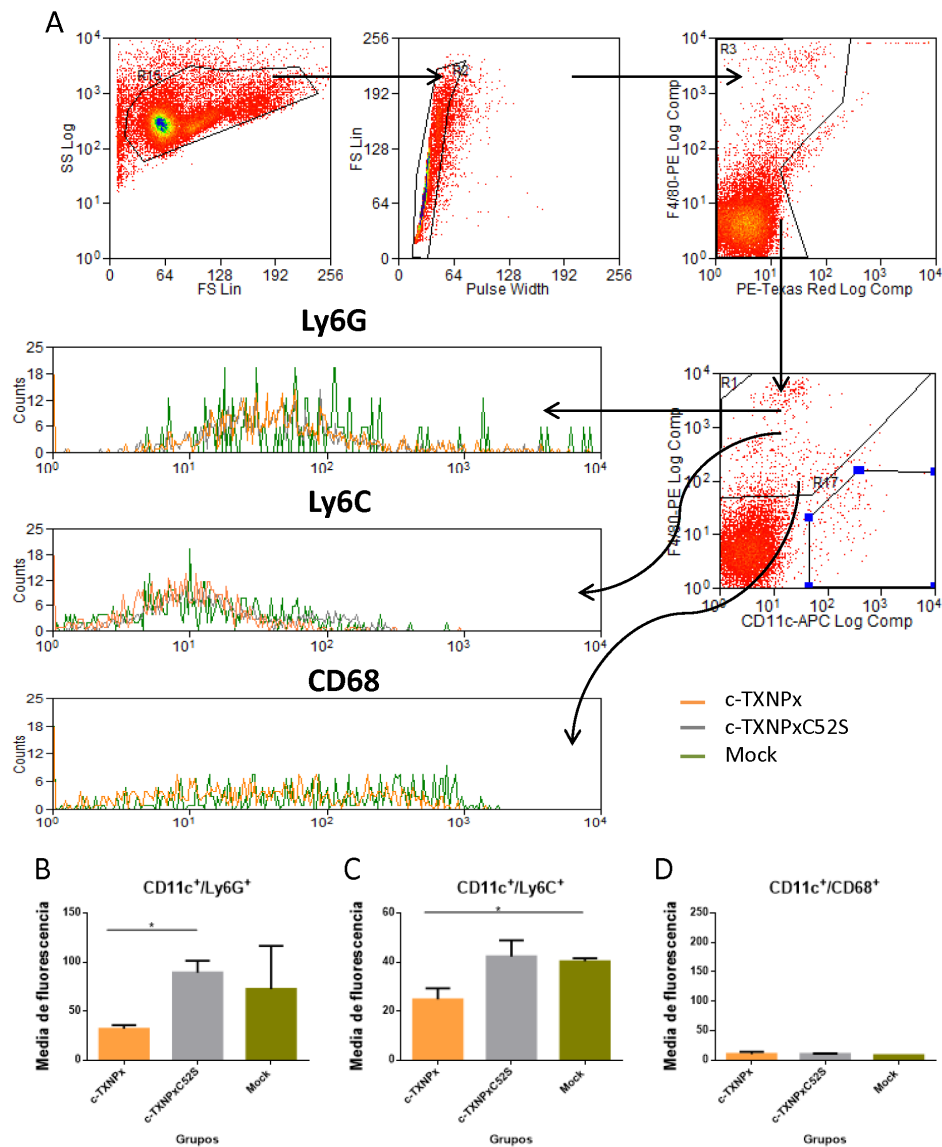


Figura 4.13: Marcadores de superficie en células CD11c⁺ en superficie, de la cavidad peritoneal de animales inoculados. A) Estrategia utilizada para el análisis de marcadores de superficie de células CD11c⁺ B) Expresión de Ly6G C) Expresión de Ly6C D) Expresión de CD68. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de proteínas en PBS cada dos días. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron los animales y se obtuvieron las células presentes en la cavidad peritoneal. A continuación, se marcaron dichas células con anticuerpos específicos para moléculas de superficie. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. La expresión de las moléculas de superficie se presenta como media de fluorescencia + Error estándar de duplicados técnicos que se realizaron a partir de un pool de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey).

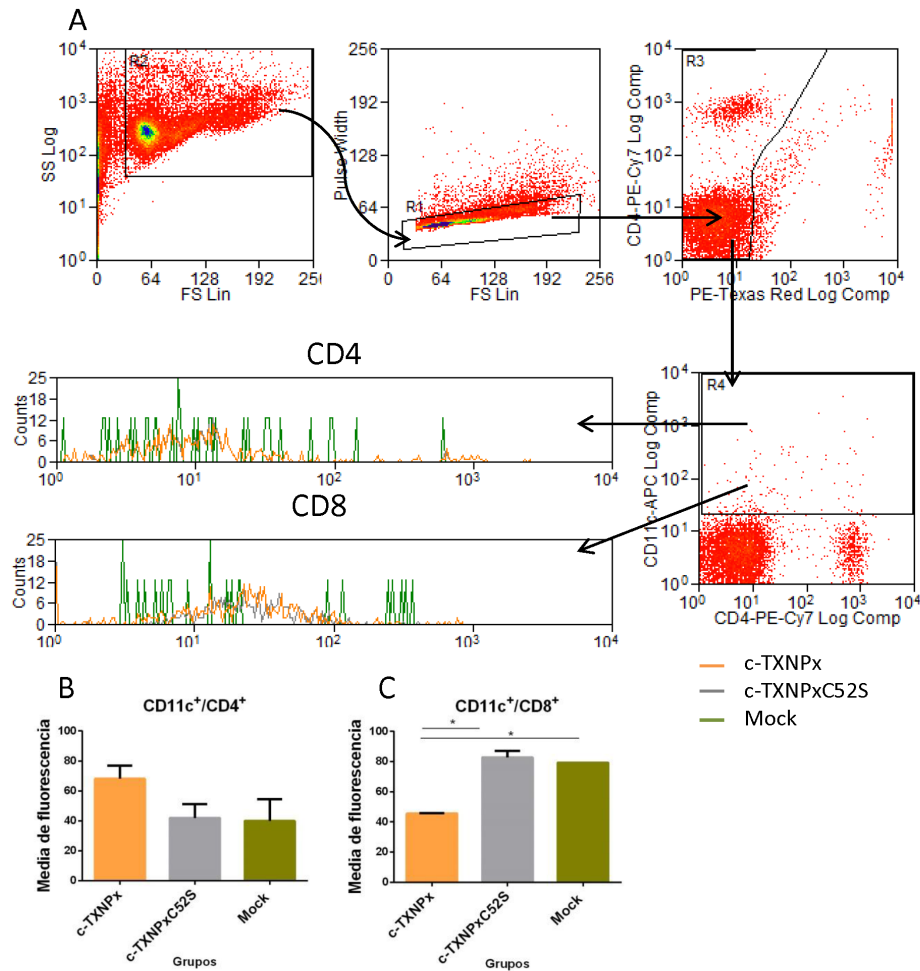


Figura 4.14: Expresión de marcadores de superficie en células CD11c⁺ de la cavidad peritoneal de ratones inoculados. A) Estrategia de *gating* que permitieron la selección de las poblaciones de interés B) Expresión de CD4 C) Expresión de CD8. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de proteínas en PBS cada dos días. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron los animales y se obtuvieron las células presentes en la cavidad peritoneal. A continuación, se marcaron dichas células con anticuerpos específicos para moléculas de superficie CD4 y CD8, en células CD11c⁺. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. La expresión de las moléculas de superficie se presenta como media de fluorescencia + Error estándar de duplicados técnicos que se realizaron a partir de un pool de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *pos hoc* de Tukey).

Además, se buscó conocer la expresión de moléculas co-estimuladoras en la población de células CD11c⁺ y si los distintos grupos presentaban diferencias. Se analizó la expresión de CD40, MHCII y CD80 (figura 4.15 A).

Tal como se puede observar en la figura 4.15 B los niveles de CD40 no mos-

traron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, se observó un aumento de MHCII para las células CD11c⁺ provenientes de ratones inoculados con c-TXNPx y c-TXNPxC52S.

Este último resultado no se correlaciona con el escenario observado en la estimulación *in vitro* de las células CD11c⁺ esplénicas, en donde se observó un fuerte aumento de la expresión de este marcador en las células estimuladas con c-TXNPx (figura 4.15).

En conclusión, los resultados obtenidos indican que tanto c-TXNPx como c-TXNPxC52S indujeron el reclutamiento de células CD11c⁺ (posiblemente células dendríticas) en la cavidad peritoneal de ratones. Sin embargo, ambos tipos de poblaciones tuvieron características diferentes:

- La c-TXNPx se asoció con células CD11c⁺ que expresaron CD4, bajos niveles de Ly6G y Ly6C, y no expresaron CD68. Además, se caracterizaron por una alta expresión de MHCII. Las llamaremos CD11c⁺ MHCII⁺ CD4⁺ Ly6G⁻ y Ly6C⁻ y CD68⁻.
- La proteína mutada carente de actividad peroxidasa indujo la presencia de células CD11c⁺ que expresaron CD8, bajos niveles de Ly6G y no expresaron CD68 ni Ly6C. Además, se caracterizaron por una alta expresión de MHCII. Las llamaremos CD11c⁺ MHCII⁺ CD8⁺ Ly6G^{low} y Ly6C⁻ y CD68⁻.

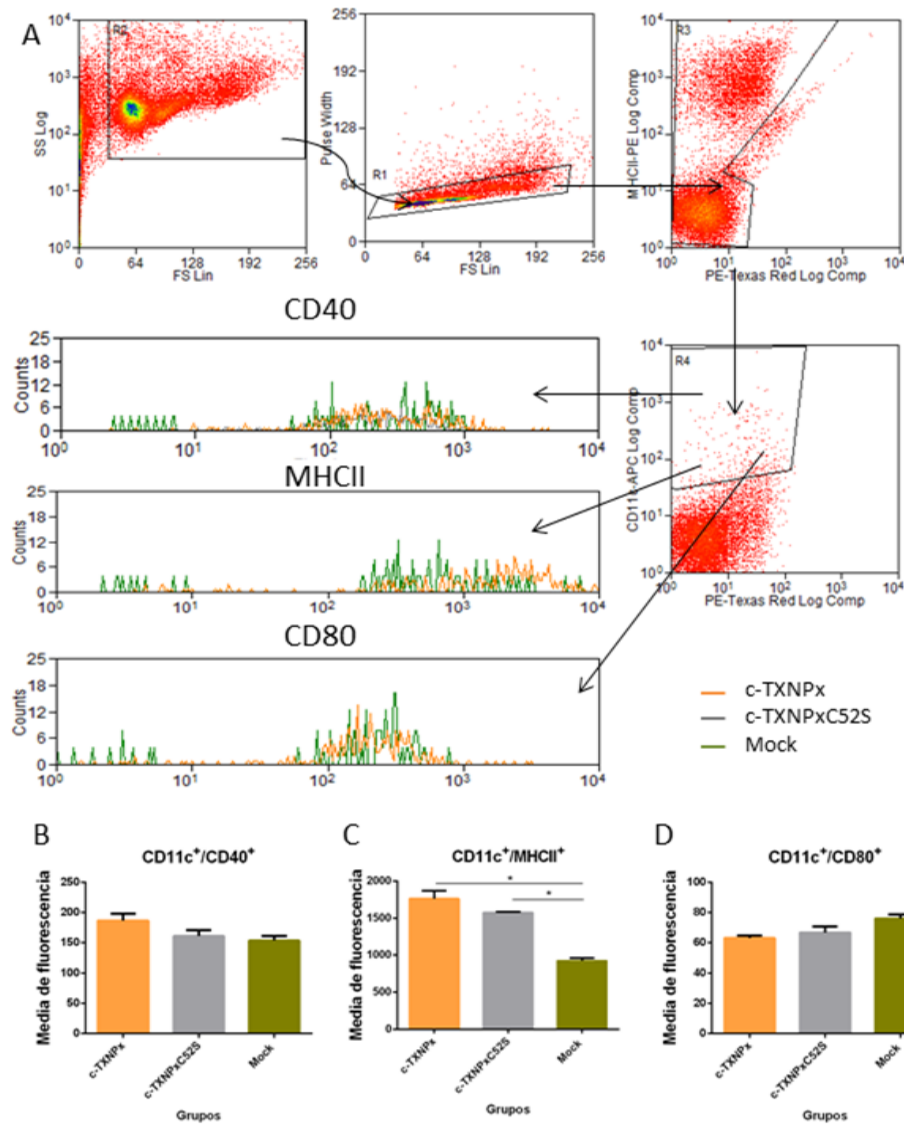


Figura 4.15: Expresión de moléculas co-estimuladoras en células CD11c⁺. A) Gráficos de citometría de flujo que permitieron la selección de la población de interés para el análisis de las moléculas coestimuladoras B) Expresión de CD40. C) Expresión de MHCII. D) Expresión de CD80. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de proteínas en PBS cada dos días. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron los animales y se obtuvieron las células presentes en la cavidad peritoneal. A continuación, se marcaron dichas células con anticuerpos específicos para CD40, MHCII y CD80 en células CD11c⁺. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. La expresión de las moléculas de superficie se presenta como media de fluorescencia + Error estándar de duplicados técnicos que se realizaron a partir de un pool de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *pos hoc* de Tukey).

Análisis de las células F4/80⁺

Paralelamente, se realizó un análisis similar sobre células F4/80⁺ presentes en la cavidad peritoneal de los animales inoculados, en el cual se analizó la expresión de marcadores de superficie y la expresión de moléculas co-estimuladoras.

Las moléculas analizadas fueron MHCII, CD40, CD80, Ly6G, Ly6C y CD68. La estrategia que permitió este análisis se resume en la figura 4.16 A.

Las células F4/80⁺ presentes en los animales inoculados con c-TXNPx presentaron, al igual que las CD11c⁺ del mismo grupo de ratones, ausencia de expresión de Ly6G, y expresión de CD68 (la cual baja pero es mayor en relación a las CD11c⁺ y de Ly6C figura 4.16).

Sin embargo, las células F4/80⁺ provenientes de animales inyectados con c-TXNPxC52S expresaron altos niveles de Ly6G y Ly6C y baja expresión de CD68 (aunque mayor a la de las células CD11c⁺).

Por otro lado, las células F4/80⁺ provenientes de ambos grupos inoculados con las proteínas salvaje y mutante presentaron mayor expresión de MHCII, en comparación con el grupo inoculado con Mock (figura 4.17).

En conclusión, los resultados obtenidos indican que tanto c-TXNPx como c-TXNPxC52S inducen el reclutamiento de células F4/80⁺, aunque la proteína mutante se asoció con una mayor (prácticamente el doble) frecuencia de células F4/80⁺ con respecto a la proteína salvaje. Además, ambas poblaciones F4/80⁺ resultaron diferentes de acuerdo a su fenotipo:

- La c-TXNPx se asocia con células F4/80⁺ que expresaron bajos niveles de CD68 y son negativas para Ly6G y Ly6C, por lo que se propone que sean células del tipo macrófagos. Además, se caracterizan por un aumento de la expresión de MHCII. Las llamaremos F4/80⁺ MHCII⁺ CD68⁺.
- La proteína mutada carente de actividad peroxidasa induce la presencia de células F4/80⁺ que expresan altos niveles de Ly6G, Ly6C y bajos niveles de CD68 y de Ly6G es una molécula cuya alta expresión se asocia con granulocitos, mientras que Ly6C y CD68 se asocian con macrófagos. Este resultado nos hace pensar que son neutrófilos. Además, se caracterizan por un aumento de la expresión de MHCII. Las llamaremos F4/80⁺, MHCII⁺, Ly6G⁺, Ly6C^{low} y CD68⁺.

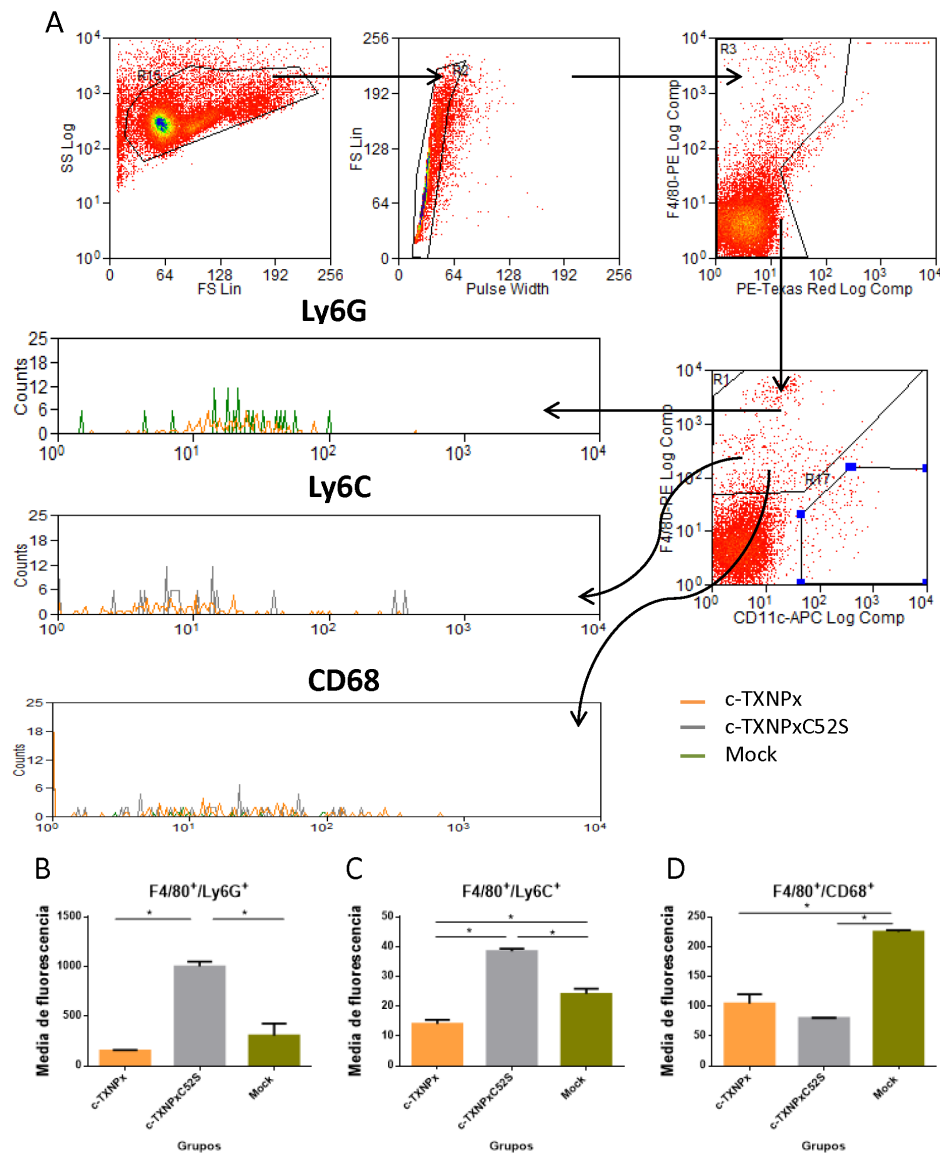


Figura 4.16: Expresión de marcadores de superficie en células F4/80⁺ provenientes de la cavidad peritoneal de animales inoculados. A) Análisis realizados en el software del citómetro de flujo que permitió la selección de la población de interés B) Expresión de Ly6G. C) Expresión de Ly6C. D) Expresión de CD68. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de proteínas en PBS cada dos días. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron los animales y se obtuvieron las células presentes en la cavidad peritoneal. A continuación, se marcaron dichas células con anticuerpos específicos para moléculas de superficie. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. La expresión de las moléculas de superficie se presenta como media de fluorescencia + Error estándar de duplicados técnicos que se realizaron a partir de un pool de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *pos hoc* de Tukey).

