





Glutatión transferasa 1 de Trypanosoma brucei:

Rol en la síntesis de PGE₂ y la infección

Tesis de Maestría

Matías Deambrosi Borrat

Tutor: Marcelo Comini

Cotutora: Mariana Bonilla

Programa de Posgrado en Biología de PEDECIBA, subárea Biología Celular y Molecular Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos,

Institut Pasteur de Montevideo

<u>Contenido</u>

Cont	tenido	2
Resu	umen	4
1.	Introducción	6
1.1	Tripanosomas y Tripanosomiasis africana humana	6
1.2	Ciclo de vida	10
1.3	Detalles destacados de la organización subcelular, metabolismo y genoma	12
1.4	Prostaglandinas	14
1.5	Prostaglandinas en tripanosomátidos	
1.6	Antecedentes de nuestro grupo	20
2.	Hipótesis y objetivos	25
2.1	Hipótesis	25
2.2	Objetivo general	25
2.3	Objetivos específicos	25
3.	Materiales y Métodos	26
3.1	Generación de construcciones	26
3.2	Expresión y purificación de TbGST1 recombinante en <i>E. coli</i>	26
3.2	.1 Purificación de TbGST1 de la fracción insoluble	27
3.2	.2 Cuantificación de proteínas	28
3.3	Producción de anticuerpos anti-TbGST1	28
3.4	Cultivos celulares de <i>T. brucei</i>	29
3.5	Transfección de líneas celulares de <i>T. brucei</i>	
3.6	Inmunoensayos	
3.6	.1 Cosecha de parásitos	
3.6	.2 Western blot	
3.6	.3 Inmunofluorescencia indirecta	
3.7	Recuento por citometría de flujo	32
3.8	Extracción de ADN genómico	32
3.9	Generación de líneas knock-out para TbGST1	
3.9	.1 Producción por PCR de fragmentos para knock-out de TbGST1	
3.9	.2 Genotipado de líneas transfectadas	34
3.10	Evaluación de la producción de PGE ₂ por las líneas transgénicas de <i>T. brucei</i>	34
3.1	0.1 Cuantificación por ELISA	34
		Página 2

3.10	.2 Análisis de la producción de PGE ₂ por espectrometría de masas	35
3.11	Cuantificación de bioluminiscencia (actividad luciferasa)	36
3.12	Ensayos de Infección	36
4.	Resultados, Análisis y Discusión	39
4.1	Expresión de TbGST1 en <i>E. coli</i>	39
4.2	Purificación de TbGST1 a partir de la fracción insoluble del lisado bacteriano	44
4.3	Producción de anticuerpos anti-TbGST1	48
4.4	Generación y caracterización de líneas transgénicas ARNi y sobre-expresantes de TbGST1	49
4.5	Generación y caracterización de una línea monomórfica KO condicional para TbGST1	53
4.6	Localización subcelular de TbGST1	58
4.7	Expresión y concentración intracelular de TbGST1	62
4.8	Producción de PGE ₂ por la forma infectiva de <i>T. brucei</i>	63
4.9	Modelos murinos de infección con T. b. brucei	67
4.9.2	Ensayos de infección con línea celular monomórfica ARNi y SE de TbGST1	68
4.10	Ensayo de infección con línea celular pleomórfica SE de TbGST1	72
5.	Conclusiones y aportes	79
6.	Bibliografía	84
7.	Anexo	94
7.1	Cassetes para generación de líneas "KO"	94
7.2	Primers para amplificación por PCR	94
7.3	Análisis por espectrometría de masa de CeID-TbGST1(-)TMD	95
7.4	Análisis por espectrometría de masas de IMAC TbGST1(-)TMD y Trx-TbGST1(-)TMD	98