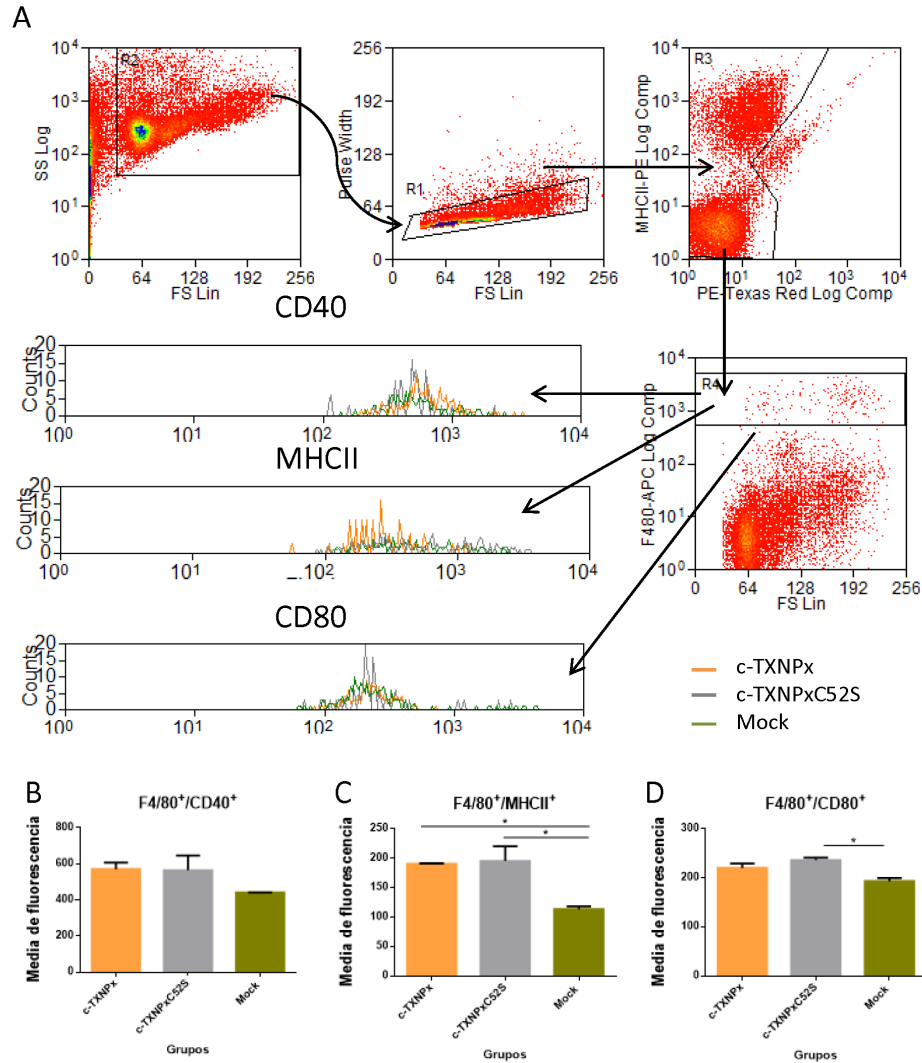


Figura 4.17: Expresión de moléculas co-estimuladoras en células F4/80⁺ de la cavidad peritoneal de ratones inoculados. A) Análisis realizados en el software del citómetro de flujo que permitió la selección de la población de interés B) Expresión de CD40. C) Expresión de MHCII. D) Expresión de CD80. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de proteínas en PBS cada dos días. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron los animales y se obtuvieron las células presentes en la cavidad peritoneal. A continuación, se marcaron dichas células con anticuerpos específicos para moléculas de superficie. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. La expresión de las moléculas de superficie se presenta como media de fluorescencia + Error estándar de duplicados técnicos que se realizaron a partir de un pool de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *pos hoc* de Tukey.

Por último, se observó que la expresión de CD80 varió, detectándose un aumento en la expresión de dicho marcador en el grupo c-TXNPxC52S con

respecto al Mock (figura 4.17).

A continuación, se profundizó en la caracterización de las citoquinas que estas poblaciones producen, mediante citometría de flujo. Para ello, se realizó un ensayo en el que se incubaron las células de la cavidad peritoneal, provenientes de los animales inoculados, con brefeldina A. Esta droga inhibe el transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi; de esta manera fue posible realizar una marcación intracelular pudiéndose analizar la expresión de citoquinas según el fenotipo celular. Mediante esta técnica se analizó la expresión de IL-12 e IL-10 en tanto en células CD11c⁺ como F4/80⁺ (figura 4.18).

Se observó que ambas poblaciones analizadas expresaron más IL-12 en las células provenientes de animales inoculados con c-TXNPx con respecto al control Mock y esta diferencia fue estadísticamente significativa en un t-test (figura 4.18). Con respecto a las células provenientes de animales inoculados con la proteína mutante mostraron una gran dispersión no permitiendo concluir un aumento con respecto a la proteína salvaje o el control.

Por otra parte, en lo que respecta a la expresión de IL-10 no se observaron diferencia entre los animales que recibieron las proteínas con respecto al control (figura 4.18).

En resumen, en esta sección se presentaron los resultados del efecto de las proteínas sobre células del sistema inmune innato presentadoras de antígenos tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Los primeros realizados sobre células esplénicas con un enriquecimiento de células CD11c⁺ de animales naïve y los ensayos *in vivo* realizados sobre células de la cavidad peritoneal luego de la inoculación de las proteínas o del Mock en ratones.

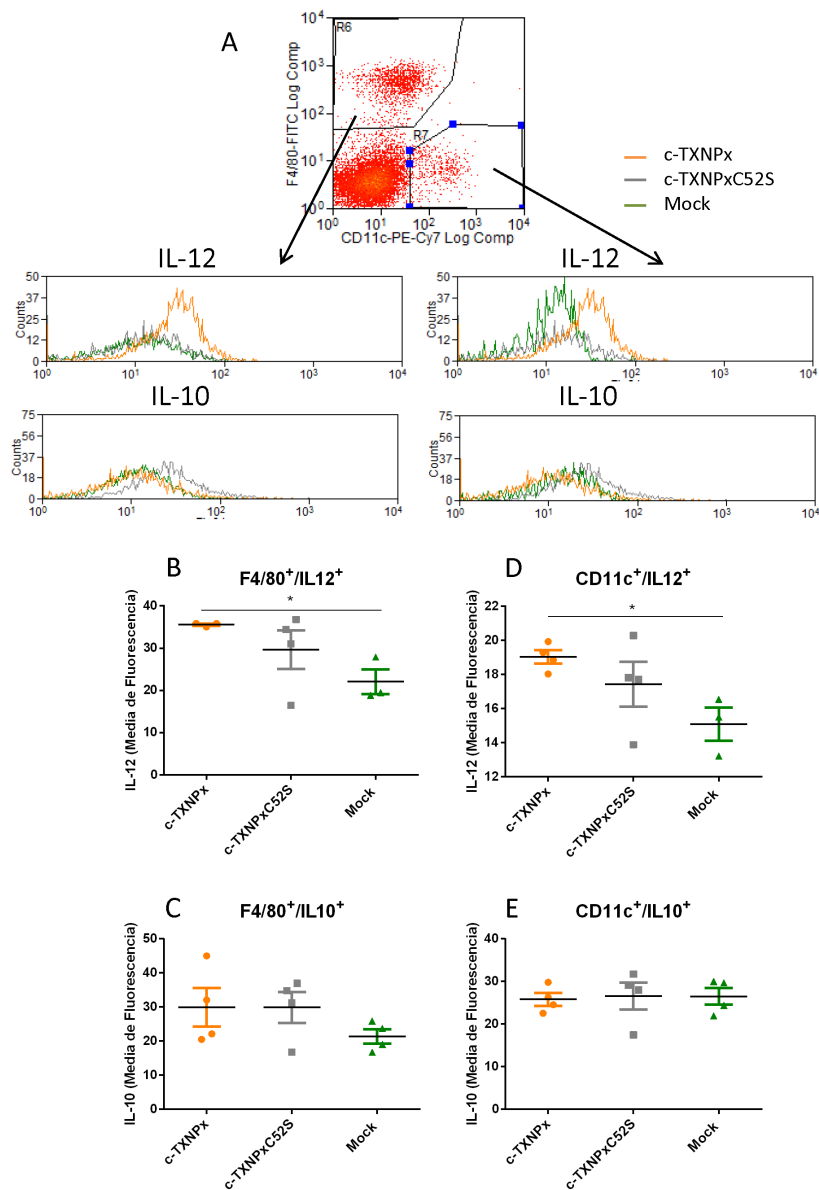


Figura 4.18: Cuantificación de la expresión de citoquinas en las células presentes en la cavidad peritoneal de animales inoculados. A) Análisis realizados en el *software* del citómetro de flujo que permitió la selección de la población de interés B) Producción de IL-12 en células $F4/80^+$. C) Producción de IL-10 en células $F4/80^+$. D) Producción de IL-12 en células $CD11c^+$. E) Producción de IL-10 en células $CD11c^+$. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con $20 \mu\text{g}$ de proteínas en PBS cada dos días. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron y se obtuvieron las células presentes en la cavidad peritoneal. A continuación, se realizó un ensayo de cuantificación de citoquinas intracelulares sobre las poblaciones presentes en la cavidad peritoneal utilizando anticuerpos específicos que permitieron el reconocimiento de IL-12 e IL-10. Dicha expresión se analizó mediante citometría de flujo. La expresión de las citoquinas se presenta como media de fluorescencia + Error estándar provenientes de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ en un t-test.

4.3. Caracterización de la respuesta T inducida por las proteínas

En este apartado se resume los principales resultados obtenidos sobre la caracterización de la respuesta de las células T inducida por las proteínas *in vivo* y *ex vivo* en animales luego de la inoculación con las proteínas c-TXNPx, c-TXNPxC52S o del control Mock. Cabe recordar que los animales recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de las proteínas en PBS. Luego de las inoculaciones fueron obtenidos los bazo y utilizados para diversos análisis.

En una primera instancia se analizó las poblaciones presentes en el bazo luego de las inoculaciones y a continuación, se analizó la proliferación *ex vivo*, de los esplenocitos provenientes de cada grupo frente a estímulos específicos o policlonales.

4.3.1. Análisis de linfocitos T esplénicos

Mediante este ensayo se buscó conocer la respuesta T generada en el bazo luego de las inoculaciones con las proteínas. Se buscó conocer si variaban los porcentajes de los linfocitos B (definidos como CD19⁺) y T CD4 (CD3⁺CD4⁺) y T CD8 (CD3⁺CD8⁺), presentes en el bazo. Para ello se analizó mediante citometría de flujo y usando marcadores de superficie las poblaciones presentes. La estrategia de gating que se siguió para este análisis se resume en la figura 4.19 A.

Tal como se puede observar en la figura 4.19, el porcentaje de estas poblaciones se mantuvo constante entre los diferentes grupos tanto para las células B (figura 4.19 B), como para las células T (figura 4.19 C). Asimismo, no se observaron cambios en los subtipos analizados de células T, las células T CD4 y T CD8 (figura 4.19 D y E, respectivamente).

También analizamos los linfocitos T reguladores, definidos como células CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺. Esta población se estudió mediante citometría de flujo y la estrategia que permitió el análisis se resume en la figura 4.20A. Como se puede observar en la figura 4.20 B la frecuencia de linfocitos T reguladores no varió entre los grupos, obteniéndose porcentajes en el entorno del 6 al 7 % (figura 4.20 B).

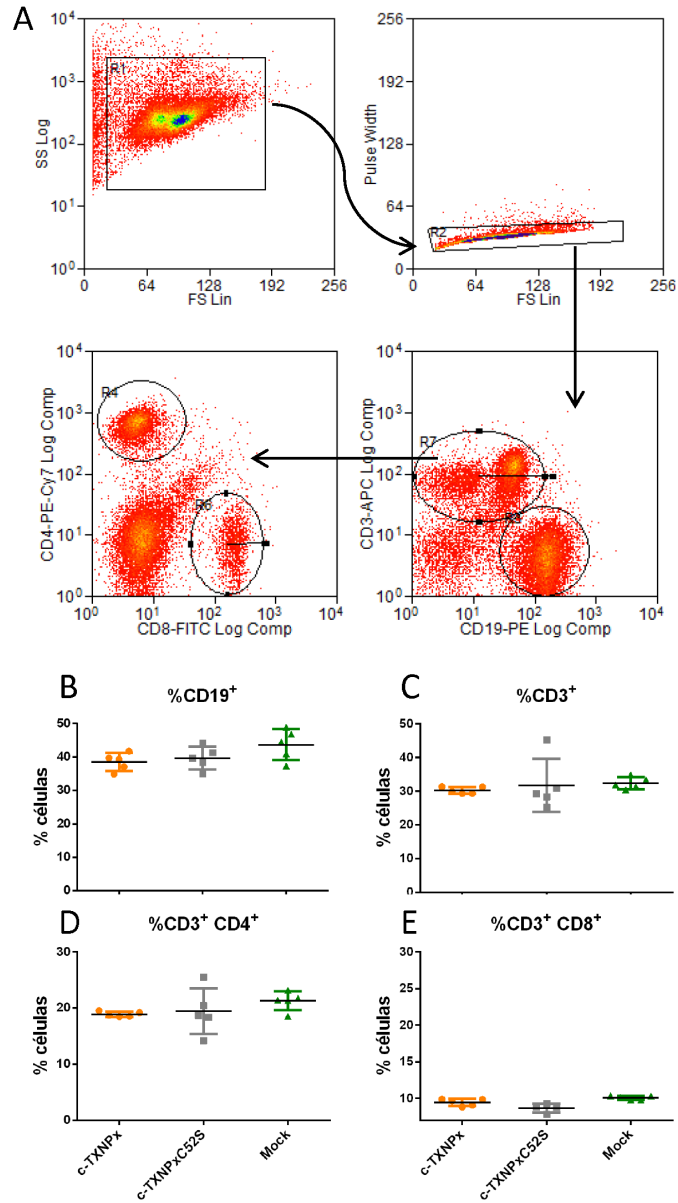


Figura 4.19: Poblaciones linfocitarias presentes en los bazo de los animales inoculados. A) Estrategia de *gating* utilizada para la selección de la población de interés. B) Linfocitos B definidos como CD19⁺. C) Linfocitos T definidos como CD3⁺. D) Linfocitos T CD4 definidos como CD3⁺CD4⁺. E) Linfocitos T CD8 definidos como CD3⁺CD8⁺. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de proteínas en PBS cada dos días. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron los animales y se obtuvieron los bazo. A continuación, se marcaron los esplenocitos con anticuerpos específicos para moléculas de superficie CD3, CD4 y CD8. Las células se analizaron mediante citometría de flujo y se presentan como la media + error estándar, del porcentaje de dichas poblaciones en animales individuales para cada grupo (n=7).

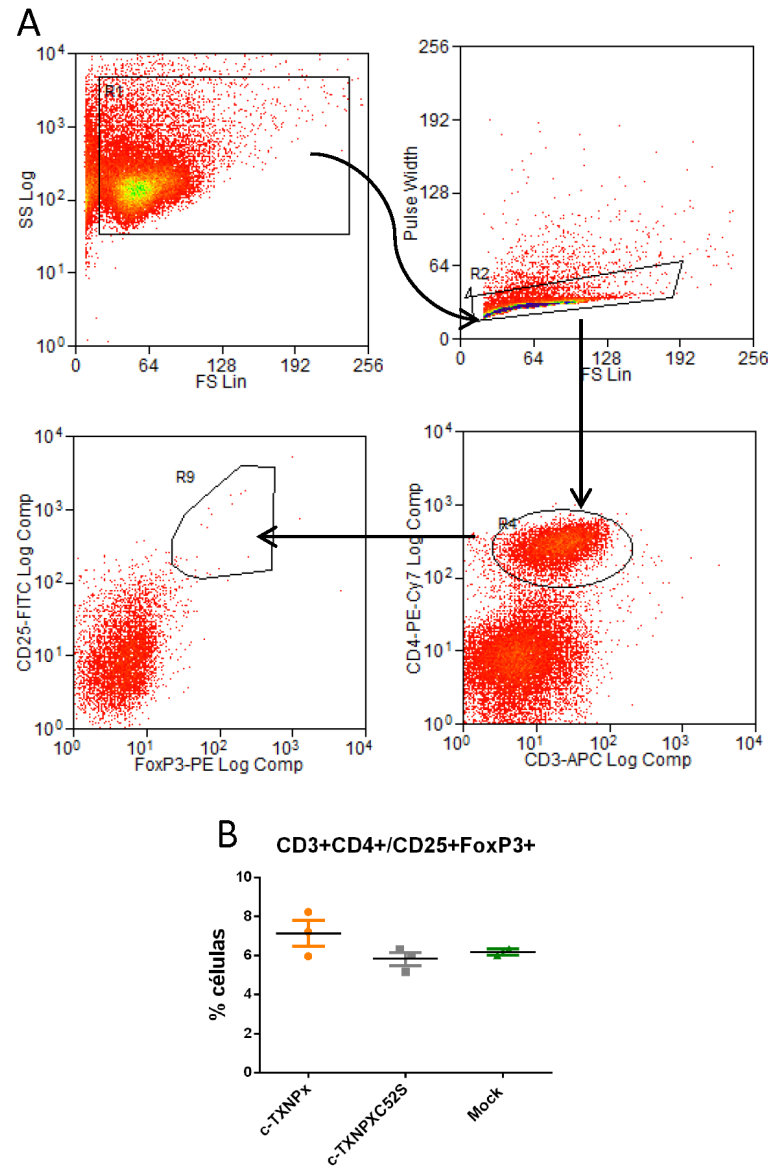


Figura 4.20: Análisis de linfocitos T reguladores presentes en los bazos de los animales inoculados con las proteínas y Mock. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de proteínas en PBS cada dos días. A) Estrategia de gating utilizada para la selección de la población de interés. B) Porcentaje de linfocitos T reguladores definidos como CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron los animales y se obtuvieron los bazos. A continuación, se marcaron los esplenocitos con anticuerpos específicos para moléculas de superficie CD3, CD4 y CD25. A su vez, se utilizó un anticuerpo que reconoce al factor de transcripción FoxP3 característico de los linfocitos T reguladores. Las células se analizaron mediante citometría de flujo y se presentan como la media + error estándar, del porcentaje de dichas poblaciones en animales individuales para cada grupo (n=3).

Por otro lado, analizamos el tipo de citoquinas producidas por los linfocitos T cooperadores: IFN- γ (Th1), IL-4 (Th2) e IL-17 (Th17). En este sentido, se analizó la expresión de citoquinas en esplenocitos obtenidos de los bazo de los animales inoculados. Para ello, se incubaron dichas células con Brefeldina A y mediante citometría de flujo se analizó la expresión de IL 4, IL17 e IFN- γ .

Como se muestra en la figura 4.21, los linfocitos T CD4⁺ provenientes de los animales inoculados con c-TXNPx presentan mayores niveles de IFN- γ que los otros grupos. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (figura 4.21 B). Por otro lado, los linfocitos T CD4⁺ provenientes de los animales inoculados con el control (Mock), presentaron significativamente mayores niveles de IL-4 que aquellos provenientes de los animales inoculados con las proteínas (figura 4.21 C). Por último, las células T CD4⁺ provenientes de los tres grupos de ratones presentaron los mismos niveles de IL-17 (figura 4.21 D).

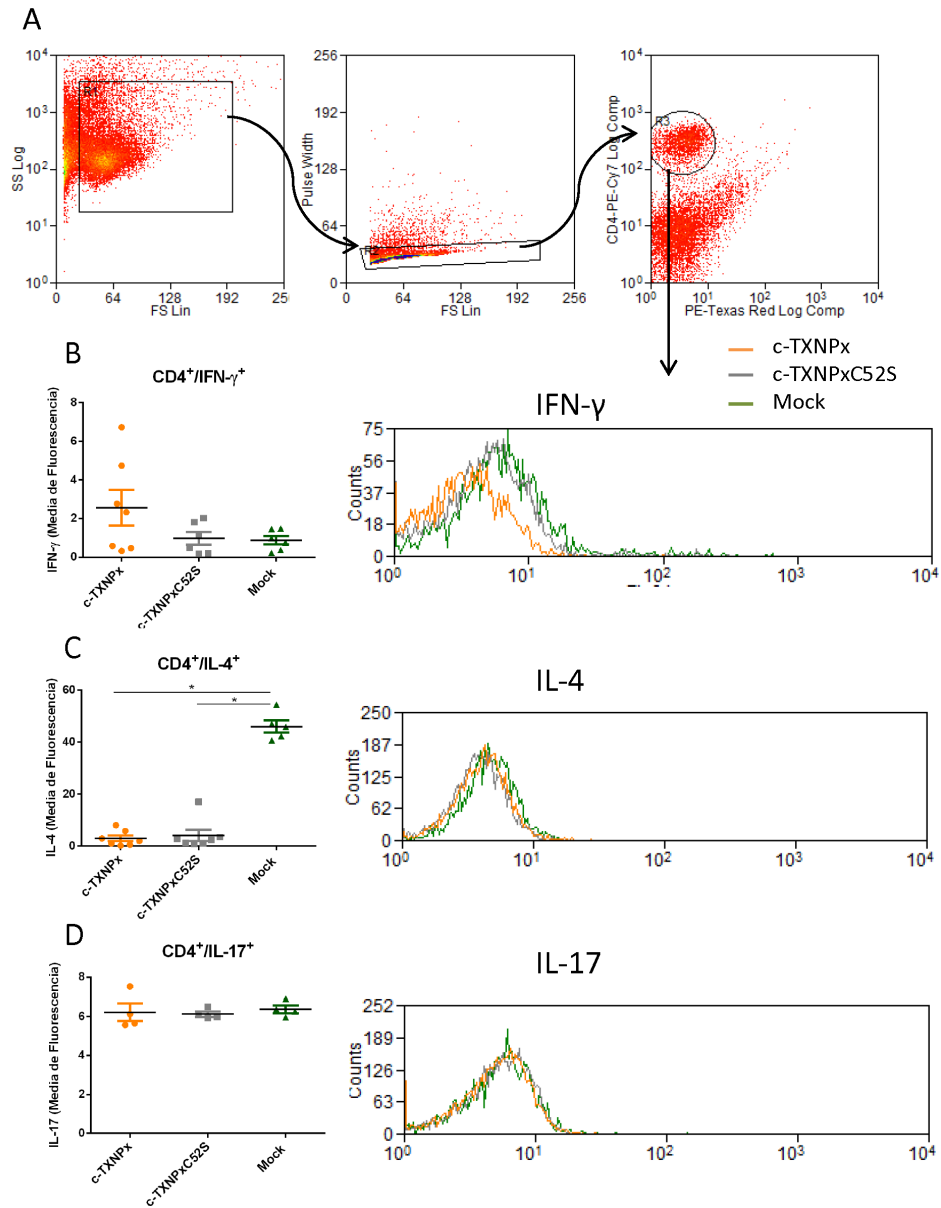


Figura 4.21: Evaluación de la expresión de citoquinas en las células presentes en los bazos de animales inoculados. A) Estrategia de gating que permitió la selección de la población de interés. B) Expresión de IFN- γ en linfocitos T $CD4^+$ C) Expresión de IL-4 en linfocitos T $CD4^+$ D) Expresión de IL-17 en linfocitos T $CD4^+$. Ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones con 20 μ g de proteínas en PBS cada dos días. Luego de dos días de la última inoculación se sacrificaron y se obtuvieron los bazos. A continuación, se realizó un ensayo con brefeldina A sobre las poblaciones presentes dicho órgano utilizando anticuerpos específicos que permitieron el reconocimiento de IFN- γ , IL-4 e IL-17. La expresión de las citoquinas se presenta como media de fluorescencia + Error estándar provenientes de 7 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *pos hoc* de Tukey.

4.3.2. Análisis del efecto de c-TXNPx y c-TXNPxC52S sobre la proliferación de células T

Proliferación de células T frente a estímulos policlonales

Para analizar la proliferación de los linfocitos T, se cultivaron *ex vivo* los esplenocitos provenientes de los bazo de los animales inoculados y se estudió la proliferación frente a estímulos policlonales. En este ensayo se utilizó Forbol-miristato-acetato junto con la Ionomicina (PMA/Iono) como estímulo policlonal.

La proliferación de los esplenocitos fue estudiada mediante citometría de flujo en donde se analizó la proliferación de los linfocitos T CD4 y T CD8 con la sonda fluorescente CFSE, y la producción de IFN- γ por parte de los esplenocitos totales en el sobrenadante de cultivo. La sonda CFSE, es una sonda fluorescente que entra dentro de la célula y a medida que esta se divide se va diluyendo, lo que permite evidenciar la tasa de proliferación de una población celular mediante la dilución de la sonda.

El diseño experimental junto con la estrategia de gating que se usó en este estudio se resumen en la figura 4.22 A y B, respectivamente. El índice de proliferación se calculó como la relación entre el porcentaje de células CFSE^{low} en presencia del estímulo policlonal y el porcentaje de de dichas células sin estimular *ex vivo*.

En este ensayo se pudo observar que la respuesta de los grupos frente al estímulo policlonal, fue diferente. Con respecto a los linfocitos TCD4 y TCD8 provenientes del grupo c-TXNPx, se observó que estos mostraron índices de proliferación en el entorno de 5, lo que evidenció que estas células presentaron una alta de proliferación cuando se les agregó el estímulo policlonal con respecto a la condición sin estimular (figura 4.23). A su vez, se observó que los esplenocitos provenientes de los animales inoculados con c-TXNPxC52S presentaron menores índices de proliferación tanto para las células T CD4 y T CD8 con respecto a los observados para c-TXNPx. Sin embargo, los provenientes del grupo Mock presentaron altas tasas de proliferación *ex vivo* frente a este estímulo, similares a las encontradas para los linfocitos provenientes del grupo c-TXNPx figura 4.23.

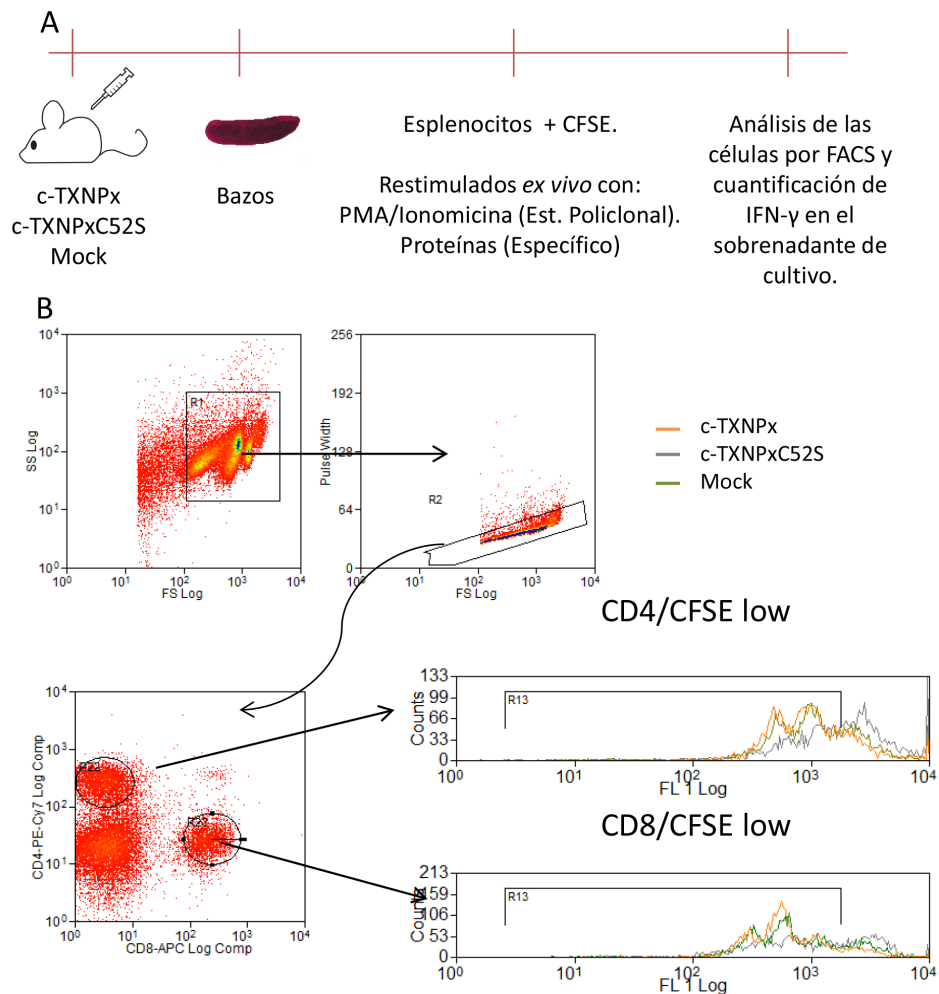


Figura 4.22: Ensayo de proliferación de esplenocitos frente a estímulos policlonales. A) Esquema del diseño experimental para el análisis de la proliferación de esplenocitos frente a estímulos policlonales. B) Gráficos utilizados para el análisis de la proliferación de células T CD4 y T CD8 mediante citometría de flujo. Ratones BALB/c fueron inoculados, vía intraperitoneal, 7 veces con 20 μ g de c-TXNPx, c-TXNPxC52S o Mock en PBS. Luego de dos días de la última inoculación, los animales fueron sacrificados y se removieron los bazo a partir de los cuales se obtuvieron los esplenocitos. Estos fueron incubados *ex vivo* con la sonda fluorescente CFSE y reestimulados con PMA/Iono como estímulo policlonal. Luego de 5 días de cultivo las células fueron analizadas mediante citometría de flujo.

Estos resultados sugieren que las inoculaciones con la proteína salvaje o la mutante produjeron respuestas diferenciales en los ratones *in vivo*, y que estas se tradujeron en una respuesta diferencial frente al estímulo policlonal.

Por otra parte, se cuantificaron los niveles de IFN- γ en el sobrenadante

de cultivos. Como se puede ver en la figura 4.23, para todos los grupos existe producción de esta citoquina, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Pese a esto, en la muestra proveniente del grupo c-TXNPx existe un ligero aumento de los niveles de esta citoquina.

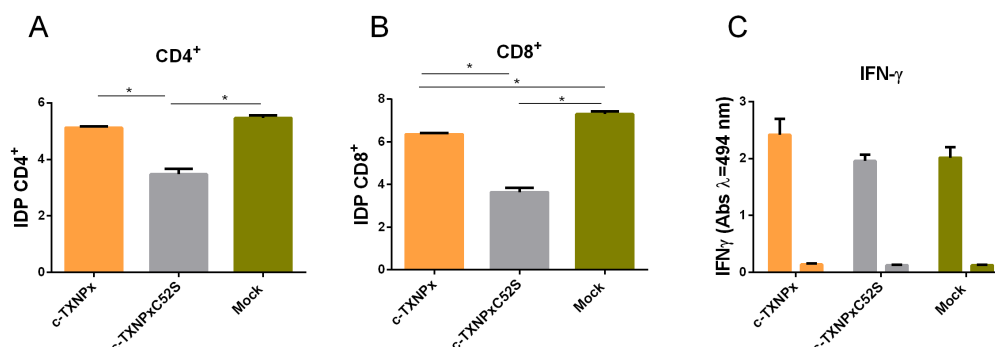


Figura 4.23: Proliferación *ex vivo* frente a un estímulo policlonal de linfocitos provenientes de los diferentes grupos. A) Células T CD4⁺ B) Células TCD8⁺ C) Producción de IFN- γ por parte de los esplenocitos. Ratones BALB/c fueron inoculados, vía intraperitoneal, 7 veces con 20 μ g de c-TXNPx, c-TXNPxC52S o Mock en PBS. Luego de dos días de la última inoculación, los animales fueron sacrificados y se removieron los bazo a partir de los cuales se obtuvieron los esplenocitos. Estos fueron incubados *ex vivo* con la sonda fluorescente CFSE y reestimulados con PMA/Iono como estímulo policlonal. Luego de 5 días de cultivo las células T fueron analizadas mediante citoemtría de flujo y se cuantificó los niveles de IFN- γ mediante ELISA en el sobrenadante de cultivo. Los resultados se presentan como promedio + error estándar de los índices de proliferación, calculados como la relación entre el porcentaje de células CFSElow en presencia y ausencia del estímulo policlonal. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey).

Proliferación de células T frente a un estímulo específico

Con el fin de complementar los resultados anteriores y de disecar la respuesta T inducida por las proteínas, se analizó la proliferación de los esplenocitos de los animales inoculados *ex vivo* frente a estímulos específicos. En este sentido, los esplenocitos provenientes de animales inoculados con la proteína salvaje fueron estimulados *ex vivo* con dicha proteína. Así también para los esplenocitos provenientes de los animales inoculados con la proteína mutante quienes fueron reestimulados con c-TXNPxC52S. La misma metodología fue utilizada para el Mock.

Tal como se observa en la figura 4.24, existen diferencias en la proliferación

entre los grupos tanto para los linfocitos T CD4 como para los T CD8 y que estas diferencias fueron significativas en un test de ANOVA con pos hoc de Tukey. En el gráfico A de la figura 4.24 se puede observar que tanto los linfocitos T CD4 como los T CD8 provenientes de los bazos de los animales inoculados con c-TXNPx presentaron un aumento significativo de la proliferación al ser estimulados con la misma proteína, en comparación con el grupo inoculado con c-TXNPxC52S y Mock (figura 4.24). Asimismo, los esplenocitos derivados de los ratones inoculados con la proteína salvaje produjeron altos niveles de IFN- γ , mientras que aquellos provenientes de animales inyectados con la proteína mutante o el control no produjeron cantidades detectables de esta citoquina. Estos resultados indican que c-TXNPx es capaz de inducir la proliferación de linfocitos T CD4 de tipo Th1 (productores de IFN- γ), así como de T CD8, mientras que esta capacidad se pierde en ausencia de actividad peroxidasa.

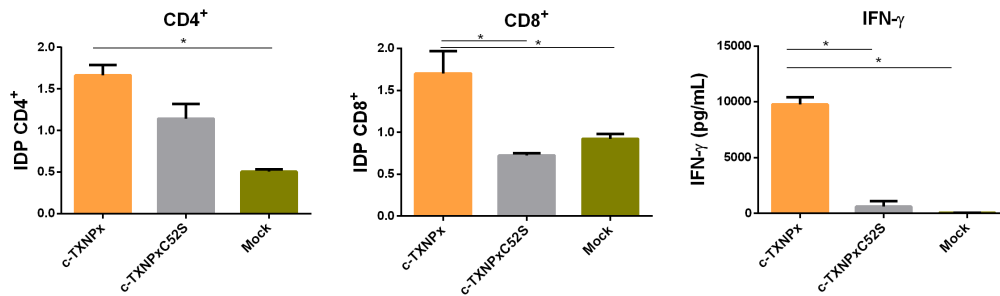


Figura 4.24: Proliferación de células T frente a estímulos específicos de linfocitos provenientes de los diferentes grupos. A) Células T CD4⁺ B) Células T CD8⁺. C) Producción de IFN- γ por parte de los esplenocitos. Ratones BALB/c fueron inoculados, vía intraperitoneal, 7 veces con 20 μ g de c-TXNPx, c-TXNPxC52S o Mock en PBS. Luego de dos días de la última inoculación, los animales fueron sacrificados y se removieron los bazos a partir de los cuales se obtuvieron los esplenocitos. Estos fueron incubados ex vivo con la sonda fluorescente CFSE y reestimulados con el mismo antígeno con el cual los animales fueron inyectados. Luego de 5 días de cultivo las células fueron analizadas mediante citometría de flujo y se cuantificó los niveles de IFN- γ mediante ELISA en el sobrenadante de cultivo. Los resultados se presentan como promedio + Error estándar de los índices de proliferación, calculados como la relación entre el porcentaje de células CFSE^{low} en presencia y ausencia de antígeno. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey).

Análisis de la reactividad cruzada de células T

Con el fin de disecar el rol de la actividad peroxidasa en la activación de los linfocitos T se realizó ensayos de reactividad cruzada. En este apartado se

presentan los resultados de este ensayo en que el cual se analizó la proliferación de linfocitos T y de niveles de IFN- γ frente a estímulos cruzados. Esto significa reestimar con c-TXNPxC52S los esplenocitos provenientes del grupo c-TXNPx y viceversa. Se analizó también la respuesta de los esplenocitos provenientes de los grupos control frente a ambas proteínas (figura 4.25).

En una primera instancia se pudo evidenciar que la reestimación *ex vivo* con c-TXNPxC52S produjo un aumento de la proliferación en las células T CD4 provenientes de los animales inoculados con c-TXNPx, con respecto al grupo control, y que esta diferencia es estadísticamente significativa. Esto muestra que dichas células provenientes de este grupo son capaces de reconocer a c-TXNPxC52S y proliferar frente a su presencia. Esta diferencia no fue acompañada por los linfocitos T CD8 quienes no mostraron diferencias en la proliferación cuando fueron reestimuladas con c-TXNPx. Por último, los niveles de IFN- γ mostraron un aumento en el grupo c-TXNPx con respecto al grupo control cuando fueron expuestos a la proteína mutante, a pesar de los niveles de IFN- γ producidos fueron mayores al estimular con la misma proteína (figura 4.25 C).

El mismo análisis se realizó para los esplenocitos provenientes de los animales inoculados con c-TXNPxC52S o Mock, ahora reestimulados con la proteína salvaje. Se observó que los linfocitos T CD4 provenientes del grupo inoculado con la proteína mutante presentaron altas tasas de proliferación cuando fueron reestimulados con c-TXNPx con respecto al grupo control, incluso mayores que cuando la reestimulación había sido específica. Esto muestra una gran diferencia en la respuesta generada entre ambas proteínas, permitiendo dejar en evidencia que c-TXNPx resultó ser un activador de la respuesta inmune más potente que su versión mutante. Esta tendencia no fue acompañada por los linfocitos T CD8 ni por la producción de IFN- γ .

Estos resultados de la respuesta frente a estímulos cruzados, en su conjunto, dejaron evidencias nuevas diferencias en la respuesta sobre células del sistema inmune, generada por ambas proteínas. Permitieron evidenciar que c-TXNPx es un potente activador de las células T CD4, mostrando que la respuesta generada por c-TXNPxC52S *in vivo* puede ser potenciada por la posterior incubación con c-TXNPx.