Resumen

La tripanosomiasis africana humana es una enfermedad parasitaria zoonótica causada por dos subespecies de Trypanosoma brucei (Orden Kinetoplastida). Las infecciones ocasionadas por este parásito cursan con una severa inmunosupresión causada, al menos en parte, por altos niveles de prostaglandina E2 (PGE₂). Este prostanoide derivado del ácido araquidónico puede ser sintetizado por el hospedero en respuesta a la infección o por el propio parásito. Aún no se han identificado las enzimas del parásito responsables de la producción de PGE₂, ni la eventual contribución al proceso patofisiológico de la PGE₂ producida por el patógeno. Este trabajo amplía el análisis funcional de una proteína de T. brucei denominada TbGST1, descrita anteriormente por nuestro grupo. La TbGST1 es homóloga a la proteína mPGES-2 de mamíferos, una proteína de la familia de las MAPEG (Membrane associated proteins with functions in eicosanoid and glutathione metabolism), que sintetiza PGE_2 a partir de la prostaglandina H2. La TbGST1 es una proteína no esencial que es más abundante en la forma sanguínea del parásito y cuya expresión varía durante el proceso de diferenciación a un estadio no replicativo. El análisis bioinformático preliminar muestra que el gen de la TbGST1 es ubicuo en los Kinetoplástidos, pero no así en otros eucariotas unicelulares en los cuales no se detectan secuencias relacionadas a MAPEG. La TbGST1 posee una arquitectura conservada con estas últimas que incluye un péptido transmembrana putativo, un dominio glutarredoxina (Grx) y un dominio helicoidal. La expresión de TbGST1 recombinante se ensayó en diferentes cepas de Escherichia coli y condiciones de expresión, obteniéndose altos niveles de proteína en forma insoluble con la cual se produjeron anticuerpos murinos policionales específicos. Con dicho anti-suero se pudo determinar la localización (vesículas citosólicas) y concentración intracelular (orden µM bajo) de la TbGST1. Se desarrollaron líneas transgénicas para regular de manera inducible a la baja (ARN de interferencia) y al alta (sobreexpresante) la expresión de TbGST1 en líneas celulares de T. brucei que poseen (pleomórfica) o perdieron (monomórfica) la capacidad de completar el ciclo biológico de diferenciación. A nivel in vitro, tanto la depleción como la sobreexpresión de la TbGST1 no generaron fenotipos adversos de crecimiento en dichas líneas celulares. Los niveles de PGE₂ en sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares transgénicas (ARNi y sobre-expresante) monomórficas fueron determinados mediante técnica de ELISA o por espectrometría de masas acoplado a HPLC (LC-MS), confirmándose que la TbGST1 contribuye a la producción de este prostanoide en la forma infectiva de este parásito. Para evaluar el rol de TbGST1 en el contexto de la infección se estudió el desarrollo de la enfermedad en modelos murinos, monitoreando la misma mediante recuento de parásitos en sangre y/o bien por técnica de imagenología in vivo empleando una línea celular reportera bioluminiscente. A nivel in vivo, estas líneas celulares mostraron una capacidad infectiva similar a la de la línea salvaje. Sin embargo, entre los días 7-11 postinfección (pico de la respuesta inmune innata) las líneas celulares sobre-expresantes de TbGST1 mostraron menores niveles de parasitemia, lo cual sugiere un rol de esta proteína durante la fase temprana de la infección

Los estudios realizados en el marco de esta tesis contribuyen a asignar una función, la producción de PGE₂, a una proteína altamente conservada entre Kinetoplástidos pero no así entre otros eucariotas unicelulares, la TbGST1, y a establecer su relevancia biológica en el estadio infectivo del patógeno mediante el empleo de líneas celulares modificadas genéticamente.

Lista de siglas y abreviaturas

- **PGE**₂ prostaglandina E2
- MAPEG Membrane associated proteins with functions in eicosanoid and glutathione metabolism
- **Grx** Glutarredoxina
- **DNDi** Drugs for Neglected Diseases initiative
- HAT Tripanosomiasis africana humana
- **TLD** Factor tripanolítico
- SNC Sistema nervioso central
- **BSF** "forma sanguínea"
- LS Long slender
- **SS** Short stumpy
- PC Procíclica
- VSG Glicoproteínas variables de superficie
- SIF Stumpy-inducing factor
- **AA** Ácido araquidónico
- PGs Prostaglandinas
- **COX** Ciclooxigenasa
- GSTs Glutatión transferasas
- **TMD** Dominio transmembrana
- Tet Oxitetraciclina
- **IPTG** Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
- Trx Tiorredoxina
- **MBP** Proteína de unión a maltosa
- CeID Endoglucanasa
- **IMAC** Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados

1. Introducción

1.1 Tripanosomas y Tripanosomiasis africana humana

"Enviámos, então, hematófagos para o Instituto, e, aí, o nosso diretor, Dr Oswaldo Cruz, tentou infetar um macaco da espécie Callithrix penicillata, fazendo-o picar por diversos exemplares do hemíptero. Decorridos 20 ou 30 dias, apoz a picada, foram encontrados no sangue periférico daquele macaco tripanozomos em grande número, de morfologia inteiramente diversa da de qualquer das espécies conhecidas do gênero Trypanosoma".