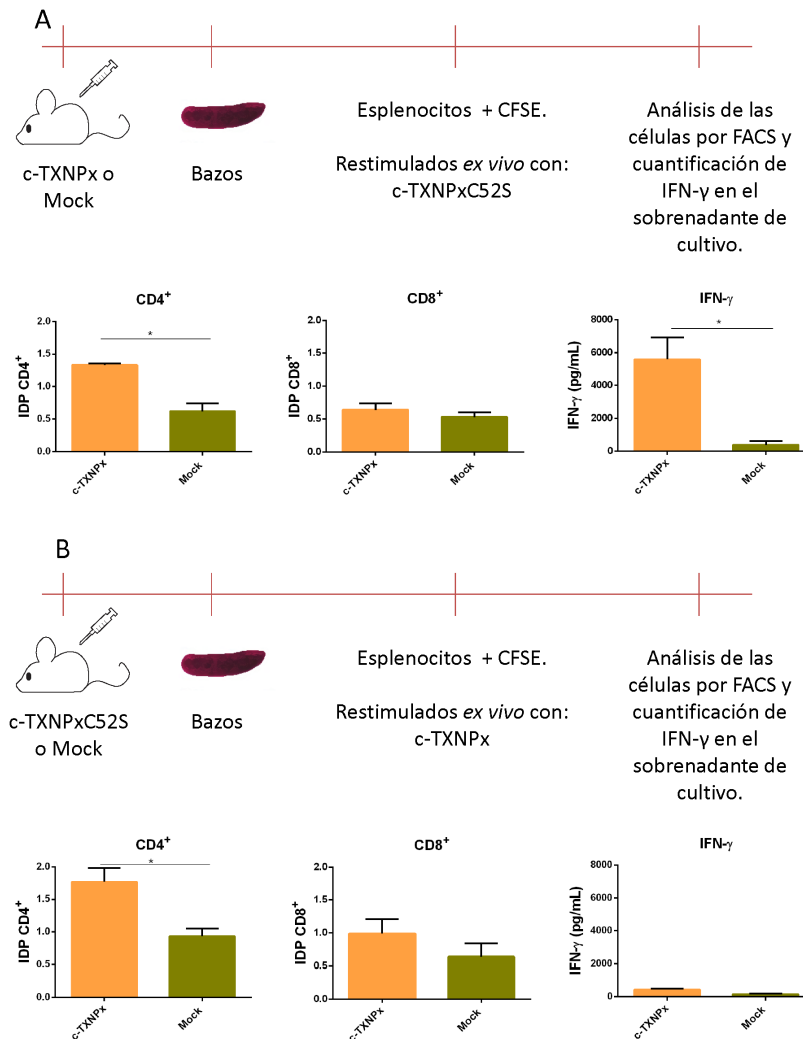


Figura 4.25: Análisis de la reactividad cruzada producida por la proteína salvaje y mutante sobre células T. A) Diseño experimental utilizado para el abordaje del estudio de la reactividad cruzada para los animales inoculados con c-TXNPx y reestimulados con c-TXNPxC52S. B) Diseño experimental utilizado para el abordaje del estudio de la reactividad cruzada para los animales inoculados con c-TXNPxC52S y reestimulados con c-TXNPx. C) Índice de proliferación de células T CD4⁺. D) Índice de proliferación de células T CD8⁺. E) Producción de IFN- γ por parte de los esplenocitos. R ratones BALB/c fueron inoculados, vía intraperitoneal, 7 veces con 20 μ g de c-TXNPx, c-TXNPxC52S o Mock en PBS. Luego de dos días de la última inoculación, los animales fueron sacrificados y se removieron los bazos a partir de los cuales se obtuvieron los esplenocitos. Estos fueron incubados *ex vivo* con la sonda fluorescente CFSE y reestimulados con el antígeno cruzado. Luego de 5 días de cultivo las células fueron analizadas mediante citometría de flujo y se cuantificó los niveles de IFN- γ mediante ELISA en el sobrenadante de cultivo. Los resultados se presentan como promedio + error estándar de los índices de proliferación, calculados como la relación entre el porcentaje de células CFSE^{low} en presencia y ausencia del antígeno de interés. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de dos vías.

En resumen, en este capítulo se presentaron los resultados de la respuesta T inducida por la inoculación de las proteínas en ratones. Se observó que pese a que no existe una diferencia en la proporción de linfocitos B y T, en los bazo de los animales inoculados entre los grupos; sí existe una respuesta diferencial por parte de los linfocitos T frente a la proteína salvaje y a la mutante, cuando hay reestimulación *ex vivo*.

Se observó que tanto las células T CD4 como T CD8, provenientes de los grupos c-TXNPx y c-TXNPxC52S, presentan índices de proliferación y producción de IFN- γ diferentes tanto frente a estímulos policlonales y específicos. Se observó que la mayor respuesta se observa en los animales inoculados con c-TXNPx y que esta estimulación *in vivo* es muy específica de la proteína salvaje debido a que no se logran los mismos índices de proliferación (para el caso de las células TCD8), o de producción de IFN- γ cuando son reestimuladas con la proteína mutante *ex vivo* demostrando diferente capacidad de activar linfocitos T específicos.

4.3.3. Análisis de la capacidad presentadora de antígenos de DCs y su capacidad de expandir respuestas T CD4 y T CD8 específicas

Teniendo en cuenta que la c-TXNPx salvaje fue capaz de condicionar a las células dendríticas induciendo mayor expresión de MHCII y CD80, así como la expresión de IL-6 e IL-12 en relación a la mutante; junto con el hecho de que los linfocitos T tienen menor o nula capacidad proliferativa al ser estimulados con la proteína mutante; manejamos la hipótesis de que la proteína salvaje activa puede modular a las células dendríticas proporcionándoles mayor capacidad de presentar antígenos, lo que resultaría en una respuesta incrementada de linfocitos T CD4 específica. Para poder corroborar esta hipótesis desarrollamos ensayos de presentación antigénica *in vitro*.

En este capítulo se presentan los principales resultados obtenidos con respecto a la capacidad presentadora de células CD11c⁺ murinas naïve, y la capacidad de estas para expandir la respuesta de linfocitos T específica frente a un antígeno.

En este sentido se evaluó la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL12) y anti-inflamatoria (IL-10), por parte de las células CD11c⁺ frente a las proteínas y al Mock de igual forma a lo explicado en la sección 4.2.1. A su

vez, se evaluó la secreción de IFN- γ por parte de los linfocitos T, luego de ser co-cultivados con las células CD11c⁺ condicionadas con los antígenos.

Producción de citoquinas por parte de las células CD11c⁺ cargadas

Las células CD11c⁺ fueron incubadas con concentraciones crecientes de las proteínas salvaje y mutante o Mock. Estos resultados mostraron una mayor producción de IL-6 e IL-12 cuando fueron incubadas con la proteína salvaje y no así con la proteína mutada o el control.

Posteriormente, con el fin de determinar si la modulación de c-TXNPx sobre las células dendríticas afecta la capacidad de estas células de presentar antígenos y por consiguiente estimular linfocitos T específicos realizamos un ensayo que consistió en:

- condicionamiento de células CD11c⁺ con las proteínas c-TXNPx salvaje y mutada
- lavados extensos para eliminar las proteínas del medio de cultivo
- incubación con linfocitos T específicos (provenientes de ratones inmunizados con c-TXNPx o c-TXNPxC52S, para determinar, a través de la producción de IFN- γ , la estimulación de los linfocitos T desencadenada por las células CD11c⁺. Los resultados obtenidos son analizados en las figuras que se muestran a continuación.

En este ensayo se pudo observar que las células esplénicas enriquecidas en CD11c⁺ cargadas con c-TXNPx produjeron una fuerte producción de IFN- γ por parte de los esplenocitos provenientes de los animales inoculados con este mismo antígeno. Esta diferencia se detectó tanto para la concentración 6 μ g/mL como 30 μ g/mL (figura 4.26 B). No así las células cargadas con c-TXNPxC52S quienes mostraron el mismo patrón que las células cargadas con el Mock. Estas últimas no produjeron la inducción de la producción de la citoquina en estudio incluso cuando fueron cargadas con 30 μ g/mL de c-TXNPxC52S o el volumen equivalente de Mock (figura 4.26 B).

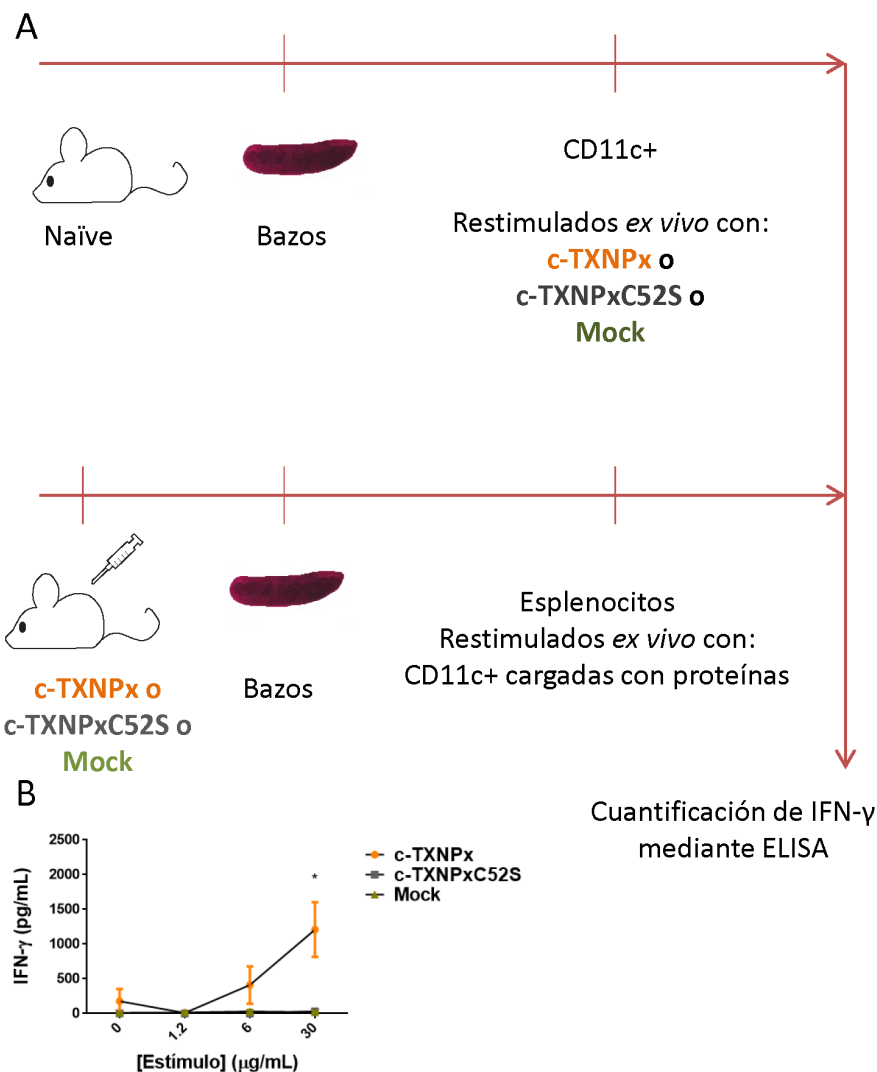


Figura 4.26: Producción de IFN- γ por parte de esplenocitos provenientes de los diferentes grupos frente a células esplénicas enriquecidas en CD11c⁺ cargadas con las proteínas. A) Resumen del diseño experimental utilizado B) Niveles de IFN- γ en el sobrenadante de cultivos. En una primera instancia se obtuvieron células esplénicas enriquecidas en células CD11c⁺, se cargaron con los antígenos c-TXNPx, c-TXNPxC52S o Mock. Al día siguiente, luego de lavar extensamente se co-incubaron estas células con esplenocitos provenientes de animales inoculados con los mismos antígenos. Estos animales recibieron 3 inyecciones con adyuvante incompleto de Freud vía intraperitoneal, una vez por semana durante 3 semanas. Al cabo de 5 días se colectó el sobrenadante de cultivo y se cuantificaron los niveles de IFN- γ mediante ELISA. Los resultados se presentan como media + error estándar de tres réplicas biológicas. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de dos vías con *pos hoc* de Tukey.

Posteriormente, para determinar si la ausencia de producción de IFN- γ por parte de los esplenocitos específicos obtenidos tras la inyección con c-TXNPxC52S se debe a una inhibición en la presentación de antígenos de la células dendríticas, se analizó si la incubación de células dendríticas por parte de las proteínas condicionan su capacidad de estimulación *ex vivo* de linfocitos T obtenidos únicamente tras la inmunización con la proteína salvaje (esquema figura A).

En este ensayo se pudo observar que los esplenocitos produjeron mayores niveles de la IFN- γ cuando fueron incubados con células CD11c⁺ condicionadas con la proteína salvaje o mutante, en comparación con el control (figura 4.27). Este resultado demuestra que la proteína mutante no inhibe la presentación antigénica y entonces no puede explicar el resultado obtenido anteriormente sobre la ausencia de producción de IFN- γ (figura 4.27).

El mismo abordaje descrito previamente se realizó con los esplenocitos provenientes de animales inoculados con c-TXNPxC52S. Nuevamente el diseño experimental que se utilizó en este abordaje se esquematiza en la figura 4.28 A. Sin embargo, no se observó producción de IFN- γ en ninguna de las condiciones ensayadas.

Este ensayo fue realizado también con el control Mock, para ello se inocularon animales con dicho control y fueron co-incubados con células esplénicas murinas enriquecidas en CD11c⁺. Al igual que para las proteínas la estrategia utilizada se resume en la parte A de la figura 4.29.

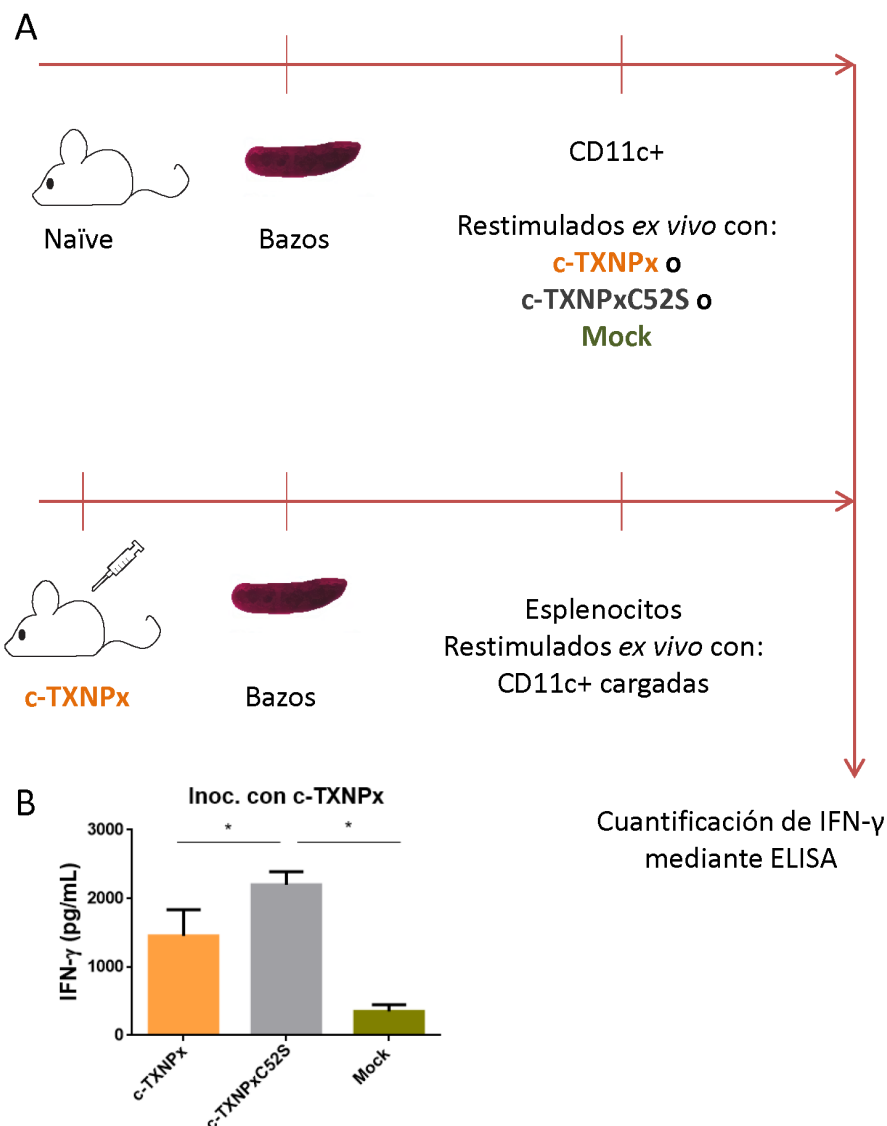


Figura 4.27: Producción de IFN- γ por parte de esplenocitos provenientes de los animales inyectados con c-TXNPx frente a células esplénicas enriquecidas en CD11c⁺ cargadas con las proteínas o el Mock. A) Resumen del diseño experimental utilizado B) Niveles de IFN- γ en el sobrenadante de cultivos. En una primera instancia se obtuvieron células esplénicas enriquecidas en células CD11c⁺, se cargaron con los antígenos c-TXNPx, c-TXNPxC52S o Mock. Al día siguiente, se co-incubaron estas células con esplenocitos provenientes de animales inoculados con c-TXNPx. Estos animales recibieron 3 inyecciones con 20 μ g de c-TXNPx junto a adyuvante incompleto de Freud vía intraperitoneal, una vez por semana durante 3 semanas. Al cabo de 5 días se colectó el sobrenadante de cultivo y se cuantificaron los niveles de IFN- γ mediante ELISA. Los resultados se presentan como media + error estándar de tres réplicas biológicas. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *pos hoc* de Tukey.

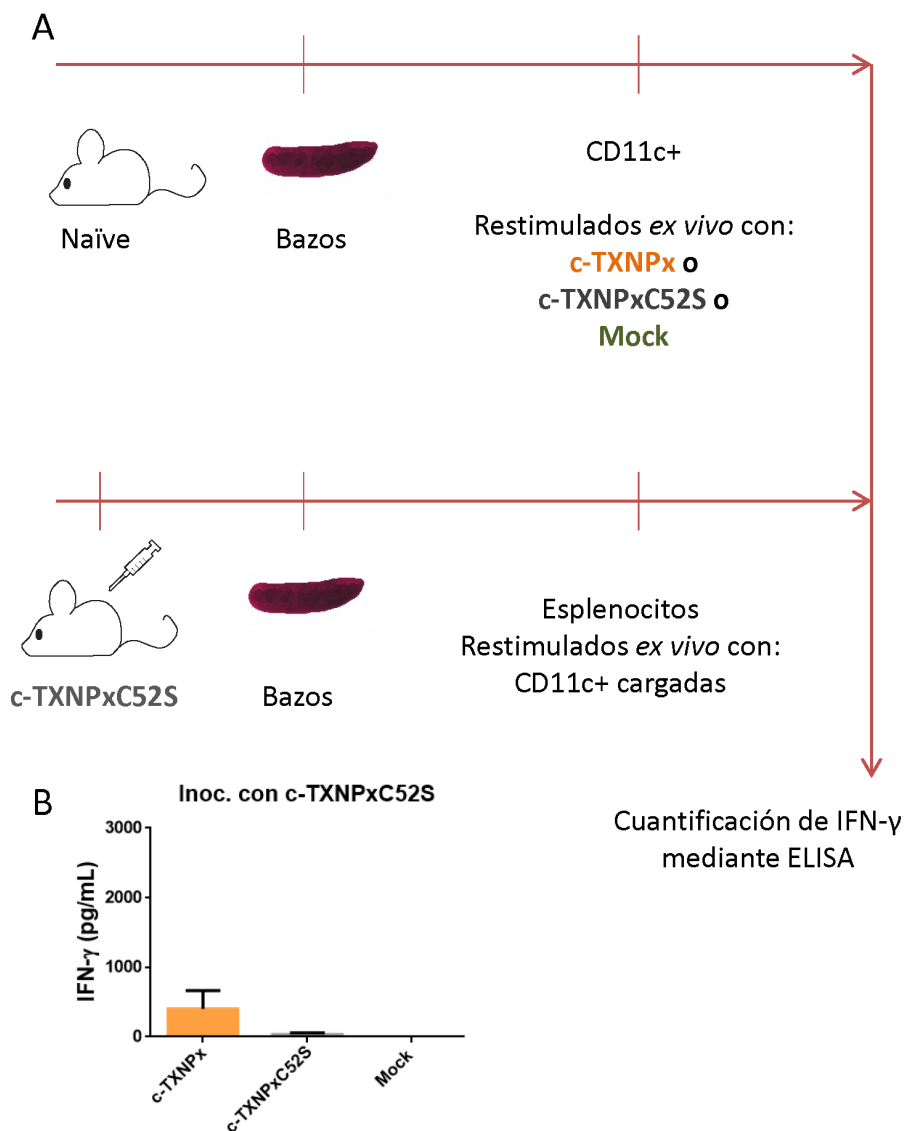


Figura 4.28: Producción de IFN- γ por parte de esplenocitos provenientes de los animales inyectados con c-TXNPxC52S frente a células esplénicas enriquecidas en CD11c⁺ cargadas con las proteínas o el Mock. A) Resumen del diseño experimental utilizado B) Niveles de IFN- γ en el sobrenadante de cultivos. En una primera instancia se obtuvieron células esplénicas enriquecidas en células CD11c⁺, se cargaron con los antígenos c-TXNPx, c-TXNPxC52S o Mock. Al día siguiente, se co-incubaron estas células con esplenocitos provenientes de animales inoculados con c-TXNPxC52S. Estos animales recibieron 3 inyecciones con 20 μ g de esta proteína junto a adyuvante incompleto de Freud vía intraperitoneal, una vez por semana durante 3 semanas. Al cabo de 5 días se colectó el sobrenadante de cultivo y se cuantificaron los niveles de IFN- γ mediante ELISA. Los resultados se presentan como media + error estándar de tres réplicas biológicas.

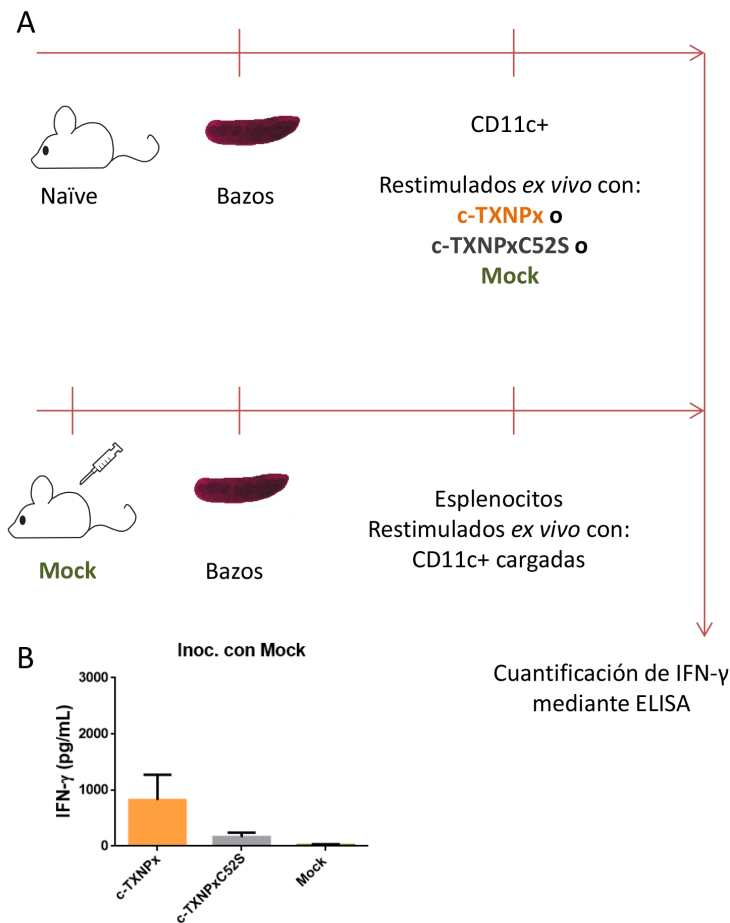


Figura 4.29: Producción de IFN- γ por parte de esplenocitos provenientes de los animales inyectados con Mock frente a células esplénicas enriquecidas en CD11c⁺ cargadas con las proteínas o el Mock. A) Resumen del diseño experimental utilizado B) Niveles de IFN- γ en el sobrenadante de cultivos. En una primera instancia se obtuvieron células esplénicas enriquecidas en células CD11c⁺, se cargaron con los antígenos c-TXNPx, c-TXNPxC52S o Mock. Al día siguiente, se co-incubaron estas células con esplenocitos provenientes de animales inoculados con Mock. Estos animales recibieron 3 inyecciones con el volumen de Mock, equivalente a 20 μ g de c-TXNPx junto a adyuvante incompleto de Freud vía intraperitoneal, una vez por semana durante 3 semanas. Al cabo de 5 días se colectó el sobrenadante de cultivo y se cuantificaron los niveles de IFN- γ mediante ELISA. Los resultados se presentan como media + error estándar de tres réplicas biológicas.

Efecto de las proteínas salvaje y mutante sobre la presentación antigénica de la ovalbúmina

En este ensayo se buscó dilucidar el rol de la actividad peroxidasa de c-TXNPx en la presentación de un antígeno modelo como es la Ovalbúmina.

Para ello, se utilizaron un modelo de estudio de la presentación antigénica *in vitro* que consiste en el uso de esplenocitos provenientes de ratones transgénicos C57BL/6 OT-II . En líneas generales, estos ratones transgénicos expresan las cadenas alfa y beta del receptor de células T que en conjunto con el co-receptor CD4 se unen específicamente al péptido de ovoalbúmina 323-329 aviar, cuando este es presentado por el MHCII. Luego del reconocimiento del péptido se produce una proliferación de los linfocitos T CD4. Este modelo animal resulta de gran utilidad a la hora de estudiar distintos aspectos de la biología de la presentación antigénica. En este ensayo se cargaron células esplénicas enriquecidas en CD11c⁺ de ratones C57BL/B6 con concentraciones crecientes de c-TXNPx, c-TXNPxC52S y Mock. Al día siguiente se co-cultivaron con esplenocitos provenientes de los animales OT-II y al cabo de 5 días se colectaron las células y se analizó la proliferación celular de linfocitos T CD4 mediante la desaparición de la sonda fluorescente CFSE.

Como se puede observar en la figura 4.30 A los esplenocitos proliferaron más frente a las células enriquecidas en CD11c⁺ cargadas con c-TXNPx, a partir de la concentración 1,2 μ g/mL. Esta diferencia se vuelve mayor frente a las concentraciones crecientes de c-TXNPx. Cabe destacar que los esplenocitos incubados con las células cargadas con c-TXNPxC52S, se comportan como los que fueron expuestos a las células cargadas con Mock en los que no se observó cambios en la proliferación pese al aumento en la concentración del antígeno.

Resumiendo, en este capítulo se presentaron los principales resultados acerca del rol de las células CD11c⁺, como células presentadoras de antígenos, en la capacidad de expandir respuestas T analizada a través de la secreción de IFN- γ . Se pudo determinar que c-TXNPx favorece la expansión de la respuesta T específica y que favorece la presentación antigénica en un modelo de presentación antigénica como es la ovoalbúmina frente a linfocitos T específicos (provenientes de ratones OT-II).

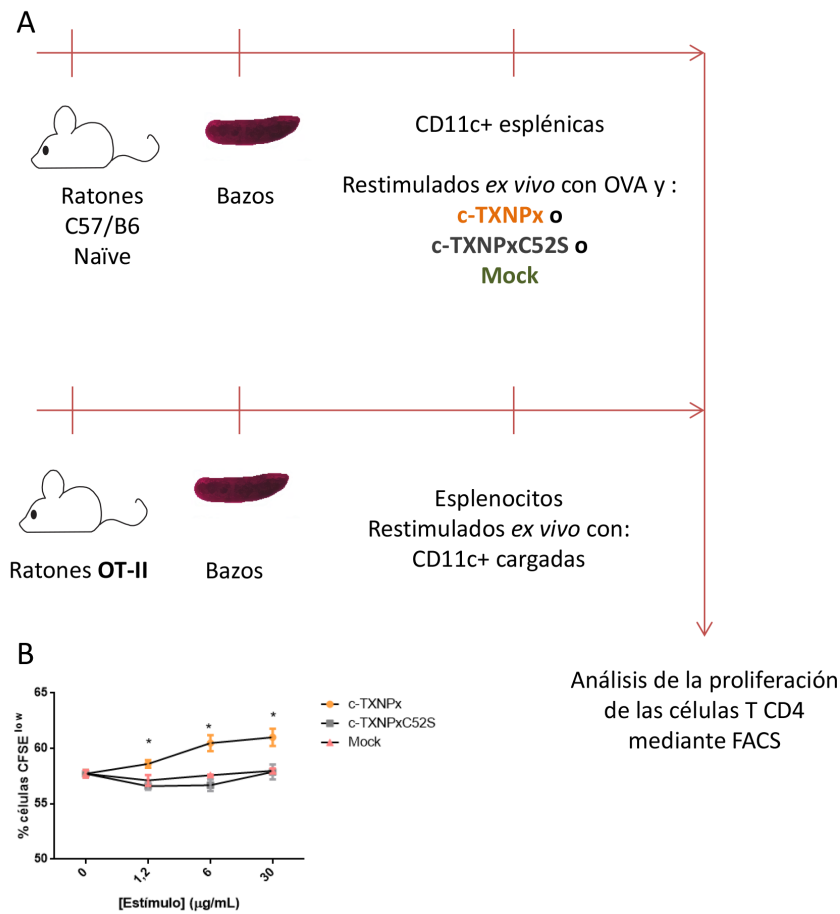


Figura 4.30: Proliferación de esplenocitos provenientes de ratones OT-II cultivados en presencia de células enriquecidas en CD11c⁺ cargadas con las proteínas. A) Esquema del diseño experimental. B) Proliferación celular analizada como porcentaje de células CFSE^{low}. En una primera instancia se obtuvieron células esplénicas enriquecidas en células CD11c⁺, se cargaron con los antígenos c-TXNPx, c-TXNPxC52S o Mock. Al día siguiente, se co-incubaron estas células con esplenocitos provenientes de animales OT-II. Luego de 5 días se colectaron las células y se analizó la proliferación celular mediante citometría de flujo. (*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de dos vías).

4.4. Respuesta humoral inducida por las proteínas

En este capítulo se muestran los principales resultados obtenidos del análisis de la respuesta humoral específica en ratones luego de las inoculaciones con c-TXNPx, c-TXNPxC52S y Mock en PBS como vehículo. Los animales

recibieron 7 inoculaciones espaciadas de dos días. El suero fue colectado dos días luego de la última inoculación y la titulación de anticuerpos se realizó mediante ELISA. Se analizaron los títulos de anticuerpos específicos α -c-TXNPx. Las clases e isotipos analizados fueron IgM, IgG, IgG1 e IgG2a.

4.4.1. Respuesta humoral específica

En la figura 4.31, se puede observar que tanto los animales inoculados con c-TXNPx como con c-TXNPxC52S mostraron la presencia de anticuerpos específicos con respecto a los controles, para todas las clases y los isotipos analizados. Los resultados se presentan como logaritmo del título de anticuerpos para los grupos analizados.

En particular, se pudo observar que tanto la c-TXNPx como la c-TXNPxC52S indujeron anticuerpos específicos. Sin embargo, el título de anticuerpos de isotipo IgM fue bajo, en relación al de IgG (Fig N A y B respectivamente). Es de destacar que la diferencia con el grupo control (mock) fue estadísticamente significativa, en un test de ANOVA de una vía con pos hoc de Tukey ($p < 0,05$, $N=15$). Por otro lado, los niveles de anticuerpos específicos de isotipo IgM e IgG no variaron cuando los animales fueron inmunizados con c-TXNPx o c-TXNPxC52S, sugiriendo que la actividad peroxidasa no es necesaria para la inducción de anticuerpos específicos. Esta misma observación se evidenció para las subclases IgG1 e IgG2a (Figura 4.31 C y D).

Por otra parte, se calculó la relación entre el título de las clases IgG e IgM, y entre los isotipos IgG1 e IgG2a con el fin de analizar el cambio de clase (de IgM a IgG) y la respuesta humoral asociada a Th1 (asociada a anticuerpos de isotipos IgG2a) o Th2 (asociada a IgG1).

En la figura 4.32 A se puede observar que con respecto a la relación IgG e IgM no existen diferencias entre los grupos; sin embargo, para ambos grupos la relación es mayor a 1, lo que muestra que existió un cambio de clase.

Con respecto a la relación entre los isotipos de la clase IgG (IgG1 e IgG2a), se pudo observar que no existen diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, esta relación es mayor a 1 lo que sugiere que la respuesta humoral encontrada responde a una respuesta inmune adaptativa asociada a células T colaboradoras 2.

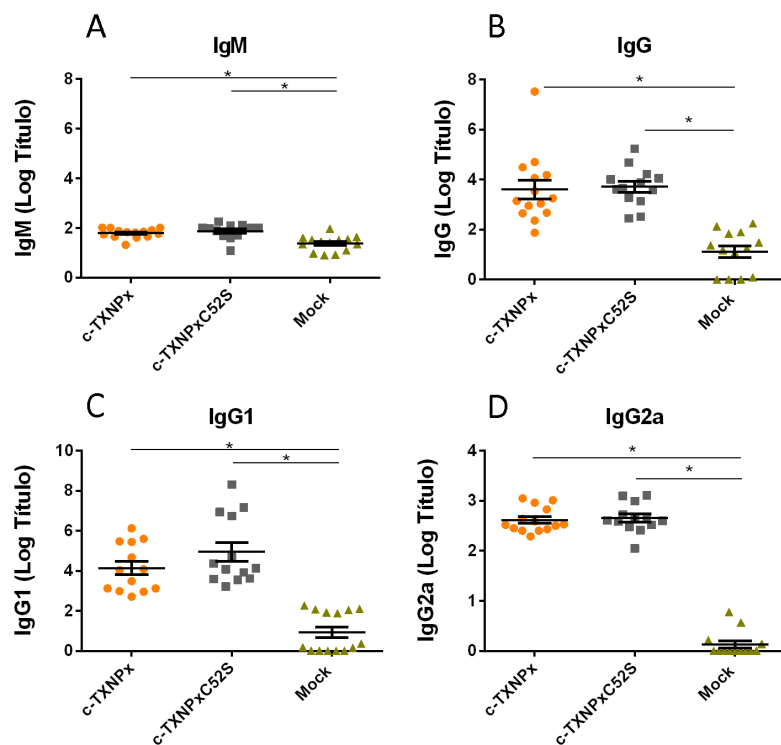


Figura 4.31: Respuesta humoral específica obtenida en sueros de animales inoculados. A) IgM. B) IgG. C) IgG1 D) IgG2a. Los animales recibieron 7 inoculaciones intraperitoneales con 20 μ g de proteínas o el volumen equivalente de Mock en PBS. Luego de dos días de la última inoculación se obtuvo suero y mediante ELISA se cuantificó el título de anticuerpos. Se utilizaron anticuerpos secundarios que reconocen los isotipos analizados.(*) $p < 0,05$ en un test de ANOVA de una vía con *post hoc* de Tukey.

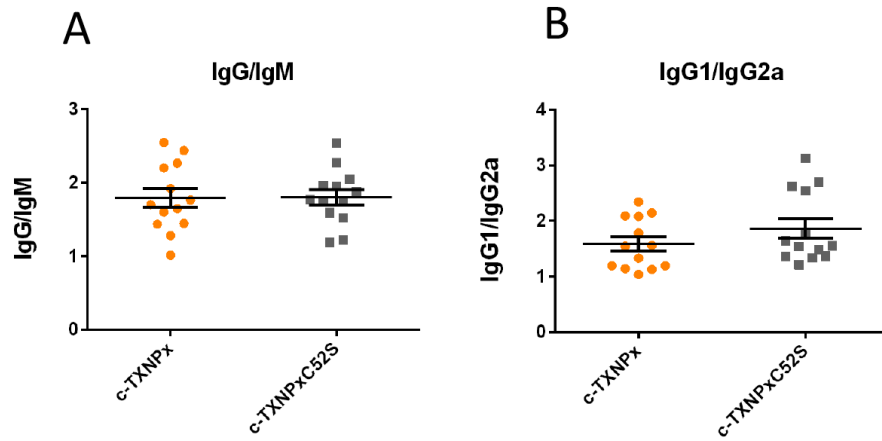


Figura 4.32: Relación entre las clases IgG e IgM y entre los isotipos IgG1 e IgG2a. Los animales recibieron 7 inoculaciones intraperitoneales con 20 μ g de proteínas o el volumen equivalente de Mock en PBS. Luego de dos días de la última inoculación se obtuvo suero y mediante ELISA se cuantificó el título de anticuerpos. Se utilizaron anticuerpos secundarios que reconocen los isotipos analizados.

Capítulo 5

Discusión

En este trabajo se buscó abordar el estudio de algunas características bioquímicas y propiedades inmunológicas de la triparedoxina peroxidasa citosólica (c-TXNPx) de *T. cruzi* realizando una comparación con una proteína mutante para determinar la participación de la actividad peroxidasa en algunas de estas propiedades.

En este capítulo se discuten los resultados mostrados en el apartado anterior mediante el análisis de los mismos y la exposición de trabajos realizados por otros investigadores.

5.1. Caracterización de c-TXNPx y su mutante inactiva c-TXNPxC52S

5.1.1. Producción de las proteínas y remoción de endotoxinas

Los estudios bioquímicos sobre las proteínas salvaje y mutante de c-TXNPx realizados en esta tesis demostraron que ambas proteínas presentan diferencias bioquímicas más allá de la actividad enzimática. En una primera instancia se pudo constatar que ambas proteínas presentan estructuras oligoméricas de varios tamaños, en donde se destacan el dímero, decámero y oligómeros de alto peso molecular para ambas proteínas. A su vez, se observó que dichas estructuras persisten incluso en presencia de DTT lo que evidenció que los puentes disulfuro no son las únicas fuerzas responsables en la formación de la estructura cuaternaria de la proteína. Este punto se discutirá más abajo. Esta

observación fue reportada por Piñeyro y colaboradores cuando las proteínas fueron clonadas y expresadas en bacterias *E. coli* XL1 Blue Piñeyro et al. (2011).

Cabe destacar que ambas proteínas se expresaron de forma nativa en el sistema heterólogo *Clear coli*TM. En este trabajo se planteaba estudiar el rol que podría tener una molécula proveniente del parásito sobre el sistema inmune del hospedero, para este objetivo era fundamental que la enzima estuviera en forma nativa, con actividad enzimática. Estudios realizados por la Dra. Piñeyro en el laboratorio mostraron que pese a que la proteína poseía una cola de histidinas, esta no afecta la actividad peroxidasa de c-TXNPx (Datos no publicados). Esta evidencia sugiere que el sistema elegido en una primera instancia resultó acertado para la producción de las proteínas.

Por otra parte, la elección del sistema de expresión de proteínas ofrecía, al comienzo de este trabajo, la posibilidad de obtención de las proteínas virtualmente libre de endotoxinas bacterianas. Este es un punto de gran interés a la hora de evaluar la respuesta inmune que genera una proteína que es expresada en bacterias; ya que el investigador puede estudiar la respuesta que genera la molécula de interés, sin las interferencias de la unión del LPS al TLR4 y la respuesta corriente abajo que se genera. Existen varios métodos descritos para la remoción de las endotoxinas de las proteínas expresadas en bacterias; sin embargo, algunos llevan a la pérdida de proteína durante el proceso, disminuyendo el rendimiento final. Dado que las bacterias *C. coli* poseen mutaciones para las enzimas que participan en el ensamblaje del LPS, esta cepa posee Lípido IV_A en su membrana externa Mamat et al. (2008). Dicha molécula es reconocida por el ensayo de LAL utilizado para la cuantificación de endotoxinas; sin embargo, fue reportado que no producía la activación la vía de NF- κ B en células HEK Mamat et al. (2013), lo que permitía obtener las proteínas virtualmente libre de endotoxinas. En base a esta evidencia se seleccionó dicha cepa para la expresión y producción de las proteínas recombinantes. No obstante, durante el desarrollo de este trabajo se publicó un artículo mostrando que el Lípido IV_A no resultaba inocuo para el TLR4 murino, como estaba reportado para el TLR4 humano, canino y equino Scior et al. (2013). Un estudio posterior mostró la capacidad de dicha molécula de unirse con el TLR4 murino y activar la vía MyD88-dependiente que desencadenó, conduciendo a la activación NF- κ B, la producción de citoquinas proinflamatorias; sin embargo, se reportó como ineficiente a la hora de activar la vía MyD88-independiente

[Ogura et al. \(2013\)](#). A su vez, un estudio computacional abordó el análisis de los aminoácidos presentes en el TLR4 murino responsable de la unión del lípido IV_A a dicho receptor y que están ausentes en los receptores de humanos, de perros o caballos [Scior et al. \(2013\)](#).

Frente a este escenario, se optó por utilizar dos métodos de remoción de endotoxinas. En este sentido, se interrogaron las columnas de afinidad de polimixina B y el Tritón X-114. El primero, es ampliamente utilizado en la bibliografía y es uno de los métodos sugeridos por la FDA, la OMS y la Farmacopea Europea [Eu Pharamacopoeia \(2010\)](#) [Food and Drugs Administration \(2012\)](#) [World Health Organization \(2012\)](#). El primer método, se basa en la remoción de endotoxinas a través de interacciones iónicas de largo alcance y de interacciones hidrofóbicas de corto alcance [Vesentini et al. \(2010\)](#), entre el LPS y la polimixina B. El segundo, fue descrito por Aida y colaboradores y se basa en la formación de micelas del detergente Tritón X-114, en las que las moléculas de LPS quedan retenidas dentro de estas; allí las moléculas de LPS interactúan mediante uniones hidrofóbicas con las porciones hidrofóbicas la molécula del detergente [Aida & Pabst \(1990\)](#).

Luego de la remoción de endotoxinas con ambos métodos, se procedió al análisis de la eficiencia de estos. Para ello, se utilizó el método de LAL sugerido la FDA, la OMS y la Farmacopea Europea [Eu Pharamacopoeia \(2010\)](#) [Food and Drugs Administration \(2012\)](#) [World Health Organization \(2012\)](#), para la cuantificación de endotoxinas en preparaciones proteicas para inyectar. Es de destacar que este método de cuantificación no permite discriminar entre el lípido IV_A y el LPS, por lo que lo cuantificado se correspondió con lípido IVA, dado la cepa de bacterias que se utilizó. Este ensayo mostró que las columnas de polimixina B fueron más eficientes en la remoción que el tritón X-114. Según este ensayo c-TXNPx presentó alrededor de 12 UE en el volumen que se inyectó en los ratones, y tanto c-TXNPxC52S como el control Mock presentaron valores inferiores a 1 UE. En este contexto, es importante resaltar que ambas proteínas y el control fueron expuestos a los mismos protocolos para su obtención y para la remoción de endotoxinas. Este resultado evidencia una diferencia entre la proteína salvaje y la mutante, y esta diferencia se podría deber principalmente a dos razones: la primera, c-TXNPx podría unir moléculas de lípido IV_A y los métodos de remoción resultaron insuficientes a la hora de desestabilizar dicha interacción; y la segunda, c-TXNPx podría interferir en el ensayo de cuantificación mediante el kit de LAL. En este sentido, han

sido reportados algunos compuestos que pueden interferir en dicho ensayo, un ejemplo de ellos son los 1-3 β glucanos quienes han sido reportados como interferentes [Incorporated \(2011\)](#). Es por esta última hipótesis que nos inclinamos ya que discutimos a continuación.

En la actualidad, no se conoce con certeza cuáles son las moléculas presentes en el lisado que conducen a la escisión proteolítica que genera la p-nitroanilina producto del ensayo de LAL que se cuantifica mediante absorbancia en el kit LAL. En este sentido, alguna de las moléculas involucradas en la cadena de respuesta frente a las endotoxinas podría ser el sustrato de la actividad de la c-TXNPx y de esta manera actuar como potenciador del ensayo. Esta hipótesis surge en el marco de las diferencias encontradas, en el valor de endotoxinas, entre la proteína salvaje y mutante. Para poder elucidar si lo detectado por este método se correspondió con lípido IV_A o si fueron interferencias en el ensayo, se podría realizar un ensayo de western blot; en donde, se realice un inmunoensayo con anticuerpos que reconozcan el lípido IV_A. Esta segunda hipótesis resulta, *a priori*, más probable que la primera ya que ambas proteínas comparten su secuencia con una cisteína diferencia; y por lo tanto, podríamos inferir que poseen estructuras similares y si existiera una interacción entre el LPS y las proteínas estas diferencias no deberían afectar.

De forma complementaria, la remoción de endotoxinas en las proteínas y en el Mock también fue evaluada mediante la activación de macrófagos murinos de la línea RAW 264.7. Cabe recordar que en este ensayo se incubaron macrófagos, de la línea antes mencionada, con c-TXNPx expresada en *E. coli*, y en *C. coli*, y que en el caso de esta última se la sometió a los dos métodos de remoción de endotoxinas que se deseaba analizar. Mediante este ensayo se pudo determinar que las proteínas sometidas ambos métodos de remoción, redujeron la producción de citoquinas pro-inflamatorias y el aumento de la producción de IL-10, con respecto a la proteína expresada en *E. coli* y **C. coli**. Este ensayo permitió evidenciar que los métodos de remoción fueron efectivos, ya que permitieron una reducción de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y un aumento de las anti-inflamatorias.

Estos resultados en su conjunto validan la necesidad de utilizar un método de remoción de endotoxinas y evidencian que las columnas de polimixina B fueron eficientes en la remoción de endotoxinas. De forma complementaria, el valor reportado de UE presentes en c-TXNPx se encuentra por debajo de lo reportado por Malyala y colaboradores para productos inyectables en ratones,

por lo que permite el uso de esta proteína en los ensayos inmunológicos [Malyala & Singh \(2008\)](#).

5.1.2. Análisis del estado de oligomerización de las proteínas

Los estudios de cromatografía de exclusión molecular de ambas proteínas, salvaje y mutante mostraron diferencias con respecto al estado de oligomerización de ambas proteínas.

Estos cambios se evidenciaron por diferencias en el volumen de elución en una cromatografía de exclusión molecular, se observó que c-TXNPx presenta dos formas predominantes que se corresponden con agregados de alto peso molecular (694 kDa), y con una estructura de 350 kDa que se corresponde con una estructura de mayor peso que el decámero. Sin embargo, c-TXNPxC52S presentó agregados de alto molecular y un decámero, lo que indica que c-TXNPx se presenta en su totalidad como estructuras de mayor tamaño que el decámero y c-TXNPxC52S se presenta como población variada de oligómeros y decámeros.

Si bien una gran cantidad de investigaciones han abordado los principios y funciones de la oligomerización de distintos miembros de la familia de las peroxirredoxinas [Jang et al. \(2004\)](#) [Jang et al. \(2006\)](#) [Perkins et al. \(2014\)](#) [Toledano & Huang \(2016\)](#), la comprensión de los diversos roles *in vivo* de estos cambios conformacionales está emergiendo lentamente. Las asociaciones proteína-proteína, en particular, la formación de complejos proteicos permanentes o transitorios, son esenciales para la funcionalidad y regulación de proteínas dentro del contexto celular. Las peroxirredoxinas sufren importantes cambios conformacionales dependientes de su estado redox y estos están vinculados a cambios en las funciones de estas enzimas [Barranco-Medina et al. \(2009\)](#). Algunas de las nuevas funciones que se les han atribuido a las peroxirredoxinas son regulación de la expresión génica, sensores redox, actividad chaperona, participación en la inflamación, en la apoptosis y estar vinculadas a efectos anticáncer (Ishii, Warabi, and Yanagawa 2012).

Los datos revisados indican que la capacidad para realizar cambios conformacionales de las 2-CysPrx típicas, de origen eucariótico y procariótico, está altamente conservado [Barranco-Medina et al. \(2009\)](#). Y estos cambios conformacionales se han atribuido, principalmente, a cambios en el estado de

oxidación de la C_P [Wood, Z. A. et al. \(2003\)](#). La susceptibilidad a la sobreoxidación en 2-Cys Prxs se relaciona con dos motivos estructurales presente en la porción C-terminal, caracterizados por la presencia de los aminoácidos “GGLG”, en el primero y un segundo con un dominio “YF”. Este dominio está presente en eucariotas pero no en enzimas procariotas, por lo que las peroxirredoxinas de procariotas se denominan resistentes a la sobreoxidación. Esta secuencia provoca un enlentecimiento de la reacción entre la C_R y el derivado cisteína sulfénico de la C_P , permitiendo así que esta cisteína reaccione con una segunda molécula de sustrato y permitiendo la sobreoxidación de este residuo [Wood, Z. A. et al. \(2003\)](#). Cuando la C_P se encuentra en estado sobreoxidado esta no puede reaccionar con la C_R y de esta manera la enzima queda inactiva como peroxidasa. La sobreoxidación de este residuo induce la oligomerización y lleva a la formación de oligómeros de alto peso molecular, quienes adoptan la función chaperona [Barranco-Medina et al. \(2009\)](#), para el caso de las peroxirredoxinas humanas, de plantas, de levaduras y de parásitos.

El dominio descrito anteriormente se encuentra presente en la c-TXNPx de *T. cruzi* salvaje y mutante usados en este trabajo; sin embargo, sólo la enzima salvaje presenta la C_P . Por lo tanto, sólo la enzima salvaje es susceptible a la sobreoxidación de dicho residuo. En este sentido, cuando se estudió la sobreoxidación mediante western blot se observó que sólo una pequeña proporción de la enzima se encontraba sobreoxidada, por lo tanto, este mecanismo resulta insuficiente para explicar los resultados encontrados en la cromatografía de exclusión molecular. En donde, se observó que un 49 % de la enzima se encontraba como HMW y un 52 % se encontraba como estructuras de mayor tamaño que el decámero. Es de destacar que estos resultados concuerdan con los reportados por Piñeyro cuando ensayó c-TXNPx en estado oxidado. La autora observó que la proteína analizada mediante cromatografía de exclusión molecular eluía como dos picos que se correspondían con HMW y con una estructura de mayor peso que el decámero [Piñeyro et al. \(2005\)](#). De forma complementaria, Piñeyro observó mediante *Dynamic light scattering* que este último pico presentaba mayor radio que el observado para el decámero [Piñeyro et al. \(2005\)](#). Por lo tanto, en base a lo observado en este trabajo y a lo reportado por Piñeyro y colaboradores se podría proponer que la enzima se encontraba en estado oxidado previo a los ensayos inmunológicos.

Con respecto al estado de oligomerización de la proteína mutante, se parece a la proteína salvaje reducida que presenta una forma decámerica aunque no

es susceptible a sobreoxidación porque no posee la C_P . No obstante, esta proteína también presentó HMW según los resultados obtenidos en el estudio de oligomerización mediante cromatografía de exclusión molecular. De estos resultados resulta evidente que existen otras fuerzas implicadas en la formación de HMW para estas proteínas más allá de la sobreoxidación de la C_P .

Como se mencionó previamente, cuando las proteínas fueron analizadas en presencia o ausencia de DTT, en electroforesis con geles desnaturalizantes, se observaron cambios en la proporción de las estructuras oligoméricas. Mediante este ensayo se evidenció que tampoco los puentes disulfuro son suficientes para explicar en su totalidad la estructura cuaternaria de las proteínas estudiadas. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en este trabajo y la bibliografía consultada es posible proponer que la estructura cuaternaria de estas proteínas se encuentra estabilizada por puentes disulfuro, por el estado redox de la C_P y por otras fuerzas débiles como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, hidrofóbicas o interacciones de *Van der Waals* [Piñeyro et al. \(2005\)](#).

En esta línea, la revisión de la bibliografía evidenció otros mecanismos implicados en la formación de HMW. En este sentido, la presencia de molibdato de amonio, polietilenglicol, altas temperaturas, cambios de pH, presencia de oxígeno, la fuerza iónica o modificaciones post-traduccionales de determinados residuos pueden favorecer también la formación de HMW en distintos miembros de la familia de las peroxirredoxinas [Barranco-Medina et al. \(2009\)](#). Para el caso particular de la peroxirredoxina I humana se observó que la fosforilación de la treonina 90 [Jang et al. \(2006\)](#) y la glutationilación del residuo 83 [Park et al. \(2011\)](#) o S-nitrosilación del residuo 52 [Engelman et al. \(2013\)](#), resultaron esenciales para la formación de HMW. Por su parte, la triparredoxina peroxidasa mitocondrial de *Leishmania braziliensis* (un tripanosomátido al igual que *T. cruzi*), es susceptible a cambios en su oligomerización frente a cambios de pH. El equilibrio dímero-decámero de esta enzima es altamente sensible a pequeñas variaciones de pH en el rango fisiológico (entre pH 7 y 8), sugiriendo que un grupo disociable con un valor de pKa en este intervalo de pH afecta el equilibrio entre los dos estados oligoméricos [Morais et al. \(2015\)](#). Los resultados de estos investigadores muestran que la acidificación estabiliza las formas decámericas [Morais et al. \(2015\)](#).

Estos resultados aportan evidencia de gran interés para este trabajo ya que las proteínas pudieron estar expuestas a variaciones de pH dentro de las células del sistema inmune, por ejemplo, dentro de macrófagos. [Morais y cola-](#)

boradores propusieron que el efecto del pH sobre la oligomerización de 2-Cys Prxs de *L. braziliensis* apoya la hipótesis de que el pH intracelular afecta los mecanismos que controlan la concentración celular de especies reactivas del oxígeno. Los cambios en el estado oligomérico de estas enzimas influyen tanto en la actividad de la peroxidasa como en la chaperona. La forma decamérica estabiliza la conformación FF requerida para el ataque nucleofílico del tiolato de la C_P sobre el sustrato de peróxido, produciendo la sulfenilación (C_P -SOH) y eventualmente la sobreoxidación de C_P [Morais et al. \(2015\)](#). Para el caso de la enzima de *L. braziliensis*, este fenómeno se asoció a un aumento de la susceptibilidad a la sobreoxidación, proceso que ha sido asociado a la actividad chaperona y que puede influir en las vías de señalización de H_2O_2 y la respuesta celular al estrés oxidativo. De esta manera, la evidencia presentada en este trabajo mostró que el pH intracelular modula no sólo la oligomerización de estas enzimas sino también su función.

En este sentido, las proteínas analizadas en esta tesis pudieron enfrentar cambios de pH una vez dentro de las células y responder de forma diferencial. A pesar de que no se han descrito en su totalidad los mecanismos implicados en la formación de HMW y del cambio de actividad enzimática para c-TXNPx, se podría pensar que c-TXNPx pudo responder de forma diferencial a c-TXNPxC52S a estas variaciones de pH, dado que la enzima salvaje presenta su C_P y no así la mutante. Siendo la C_P susceptible a otros cambios conformacionales producto de la sobreoxidación de dicho residuo en el macrófago, lugar donde la producción de especies reactivas del oxígeno se producen como parte de la respuesta inmune innata.

5.1.3. Rol de la actividad enzimática de c-TXNPx y c-TXNPxC52S

Se estudió mediante ensayo acoplado la actividad enzimática. Los resultados mostraron que la enzima era activa y que los métodos de remoción de endotoxinas no afectaron dicha actividad en la proteína salvaje debido a que no alteraron su capacidad de reducir H_2O_2 . Este resultado permitió avalar el uso de los mismos para la remoción de las endotoxinas de las preparaciones ya que la proteína continuó siendo activa después de estos.

La diferencia principal entre las dos proteínas es su actividad peroxidasa, el uso de un mutante inactivo permitió estudiar el rol de la misma en la generación

de la respuesta en las células de mamíferos.

Cabe recordar que la sobreexpresión de c-TXNPx en *T. cruzi* produce un aumento en la infectividad de los parásitos y no así c-TXNPxC52S, sugiriendo que la enzima salvaje constituye un factor de virulencia que le confiere una ventaja al parásito y esta está asociada a la actividad peroxidasa [Piacenza et al. \(2008\)](#).

Existe evidencia acerca del rol del H_2O_2 como molécula de señalización; en donde la presencia de dicha molécula podría estar modulando la actividad de c-TXNPx, pero también de otras enzimas cuyas funciones también sean susceptibles a esta molécula [Poole \(2007\)](#). En este sentido, la reducción de H_2O_2 o peroxinitrito por parte de c-TXNPx podría modificar los niveles de estas moléculas en las células del sistema inmune mamífero y así modular la función de las peroxirredoxinas del mamífero alterando su actividad peroxidasa o inhibiendo su cambio a la actividad chaperona.

Por otra parte, resultados recientemente obtenidos en el laboratorio por parte de la Dra. Piñeyro mostraron que no existen diferencias significativas en la actividad chaperona de la proteína salvaje y mutante en la C_P . En estos ensayos, la actividad chaperona fue evaluada mediante la prevención de la agregación térmica de la malato deshidrogenasa (Datos no publicados). La autora encuentra una asociación entre la actividad chaperona y la formación de HMW, Sin embargo, el decámero también presenta dicha actividad enzimática (Datos no publicados).

A modo de conclusión, ambas enzimas se expresaron de forma nativa en el sistema heterólogo y los métodos de remoción de endotoxinas fueron eficientes en su cometido. Además, la proteína salvaje presentó una pequeña proporción en estado sobreoxidado, evidenciado mediante western blot con un anticuerpo α -SOOH. A su vez, el estudio de la oligomerización de las proteínas mostró diferencias en la estructura cuaternaria de ambas. Estos resultados permitieron postular que c-TXNPx se encontraba en estado oxidado luego de la purificación y de la remoción de endotoxinas lo que evidencia una diferencia con c-TXNPxC52S quien carece del residuo reactivo.

En base a estos resultados, se podría postular que las diferencias observadas en la respuesta inmune generada por la proteína salvaje y la mutante pueden estar asociadas a la regulación de las concentraciones de los sustratos de la enzima quienes pueden modular la

función de otras enzimas, y a la regulación de los cambios conformacionales asociados a la sobreoxidación de la C_P .

5.2. Propiedades inmunomoduladoras de c-TXNPx y c-TXNPxC52S

5.2.1. Propiedades inmunomoduladoras de las proteínas sobre células dendríticas y macrófagos

Para el estudio de la respuesta generada sobre células innatas APC se utilizó células esplénicas sometidas a un enriquecimiento en células $CD11c^+$. Los resultados obtenidos evidenciaron una respuesta de tipo proinflamatoria, cuando las células fueron incubadas con c-TXNPx. Esta respuesta se caracterizó por un aumento de la expresión de MHCII y de moléculas co-estimuladoras como CD40 y CD80 en la superficie, así como un aumento en la secreción de interleucinas IL-6 e IL-12 en el sobrenadante de cultivos.

Las CDs inmaduras expresan bajos niveles de MHCII y de las moléculas co-estimuladoras en su superficie. Sin embargo, cuando estas células se enfrentan a PAMPs estas maduran cambiando su fenotipo y permitiendo la presentación de antígenos a las células T [Iijima et al. \(2003\)](#). Las CDs maduras, quienes se pueden considerar como $CD11c^+$, $CD40^+$, $MHCII^+$ y $CD80^+$, son capaces de secretar IL-12 cuando el receptor de CD40 interactúa con su ligando y de esta manera polarizan la respuesta T hacia una respuesta de tipo Th1 [Iijima et al. \(2003\)](#). Ha sido previamente reportado en la bibliografía que CDs incubadas con distintas cepas de *T. cruzi* presentan un incremento de CD40, CD80 y MHCII, entre otras, en su superficie [Poveda et al. \(2014\)](#). Además, se ha observado que ratones resistentes a la infección sobre-expresan IL-12 y ratones susceptibles presentan mayores niveles de IL-10 [Planelles et al. \(2003\)](#). A su vez, ha sido demostrado que la incubación de CDs con PAMPs de *T. cruzi* conducen a la maduración de CDs y a la producción de IL-12, favoreciendo la diferenciación de células Th precursoras hacia el fenotipo Th1 con posterior producción de $IFN-\gamma$ [Bafica et al. \(2006a\)](#) [Bartholomeu et al. \(2008\)](#). Estos resultados descritos en el contexto de la infección están en concordancia a los observados en este trabajo; a pesar de que se analizó la respuesta frente a una molécula específica del parásito. En este sentido los resultados de este

trabajo aportan evidencia de que la c-TXNPx posee un efecto pro-inflamatorio y sugiere, junto con el hecho de que es una proteína secretada [Gadelha et al. \(2013\)](#) [Chiribao \(2016\)](#), que podría estar involucrada en la polarización hacia un fenotipo Th1.

El mecanismo descrito como responsable de la producción de IL-12 (por parte de las CDs en el contexto de la infección por *T. cruzi*), ha sido la activación del TLR2 y TLR9. Estos receptores se han asociado a la activación por parte de proteínas con anclaje a GPI y por secuencias de ADN no metilado CpG, respectivamente [Bafica et al. \(2006b\)](#). Sin embargo, no ha sido reportado que c-TXNPx u otras Prxs sean capaces de interactuar con estos receptores. Por otra parte, sí se ha descrito que algunos miembros de esta familia puedan interactuar con el TLR4, como se reportó para la Prx de *Plasmodium berguei* [Robinson et al. \(2010\)](#).

Por su parte, la expresión de IL-6 ha sido asociada a la respuesta aguda frente a patógenos por parte de macrófagos y células dendríticas y su principal función es actuar sobre linfocitos en la respuesta aguda [Murphy et al. \(2017\)](#).

De manera interesante, la capacidad de la c-TXNPx de inducir IL-6 e IL-12 por las células CD11c⁺ no se observó por su versión mutante. Este resultado pone en evidencia una diferencia en el fenotipo que generaron ambas proteínas sobre las células CD11c⁺, mostrando que c-TXNPxC52S fue incapaz de generar una respuesta de tipo proinflamatoria en las células analizadas y que mostró un comportamiento similar al Mock o a las células sin estimular incubadas simplemente con medio de cultivos. Esta diferencia aporta indicios acerca del rol de la actividad peroxidasa o del estado de oligomerización de estas proteínas en la generación de la respuesta. Una hipótesis puede ser que, en caso de que haya interacción con un receptor innato (tipo TLR) la interacción puede estar modificada por un cambio en la oligomerización o en su estructura. Otra posibilidad es que las propiedades inmunes dependan del pH intracelular y como se describió previamente este factor podría alterar la oligomerización de las proteínas.

Algunos estudios han demostrado que las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas requieren diferentes polarizaciones de la respuesta inmune. Es así que la respuesta T Th1 ha sido descrita como protectora en un estado agudo y la respuesta T reguladora se han descrito como importantes para permitir la fase crónica [Andrade et al. \(2014\)](#) [Dutra et al. \(2014\)](#). En este contexto, las CDs son un grupo de células clave en la enfermedad de Chagas:

podrían modular la respuesta según el tipo, el nivel de maduración, la producción de citoquinas y las moléculas de superficie necesarias, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo de las formas clínicas de enfermedad incluida la etapa indeterminada [Gil-Jaramillo et al. \(2016\)](#).

El escenario de la infección es muy complejo, existen muchas moléculas tanto del parásito como del hospedero involucradas en la repuesta generada [Tarleton \(2007\)](#). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo con c-TXNPx permitieron disecar el rol que tiene una molécula del parásito sobre la respuesta en las CDs. Los resultados mostraron que esta enzima es capaz de generar un fenotipo proinflamatorio y maduro de las CDs; y que estas son capaces de secretar interleucinas proinflamatorias que podrían participar en la polarización de la respuesta T que permitiría el control de la infección. A su vez, se los resultados se puede inferir que esta respuesta es dependiente de la actividad peroxidasa.

De forma complementaria, se analizó la respuesta generada por las proteínas en un modelo *in vivo* en ratones. Para ello ratones BALB/c recibieron 7 inoculaciones intraperitoneales con 20 μ g de proteína o el volumen equivalente de Mock. Se observó un reclutamiento de células CD11c⁺ y F4/80⁺ en la cavidad peritoneal de los animales inoculados con ambas proteínas. No obstante, el porcentaje de ambas poblaciones varió según la proteína que recibieron. En este sentido, los animales inoculados con c-TXNPx mostraron una tendencia a un mayor porcentaje de células CD11c⁺ (p valor 0,07 en un t-test); y los inoculados con c-TXNPxC52S presentaron mayor porcentaje de células F4/80⁺ en la cavidad peritoneal. Estos resultados muestran que ambas proteínas son capaces de generar una respuesta a nivel local y que son capaces de desencadenar una respuesta que involucra el reclutamiento de células CD11c⁺ F4/80⁻ y F4/80⁺ CD11c⁻ que podrían corresponder a células dendríticas y macrófagos.

A continuación, se analizó el fenotipo de las células CD11c⁺ y F4/80⁺. En este sentido, se observó que las células CD11c⁺ provenientes de los animales inoculados con c-TXNPx expresan CD40, MHCII y CD4 en su superficie y presentan una disminución de Ly6C, Ly6G, CD8 y no expresan CD68. Estos resultados sugieren que estas células son células dendríticas ya que presentan marcadores de superficie típicos de esta población, y presentan una disminución de marcadores de superficie de macrófagos o neutrófilos como son Ly6C, Ly6G y CD68.

Con respecto al grupo inoculado con c-TXNPxC52S se observaron células

CD11c⁺, que a diferencia de los animales que recibieron la proteína salvaje, estas células expresan Ly6C, Ly6G y CD8. Comparten con los animales que recibieron la proteína salvaje el aumento de la expresión de MHCII.

Además, el análisis de las citoquinas que expresan las células CD11c⁺ mostró que los animales inoculados con c-TXNPx presentan mayores niveles de IL-12 con respecto mientras que no se observaron diferencias significativas al ser inoculados con la proteína mutante. Estos resultados reproducen *in vivo* la capacidad de las células dendríticas en producir IL-12 al ser incubadas con la proteína salvaje *in vitro*.

La revisión bibliográfica mostró que no hay reportes de la respuesta generada en células dendríticas por parte de la triparredoxinas peroxidadas; no obstante, la secreción de IL-12 por parte de APCs ha sido reportada en el contexto de la infección por *T. cruzi* [Bafica et al. \(2006a\)](#) [Campos et al. \(2004\)](#). Este fenómeno fue revisado por Tarleton, en donde se describe que células dendríticas son capaces de secretar esta interleucina frente a la infección y que esta secreción es dependiente de los receptores TLRs [Tarleton \(2007\)](#).

Cabe destacar que el escenario encontrado en los ensayos *in vitro* con las células esplénicas enriquecidas en células CD11c⁺ presentan algunas diferencias con los obtenidos en los ensayos *in vivo*. En este sentido, las células no presentan un aumento significativo de la expresión de CD40 y CD80 en los ratones inoculados aunque se reprodujo el aumento de la expresión de MHCII. Estos resultados podrían sugerir que el escenario *in vivo* es más complejo que el disecado *in vitro*, evidenciando la presencia de otras poblaciones celulares en la cavidad peritoneal. Las células que expresan las moléculas co-estimuladoras CD40 y CD80 podrían migrar al ganglio drenante y no encontrarse en la cavidad peritoneal al momento de su recolección. Sin embargo, el perfil de respuesta pro-inflamatorio que se obtiene va en la línea de lo reportado *in vitro*.

A su vez, en los animales inoculados con c-TXNPx se observó un reclutamiento de células F4/80⁺ con respecto al grupo control; sin embargo, el único marcador que expresaron de forma diferencial con respecto al control fue MHCII. Estos resultados fueron complementados con la detección de mayores niveles de IL-12 en estos animales.

De forma complementaria, se analizó la población de células que es F4/80⁺ Ly6G⁺, Ly6C⁺, MHCII⁺ y CD80⁺ se observó con mayor frecuencia en los animales inoculados con c-TXNPxC52S. En este sentido, esta población es superior que con respecto a los animales que recibieron la proteína salvaje o el

Mock. Estos resultados sugieren que esta población podrían ser macrófagos y/o neutrófilos que fueron reclutados en la cavidad peritoneal de los animales luego de las inoculaciones con c-TXNPxC52S.

En este sentido, la búsqueda bibliográfica arrojó mayores resultados acerca de la respuesta generada en macrófagos por parte de la Prx1. Es así que trabajos con la enzima de *F. hepatica* o *Schistosoma mansoni* mostraron que se generaron macrófagos alternativamente activados en presencia de la proteína, cuando fue inyectada en ratones BALB/c [Donnelly et al. \(2008\)](#). En este trabajo, los investigadores reportan la secreción de IL-10 por parte de los macrófagos como consecuencia de la presencia de la proteína. A su vez, discuten que este fenotipo generado en los macrófagos es concordante con la respuesta de células T de tipo Th2 que encuentran en ratones [Donnelly et al. \(2008\)](#). Este escenario continúa en la línea de la respuesta inmune que generan muchos helmintos que generalmente es de tipo Th2. Con respecto a la Prx1 humana secretada por tumores, se observó que es capaz de interactuar con el TLR4 humano de macrófagos desencadenando la secreción de IL-6 de forma dependiente de MyD88 [Riddell et al. \(2010\)](#). En este mismo sentido, la Prx2 de *Plasmodium falciparum* mostró también la capacidad de unirse al TLR4 humano en macrófagos y de desencadenar una respuesta pro-inflamatoria con secreción de IL-12 y TNF- α [Kawazu et al. \(2001\)](#).

En esta tesis, sin embargo, se evidenció que la respuesta generada por estas células es de tipo pro-inflamatoria y que dicha respuesta depende de la actividad peroxidasa, ya que la proteína salvaje y la mutante provocan el reclutamiento de poblaciones diferentes.

5.2.2. Caracterización de la respuesta T inducida por las proteínas

Continuando con el estudio de la respuesta generada por parte de c-TXNPx y el rol de la actividad peroxidasa en dicha respuesta fue que se analizó la respuesta de las células T. Se observó que no existen diferencias en las poblaciones presentes en los bazo de los animales inoculados entre los que recibieron las proteínas o el control Mock; y que no se genera una respuesta de linfocitos T reguladores, frente a las inyecciones con las proteínas. Sin embargo, se observó una tendencia en la producción de citoquinas que sugiere, aunque no significativa, una mayor producción de IFN- γ en las células T CD4⁺ de los

animales que recibieron la proteína salvaje.

De forma complementaria, se analizó la proliferación de los esplenocitos de los animales inoculados frente a estímulos policlonales y específicos. Estos resultados mostraron diferencias entre las proteínas frente al estímulo policlonal *ex vivo*, evidenciando una disminución en la proliferación, tanto de linfocitos T CD4⁺ como T CD8⁺, provenientes de los animales inoculados con c-TXNPxC52S.

Con respecto a la capacidad de proliferar frente al estímulo específico, es decir, frente c-TXNPx y mutante para las células provenientes de los animales inoculados con sus respectivas proteínas. Se observó que c-TXNPx generó un aumento en la proliferación de las células T CD4⁺ y T CD8⁺ con respecto al control, acompañada de un aumento en la secreción de IFN- γ . La mencionada respuesta no fue obtenida en las células provenientes de los animales inoculados con la proteína mutante, ni se detectó producción de IFN- γ en los esplenocitos totales.

Estos resultados sugieren que c-TXNPx generó una respuesta T CD4⁺ de tipo Th1 y una respuesta T CD8⁺ específica. Sin embargo, los resultados sugieren la posibilidad de que los linfocitos T provenientes de los animales inoculados con c-TXNPxC52S se encontraban hiporrespondedores. La hiporrespuesta es un concepto acuñado por Stempin en el contexto de la infección por *T. cruzi*; en donde, los linfocitos expresan GRAIL, Otubaina 1, CTLA-4 y PD-1 y su principal característica es la incapacidad de proliferar frente a estímulos [Stempin et al. \(2017\)](#). Los autores observan que este proceso de extenuación de la respuesta es un proceso reversible, ya que lo observan únicamente durante la fase aguda de la enfermedad [Stempin et al. \(2017\)](#). La evidencia que permitió realizar esta hipótesis se centró en la baja proliferación de los linfocitos frente a estímulos específicos y la incapacidad para producir IFN- γ . Para corroborar la propuesta o hipótesis de que los linfocitos T de los animales inoculados con c-TXNPxC52S, se podría evaluar si los mismos expresan las moléculas GRAIL, Otubaina 1, CTLA-4 y PD-1 que definen este proceso. Para profundizar en este aspecto y explorar esta hipótesis, realizamos los ensayos de presentación con el fin de elucidar si el problema se centraba en la presentación antigénica que se discuten más adelante.

La respuesta generada por las peroxirredoxinas en particular el vínculo entre la respuesta innata y adaptativa, ha sido reportada en la bibliografía [Angelucci et al. \(2016\)](#). En este sentido, se ha demostrado que la Prx1 se-

cretada por los huevos de los parásitos *S. mansoni* y *F. hepatica* modula la respuesta inflamatoria del huésped mediante la generación de macrófagos alternativamente activados [Donnelly et al. \(2008\)](#) [Robinson et al. \(2010\)](#). Los autores postularon que, al menos en *S. mansoni*, esta función está relacionada con el estado HMW de la proteína, que predomina en el ambiente ácido y oxidativo de los granulomas [Saccoccia et al. \(2012\)](#). Bajo estas condiciones, la Prx de este parásito podría estar en el estado HMW con actividad chaperona inducida por estrés (reportada por los autores) y de esta manera podría ayudar a controlar la precipitación excesiva de proteínas asociadas con la formación de granuloma [Saccoccia et al. \(2012\)](#). La modulación de la respuesta ocurre vía linfocitos T CD4⁺ Th2 promovida por macrófagos alternativamente activados e IL-4, IL-5 e IL-13. La base bioquímica de este efecto no está clara, pero se ha demostrado que no está relacionada con la actividad peroxidasa de la proteína [Donnelly et al. \(2008\)](#) [Robinson et al. \(2010\)](#) [Saccoccia et al. \(2012\)](#). En este sentido, resultaría de gran interés investigar si c-TXNPx o c-TXNPxC52S sufren cambios conformacionales, al ser expuestos a cambios de pH como ha sido reportado para otras Prxs. Por otra parte, la Prx1 de *T. gondii* indujo un tipo de respuesta Th1, con proliferación de células T que secretan IFN- γ en un modelo de inmunizaciones en ratones [Fereig et al. \(2017\)](#). A pesar que en esta tesis se observa otro tipo de respuesta T; es de destacar, que la evidencia reportada en la bibliografía permite encontrar un sustento que aporta al hecho de que estas proteínas son capaces de generar respuestas inmunes en mamíferos, y que dichas respuestas dependen de las funciones de estas proteínas.

El análisis de la reactividad cruzada aportó evidencia con respecto a las respuestas encontradas. En este sentido, los esplenocitos provenientes de animales inoculados con la proteína salvaje mostraron mayores índices de proliferación de las células T CD4⁺, pero no con T CD8⁺, asociados con mayor producción de IFN- γ que los inoculados con Mock, cuando fueron reestimulados con la proteína mutante. Esta evidencia muestra que el condicionamiento *in vivo* por c-TXNPx sobre los linfocitos T CD4⁺ continuó *ex vivo* y que la reestimulación con la proteína mutante fue suficiente para provocar la proliferación. Cabe destacar que en este escenario la producción de IFN- γ se podría atribuir a los linfocitos T CD4⁺ mostrando que la polarización que presentaron fue de tipo Th1. Para confirmar este resultado se debería realizar un ensayo en donde se analice la expresión de esta citoquina de forma intracelular mediante citometría de flujo.

De forma complementaria, los esplenocitos provenientes de los animales inyectados con c-TXNPxC52S mostraron mayores índices de proliferación cuando fueron reestimulados con la proteína salvaje que los esplenocitos provenientes de los animales inyectados con Mock. A su vez, el índice de proliferación obtenido con la reestimulación de la proteína salvaje fue ligeramente superior al específico, en ausencia de producción de IFN- γ . Estos resultados de reactividad cruzada aportan evidencia a la hipótesis de que los linfocitos, provenientes de los animales inyectados con la proteína mutante, podrían ser hiporrespondedores, o estar anérgicos o estar extenuados. Sin embargo, esta activación no fue suficiente para restituir la producción de IFN- γ . Por otra parte, la respuesta de linfocitos T CD8⁺ es fuertemente específica de la proteína salvaje, ya que no se logra obtener por c-TXNPxC52S. Otra hipótesis posible es que la inoculación con esta la proteína mutante genere una polarización de la respuesta diferente, en este sentido, se analizó la secreción de IL-4 (Th2) e IL-10 (Tregs), y no se observaron diferencias entre los animales inoculados con la proteína salvaje o mutante.

5.2.3. Capacidad de presentación de antígenos de las CDs y su capacidad de expandir respuestas TCD4 y TCD8 específicas

Con el fin de disecar el rol de la presentación de antígenos por parte de las CDs y su capacidad de generar un vínculo con la respuesta inmune adaptativa, se analizó la capacidad de las células dendríticas cargadas con la proteína salvaje y mutante en expandir linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

Los resultados de estos ensayos mostraron una respuesta de tipo proinflamatoria. Como se discutió previamente en este capítulo, las células CD11c⁺ cultivadas en presencia de c-TXNPx secretaron IL-12 e IL-6. A su vez, cuando fueron incubadas con esplenocitos provenientes de animales inoculados con c-TXNPx indujeron la secreción de IFN- γ . Esto no se observó para las células dendríticas cargadas con la proteína mutante o el Mock y expuestas a linfocitos específicos.

Este resultado aparece en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de la respuesta T y discutidos previamente. El principal aporte de este resultado se centra en que se pudo disecar el aporte de las CDs en la presentación de c-TXNPx y su capacidad de generar una respuesta específica

por parte de los linfocitos. Este resultado permitió mostrar que la proteína es capaz de ser internalizada, procesada y presentada a través del MHC, permitiendo la expansión de una respuesta específica. Por otro lado, el hecho que no se observó producción de IFN- γ al cargar las células CD11c⁺ con las proteínas c-TXNPxC52S y estimularla con esplenocitos provenientes de animales inoculados con la misma proteína, nos planteó en su momento la posibilidad de algún proceso dependiente de la célula dendrítica (internalización, procesamiento o presentación en el contexto del MHC de clase I o II de la proteína) estuviera alterado en la proteína mutante. Sin embargo, cuando se analizó la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos provenientes de los animales inoculados con la proteína salvaje, cultivados con las CDs cargadas con la proteína mutante, se observó secreción de IFN- γ . Este resultado sugiere que la proteína mutante es capaz de ser presentada correctamente por parte de las CDs.

Por otro lado, en su conjunto, estos resultados sugieren que los esplenocitos provenientes de los animales con la proteína mutante podrían estar en un estado hiporrespondedor o extenuados, como ya se discutió anteriormente.

Por último, utilizamos ratones OT II que poseen linfocitos con un TCR específico para un epítipo de la OVA para determinar si las proteínas c-TXNPx o c-TXNPxC52S pueden influir en la presentación de OVA y expansión de linfocitos T específicos. Los resultados obtenidos mostraron que la incubación con la proteína salvaje en presencia de OVA aumenta el índice de proliferación de linfocitos T CD4 OVA-específicos, mientras que la mutante no lo hace. Esto podría estar relacionado al hecho de que la proteína salvaje, pero no la mutante, induce un aumento de la producción de IL-12, lo que podría posibilitar un incremento en la respuesta de proliferación.

Las principales diferencias entre ambas proteínas fueron: la actividad peroxidasa, la presencia de la C_P; y la oligomerización, fenómeno que está vinculado a la presencia de dicho residuo aunque no exclusivamente, como resultó demostrado en este trabajo. En este sentido, el hecho de que c-TXNPx estuviera en su totalidad como partículas de mayor tamaño que el decámero (mientras que c-TXNPxC52S estaba como una mezcla de decámeros y oligómeros), pudo favorecer algunos procesos de internalización por parte de las CDs como la pinocitosis. En base a los resultados obtenidos en este trabajo, no se podría atribuir en su totalidad la respuesta generada a la actividad peroxidasa sin poder disecar aparte el rol de conformación de la proteína en dicha respuesta.

A su vez, cada vez más roles se asignan a las peroxirredoxinas en donde algunas funciones como reguladores de la expresión génica, sensores redox, entre otros, van surgiendo [Castro & Tomás \(2008\)](#). Estas nuevas evidencias junto con los cambios de actividad dependientes del entorno, aportan complejidad al estudio de las propiedades inmunomoduladoras de estas enzimas.

5.3. Respuesta humoral inducida por las proteínas

En el capítulo resultados se presentaron los títulos de anticuerpos específicos de distintos isotipos. En este sentido, se observó que tanto c-TXNPx como su versión mutante fueron capaces de generar anticuerpos específicos de tipo IgM, IgG1 e IgG2a en ratones. Por otro lado, no se observó diferencias en los títulos de estos anticuerpos al comparar con los inducidos por la proteína activa y mutante. Esta inferencia se realiza en base a la evidencia ampliamente reportada acerca del mecanismo implicado entre la comunicación de células B y T que lleva al cambio de clase de inmunoglobulinas en las células B [Murphy et al. \(2017\)](#). Otro dato relevante que se desprende de los resultados fue el hecho que la generación de anticuerpos no fue dependiente de la actividad peroxidasa. Este resultado evidencia que existió una colaboración de las células T que permitió el cambio de clase ya que la producción de anticuerpos de forma T independiente no involucra dicho proceso [Murphy et al. \(2017\)](#). En este sentido, se podría sugerir que la colaboración de las células T en los animales inoculados con c-TXNPxC52S se podría haber dado previo a que las células T colaboradoras quedaran hiporrespondedoras. Para evaluar esta hipótesis deberíamos evaluar la respuesta T durante el transcurso de las 7 inoculaciones.

En la bibliografía existen reportes sobre la generación de anticuerpos específicos α -c-TXNPx tanto en ratones como en humanos. En esta línea, Bontempi y colaboradores realizaron un abordaje similar en ratones durante el transcurso de esta tesis; sin embargo, estos investigadores obtuvieron resultados diferentes a los encontrados por nuestro grupo. En este sentido, los investigadores reportan mayores títulos de IgG2a específicos para animales inoculados con c-TXNPx [Bontempi et al. \(2017\)](#). Cabe destacar que en el trabajo de Bontempi y colaboradores se utilizó como adyuvante ISCOMATRIXTM [Bontempi et al. \(2017\)](#), y en nuestro trabajo se inoculó con PBS como vehículo. Esta

diferencia podría tener implicancia en el redireccionamiento de la respuesta inmune y por tanto en el isotipo de anticuerpos encontrados. A su vez, el anticuerpo utilizado en esta tesis para la detección de IgG2a fue utilizado 50 veces más concentrado que la concentración recomendada por el fabricante. Este dato nos sugiere que podría haber existido una subestimación del título de este isotipo.

Por otra parte, Girard y colaboradores analizó la presencia de anticuerpos específicos α -c-TXNPx en pacientes en distintas fases de la Enfermedad de Chagas. En este trabajo los investigadores observaron la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes; sin embargo, no encontraron una asociación entre las fases de la enfermedad y la producción de anticuerpos específicos y discuten que se podría deber a que en el contexto de la infección los epitopes B de la enzima podrían no estar expuestos al solvente [Girard et al. \(2018\)](#). A su vez, en el contexto de la infección son muchas las moléculas parasitarias presentes, en donde, c-TXNPx podría representar un pequeño porcentaje de las proteínas presentes [Girard et al. \(2018\)](#). Además, sería necesario conocer las cepas con las que los pacientes están infectados para de este modo poder conocer los niveles de expresión de c-TXNPx.

Capítulo 6

Consideraciones finales

A la luz de todos los resultados obtenidos en este trabajo, **se puede concluir que c-TXNPx genera una respuesta inmune pro-inflamatoria tanto *in vitro* como *in vivo* y que esta respuesta continúa *ex vivo*.** Las principales características de esta respuesta es un **aumento de MHCII y CD80 en células CD11c⁺ *in vitro*, con producción de IL-12 e IL-6,** lo cual no se observó con la proteína inactiva y esto podría favorecer la expansión de linfocitos T CD4 específicos de OVA. A su vez, en un modelo murino se observó un **reclutamiento de células dendríticas con producción de IL-12** en la cavidad peritoneal de los animales inoculados con la **enzima salvaje.** Además, **esta enzima generó una respuesta T de tipo T CD4⁺ Th1 y T CD8⁺ con producción de IFN- γ .** En primera instancia este resultado demuestra que **c-TXNPx es capaz de presentarse a través del MHCII y de activar una respuesta T CD4.** La conjunción de la respuesta innata y adaptativa permitió la generación de anticuerpos específicos.

Por otra parte, **c-TXNPxC52S no generó un cambio en el fenotipo de las células CD11c⁺ *in vitro*.** A su vez, **su inoculación en ratones produjo el reclutamiento de células que podrían ser macrófagos o neutrófilos** según los marcadores de superficie que expresaron. Además en este trabajo planteamos que es posible que **esta proteína genere un fenotipo extenuado en los linfocitos T** que es revertido por la proteína salvaje.

A su vez, se observó que **c-TXNPx es capaz de generar la producción de anticuerpos específicos** de todos los isotipos analizados y que **esta respuesta no es dependiente de la actividad peroxidasa.**

Cabe recordar que las **principales diferencias entre ambas proteínas**

fueron: la **actividad peroxidasa**, la **presencia de la C_P** ; y la **oligomerización**, fenómeno que está vinculado a la presencia de dicho residuo aunque no exclusivamente, como resultó demostrado en este trabajo.

El principal aporte de este trabajo surge al proveer evidencias que colaboran en dilucidar la respuesta generada por una molécula parasitaria; y así contribuir a la búsqueda de moléculas que permitan la generación de herramientas para el control efectivo de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

- Y. Aida & M. J. Pabst (1990). 'Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using triton X-114'. *Journal of Immunological Methods* **132**(2):191–195.
- D. V. Andrade, et al. (2014). 'Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**(7):e3010.
- L. O. Andrade & N. W. Andrews (2005). 'Opinion: The Trypanosoma cruzi - Host-cell interplay: Location, invasion, retention'. *Nature Reviews Microbiology* **3**(10):819–823.
- F. Angelucci, et al. (2016). 'Typical 2-Cys peroxiredoxins in human parasites: Several physiological roles for a potential chemotherapy target This paper is dedicated to our beloved colleague Prof. Donatella Barra, deceased 28 September 2014.'. *Molecular and Biochemical Parasitology* **206**(1-2):2–12.
- A. Bafica, et al. (2006a). 'Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in Trypanosoma cruzi Infection'. *The Journal of Immunology* **177**(6):3515–3519.
- A. Bafica, et al. (2006b). 'Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in Trypanosoma cruzi Infection'. *The Journal of Immunology* **177**(6):3515–3519.
- S. Barranco-Medina, et al. (2009). 'The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function'. *FEBS Letters* **583**(12):1809–1816.
- D. C. Bartholomeu, et al. (2008). 'Recruitment and Endo-Lysosomal Activation of TLR9 in Dendritic Cells Infected with Trypanosoma cruzi'. *The Journal of Immunology* **181**(2):1333–1344.
- Y. Basmadján (2012). 'Enfermedad de Chagas'.

- J. A. Bolduc, et al. (2018). ‘Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins’. *The Journal of biological chemistry* (4).
- I. Bontempi, et al. (2017). ‘Trans-sialidase overcomes many antigens to be used as a vaccine candidate against *Trypanosoma cruzi*’. *Immunotherapy* **9**(7):555–565.
- M. A. Campos, et al. (2004). ‘Impaired Production of Proinflammatory Cytokines and Host Resistance to Acute Infection with *Trypanosoma cruzi* in Mice Lacking Functional Myeloid Differentiation Factor 88’. *The Journal of Immunology* **172**(3):1711–1718.
- P. T. Cantey, et al. (2018). ‘The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors’.
- F. Cardillo, et al. (2015). ‘Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection’. *Pathogens and disease* **73**(9):ftv082.
- M. S. Cardoso, et al. (2016). ‘Evasion of the immune response by *trypanosoma cruzi* during acute infection’. *Frontiers in Immunology* **6**(JAN):1–15.
- E. G. S. Carnieri, et al. (1993). ‘Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages’. *Molecular and Biochemical Parasitology* **61**(1):79–86.
- H. Castro & A. M. Tomás (2008). ‘Peroxidases of Trypanosomatids’. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**(9).
- I. Cestari & M. I. Ramirez (2010). ‘Inefficient Complement System Clearance of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes Enables Resistant Strains to Invade Eukaryotic Cells’. *PLoS ONE* **5**(3):e9721.
- C. Chagas (1909). ‘Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem’.
- M. L. Chiribao, et al. (2014). ‘Early *trypanosoma cruzi* infection reprograms human epithelial cells’. *BioMed Research International* **2014**:12.

- M. L. I. P. d. M. Chiribao (2016). *Estudio entre de la interacción cruzi y Trypanosoma células de mamífero*. Ph.D. thesis, Universidad de la República.
- J. Cortez, et al. (2012). ‘A Expressão Global da Doença de Chagas–Oportunidades Emergentes e Impacto em Portugal’. *Acta Médica ...* **25**(5):332–339.
- M. L. Díaz, et al. (2011). ‘Differential expression of Trypanosoma cruzi I associated with clinical forms of Chagas disease: Overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate’. *Journal of Proteomics* **74**(9):1673–1682.
- S. Donnelly, et al. (2008). ‘Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages’. *The FASEB Journal* **22**(11):4022–4032.
- W. O. Dutra, et al. (2014). ‘Immunoregulatory networks in human Chagas disease’. *Parasite Immunology* **36**(8):377–387.
- R. Engelman, et al. (2013). ‘Multilevel Regulation of 2-Cys Peroxiredoxin Reaction Cycle by S -Nitrosylation’. *Journal of Biological Chemistry* **288**(16):11312–11324.
- Eu Pharamacopoeia (2010). ‘2.6.14. Bacterial endotoxins’. In *European Pharmacopoeia 5.0*, no. 1, pp. 161–168. Quality of Medicines of the Council of Europe, Strasbourg.
- R. M. Fereig, et al. (2017). ‘Immunization with Toxoplasma gondii peroxiredoxin 1 induces protective immunity against toxoplasmosis in mice’.
- A. Flavia Nardy, et al. (2015). ‘Immune Evasion Strategies of Trypanosoma cruzi’. *Journal of Immunology Research* **2015**.
- L. Flohe, et al. (2002). ‘Tryparedoxin peroxidase of Leishmania donovani: Molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism’. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **397**(2):324–335.
- Food and Drugs Administration (2012). *0027-Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers*, vol. 1. FDA, Maryland.

- F. R. Gadelha, et al. (2013). 'Release of the cytosolic tryparedoxin peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes'. *Experimental Parasitology* **133**(3):287–293.
- N. Gil-Jaramillo, et al. (2016). 'Dendritic Cells: A Double-Edged Sword in Immune Responses during Chagas Disease'. *Frontiers in Microbiology* **7**(July):1–12.
- J. Gil-pulido, et al. (2017). 'Deletion of Batf3-dependent antigen- presenting cells does not affect atherosclerotic lesion formation in mice' pp. 1–14.
- M. C. Girard, et al. (2018). 'Evaluation of the immune response against *Trypanosoma cruzi* cytosolic tryparedoxin peroxidase in human natural infection.'. *Immunology* .
- V. HARIDAS, et al. (1998). 'HARIDAS, Valsala, et al. Cutting edge: TRANK, a novel cytokine that activates NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase.'. *The Journal of Immunology* **161**:1–6.
- N. Hristozova, et al. (2016). 'A Novel Method for Assessing the Chaperone Activity of Proteins'. *PLoS ONE* **11**(8).
- N. Iijima, et al. (2003). 'Selective regulation of CD40 expression in murine dendritic cells by thiol antioxidants'. *Immunology* **110**(2):197–205.
- A. o. C. C. Incorporated (2011). 'Lisado de amebocitos de'.
- J. P. Iyer, et al. (2008). 'Crucial role of cytosolic tryparedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence'. *Molecular Microbiology* **68**(2):372–391.
- H. H. Jang, et al. (2006). 'Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions'. *FEBS Letters* **580**(1):351–355.
- H. H. Jang, et al. (2004). 'Two enzymes in one: Two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function'. *Cell* **117**(5):625–635.

- C. Junqueira, et al. (2010). 'The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: Lessons for and beyond Chagas disease'. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **12**(September):1–23.
- S.-i. Kawazu, et al. (2001). 'Molecular characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*'. *Molecular and Biochemical Parasitology* **116**(1):73–79.
- H. Kayama & K. Takeda (2010). 'The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection'. *Microbes and Infection* **12**(7):511–517.
- F. Kierszenbaum, et al. (1974). 'Phagocytosis : A Defense Mechanism against Infection with *Trypanosoma Cruzi* This information is current as Article cited in : Information about subscribing to The Journal of article . Sign up at Permissions'. *The Journal of Immunology* **112**(5):1839–1844.
- R. L. Krauth-Siegel & M. A. Comini (2008). 'Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism'. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1780**(11):1236–1248.
- A. E. Leroux & R. L. Krauth-Siegel (2016). 'Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy'. *Molecular and Biochemical Parasitology* **206**(1-2):67–74.
- E. Linares, et al. (2001). 'Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation'. *Free Radical Biology and Medicine* **30**(11):1234–1242.
- R. V. Luckheeram, et al. (2012). 'CD4 ⁺ T Cells: Differentiation and Functions'. *Clinical and Developmental Immunology* **2012**:1–12.
- P. Malyala & M. Singh (2008). 'Endotoxin Limits in Formulations for Preclinical Research'. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* **97**(6):2041–2044.
- U. Mamat, et al. (2008). 'Single amino acid substitutions in either YhjD or MsbA confer viability to 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid-depleted *Escherichia coli*'. *Molecular Microbiology* **67**(3):633–648.
- U. Mamat, et al. (2015). 'Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins'. *Microbial Cell Factories* **14**(1):1–15.

- U. Mamat, et al. (2013). ‘Endotoxin-Free Protein Production-ClearColi™ Technology’. *Nature Methods* **10**(9):iii–iv.
- M. A. Morais, et al. (2015). ‘How pH modulates the dimer-decamer inter-conversion of 2-cys peroxiredoxins from the Prx1 subfamily’. *Journal of Biological Chemistry* **290**(13):8582–8590.
- K. Murphy, et al. (2017). *Janeway’s Immunobiology*. New York, 7 edn.
- N. Ogura, et al. (2013). ‘Lipid IVa incompletely activates MyD88-independent Toll-like receptor 4 signaling in mouse macrophage cell lines’. *Pathogens and Disease* **67**(3):199–205.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2018a). ‘La enfermedad de Chagas’.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2018b). ‘La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)’.
- J. W. Park, et al. (2011). ‘Glutathionylation of Peroxiredoxin I Induces Decamer to Dimers Dissociation with Concomitant Loss of Chaperone Activity’. *Biochemistry* **50**(15):3204–3210.
- A. Perkins, et al. (2014). ‘Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles’. *Biochemistry* **53**(49):7693–7705.
- L. Piacenza, et al. (2008). ‘Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite.’. *The Biochemical journal* **410**(2):359–68.
- L. Piacenza, et al. (2013). ‘<i>Trypanosoma cruzi</i> Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease’. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**(7):723–734.
- M. D. Piñeyro, et al. (2011). ‘Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: High efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite’. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **507**(2):287–295.
- M. D. Piñeyro, et al. (2008). ‘Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: Virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?’. *Gene* **408**(1-2):45–50.

- M. D. Piñeyro, et al. (2005). ‘Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*’. *Journal of Structural Biology* **150**(1):11–22.
- L. Planelles, et al. (2003). ‘Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice’. *Clinical and Experimental Immunology* **131**(1):41–47.
- C. V. Poncini, et al. (2008). ‘*Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro’. *Infection and Immunity* **76**(6):2633–2641.
- L. Poole, et al. (2011). ‘Regulation’. *Current protocols in toxicology* **49**(1):7–9.
- L. B. Poole (2007). ‘THE CATALYTIC MECHANISM OF PEROXIREDOXINS’. In J. Flohe, L.; Harris (ed.), *Peroxiredoxin systems*, chap. 4, pp. 61–81. Springer, New York.
- C. Poveda, et al. (2014). ‘Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study)’. *PLoS ONE* **9**(3):e91154.
- G. Ramírez-Tolosa & A. Ferreira (2017). ‘*Trypanosoma cruzi* evades the complement system as an efficient strategy to survive in the mammalian host: The specific roles of host/parasite molecules and *Trypanosoma cruzi* calreticulin’. *Frontiers in Microbiology* **8**(SEP):1–13.
- R. R. Rich, et al. (2008). *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Elsevier Ltd, Philadelphia, USA, 3 edn.
- J. R. Riddell, et al. (2010). ‘Peroxiredoxin 1 Stimulates Secretion of Proinflammatory Cytokines by Binding to TLR4’. *The Journal of Immunology* **184**(2):1022–1030.
- M. W. Robinson, et al. (2010). ‘Peroxiredoxin: A central player in immune modulation’. *Parasite Immunology* **32**(5):305–313.
- F. Saccoccia, et al. (2012). ‘Moonlighting by Different Stressors: Crystal Structure of the Chaperone Species of a 2-Cys Peroxiredoxin’. *Structure* **20**(3):429–439.

- R. Salvatella (2016). ‘Chagas en Uruguay, 1937-2016. Información básica para su prevención, control y atención’. *Arch Pediatr Urug* **87**(1):49–52.
- N. Santarém, et al. (2007). ‘Immune response regulation by *Leishmania* secreted and nonsecreted antigens’. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2007**:10.
- T. Scior, et al. (2013). ‘Reviewing and Identifying Amino Acids of Human, Murine, Canine and Equine Tlr4 / Md-2 Receptor Complexes Conferring Endotoxic Innate Immunity Activation By Lps/Lipid a, or Antagonistic Effects By Eritoran, in Contrast To Species-Dependent Modulation By Li’. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **5**(6):e201302012.
- H. Shau, et al. (1993). ‘Identification of a Natural Killer Enhancing Factor (NKEF) from Human Erythroid Cells’. *Cellular Immunology* **147**(1):1–11.
- K. Shortman & Y. J. Liu (2002). ‘Mouse and human dendritic cell subtypes’. *Nature Reviews Immunology* **2**(3):151–161.
- L. D. Sibley & N. W. Andrews (2000). ‘Cell invasion by un-palatable parasites’. *Traffic* **1**(2):100–106.
- W. Souza (2002). ‘Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*’. *Current Pharmaceutical Design* **8**(4):269–285.
- C. C. Stempin, et al. (2017). ‘GRAIL and Otubain-1 are Related to T Cell Hyporesponsiveness during *Trypanosoma cruzi* Infection’. Tech. rep.
- R. L. Tarleton (2007). ‘Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*’. *Current Opinion in Immunology* **19**(4):430–434.
- L. Thomson, et al. (2003). ‘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.
- M. B. Toledano & B. Huang (2016). ‘Microbial 2-Cys Peroxiredoxins: Insights into Their Complex Physiological Roles.’. *Molecules and cells* **39**(1):31–9.
- M. Trujillo, et al. (2004). ‘*Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* trypanoredoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols’. *Journal of Biological Chemistry* **279**(33):34175–34182.

- S. Vesentini, et al. (2010). ‘Mechanisms of Polymyxin B Endotoxin Removal from Extracorporeal Blood Flow: Molecular Interactions’. In C. Ronco, P. Piccini, & M. Rosner (eds.), *Endotoxemia and Endotoxin Shock*, vol. 167, pp. 45–54. Karger, Basel.
- J. Votýpka, et al. (2015). ‘New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description’. *Trends in Parasitology* **31**(10):460–469.
- S. R. Wilkinson, et al. (2000). ‘Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma cruzi**’. *The Journal of biological chemistry* **275**(11):8220–8225.
- Wood, Z. A., et al. (2003). ‘Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins.’. *Trends in biochemical sciences* **28**(1):32–40.
- World Health Organization (2012). ‘Test for sterility (Final text for revision of The International Pharmacopoeia)’ (March):1–2.
- N. Yoshida (2006). ‘Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*’. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **78**(1):87–111.
- Y. Yuan, et al. (2010). ‘Conformational and oligomeric effects on the cysteine pKa of typaredoxin peroxidase’. *J Biomol Struct Dyn.* **28**(1):51–70.