Chagas, C. Nova tripanozomiaze humana, 1909

Los tripanosomátidos constituyen un grupo de protozoarios unicelulares que pertenecen al supergrupo Excavata, Filo *Euglenozoa*, Orden *Kinetoplastida* (**Figura 1**) y comparten la característica particular de ser organismos flagelados que organizan su ADN mitocondrial en una estructura compacta denominada kinetoplasto, lo cual da nombre a este grupo ¹. El Orden *Kinetoplastida* divergió de forma temprana en la evolución de la rama *Eukarya* y se compone de tres grandes familias: *Trypanosomatidae, Bodonidae* y *Prokinetoplastidae*. La familia *Trypanosomatidae* está integrada por diferentes especies de vida libre y parásitos de insectos, plantas y mamíferos ^{2–4} que taxonómicamente se agrupan en dos grandes Géneros: *Trypanosoma* y *Leishmania*. El taxón *Trypanosoma* contiene dos clados: 1) el clado *"brucei"* conocido como tripanosomas del "viejo mundo" compuesto por los tripanosomas africanos, entre los cuales se encuentra la especie *Typanosoma brucei* y 2) el clado *"cruzi"* conocido como tripanosomas del "viejo mundo" compuesto por los tripanosomas africanos, entre los cuales se encuentra *Trypanosoma cruzi* ³. Se estima que *T. brucei* y *T. cruzi* divergieron hace unos 100 millones de años, en la era cretácica, tras la separación de África, América del Sur y Euramerica ⁵. Esto explicaría las marcadas diferencias biológicas entre ambas especies en lo que refiere a su adaptación a organismos hospederos, vectores y las correspondientes estrategias de colonización y supervivencia en ambos.

Los organismos de este grupo provocan enfermedades en humanos como la Leishmaniasis (producida por especies y subespecies de *Leishmania*), la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) y la enfermedad del sueño (*Trypanosoma brucei*). La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, fue descubierta y descrita por el doctor Carlos Chagas en el año 1909⁶. En el marco de la campaña contra la malaria, Chagas visitó los sitios de construcción del ferrocarril central en la región norte del estado de Minas Gerais. Los comentarios de los locales acerca de un hematófago denominado *barbeiro* por su preferencia de picadura en la cara, despertó un gran interés en el doctor, que estaba al tanto de los descubrimientos de vectores hematófagos, de los ciclos de transmisión de enfermedades y sentía intriga por ciertas enfermedades locales inexplicables.



Figura 1. Tripanosomátidos en la evolución. Árbol filogenético de Eucariotas. Los tripanosomátidos pertenecen al Orden Kinetoplastida, Filo Euglenozoa y super grupo Excavata. Tomado de ⁷.

Hoy, la enfermedad de Chagas se encuentra catalogada como una enfermedad tropical desatendida que en los últimos años se ha convertido en una preocupación de salud pública mundial debido al aumento de casos en países no endémicos ⁸. La enfermedad es endémica en 21 países de Sudamérica y se encuentra presente en América del Norte, Europa y Oceanía producto del movimiento de inmigrantes entre continentes ⁹ (**Figura 2A**). Los datos actuales de la organización *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) ¹⁰ indican que al menos 7 millones de personas se encuentran infectadas y se producen 14 mil muertes anuales producto de la enfermedad. A su vez se registran 30 mil nuevos casos anuales y se estima que al menos 70 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad.

"20,000 Persons Die from "Sleeping Sickness". Mission for Study the Fatal Disease in Uganda Sent Out by the British Foreign Office and the Royal Society".

New York Times, 22 de junio de 1902

Por otro lado, el parásito Trypanosoma brucei produce la enfermedad del sueño, también conocida como tripanosomiasis africana humana (HAT, por sus siglas en inglés), que es endémica en 36 países del África subsahariana donde se encuentra su agente vector, la mosca tse-tsé (*Glossina* sp.). El descubrimiento del agente etiológico de la enfermedad del sueño fue producto de un esfuerzo de la Real Sociedad de Londres que envío dos comisiones de investigadores de renombre a la ribera norte del lago Victoria, lo que hoy es la nación de Uganda, luego de recibir los últimos informes que reportaban la muerte de 20 mil personas. El bacteriólogo italiano Aldo Castellani, presente en la primera comisión, encontró y dibujó un tripanosoma presente en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCF) de un paciente enfermo. Lamentablemente ni él ni sus compañeros, George Low y Cuthbert Christy, le dieron importancia a este hallazgo y fue recién al año siguiente con la llegada de la segunda comisión que se profundizó en este análisis. Fue el veterano David Bruce quién profundizó metódicamente en el análisis de muestras de LCF de pacientes sanos y enfermos, confirmando la presencia del tripanosoma en todos los pacientes enfermos analizados. El Dr. Bruce junto a su esposa Mary Elizabeth Bruce conformaron la primera comisión británica en estudiar la enfermedad de ganado, nagana, en Zululandia en el año 1894. En esta expedición la pareja de científicos elucidó la causa y patología del nagana, identificando como agente etiológico un hematozoa (más tarde denominado Trypanosoma brucei en su honor) y a la mosca tsé-tsé como su vector ¹¹.

También catalogada como una enfermedad tropical desatendida⁸, la HAT ha disminuido de forma notoria en los últimos años gracias a las medidas sostenidas para el control de la enfermedad. Según datos de la DNDi¹² el número de casos diagnosticados bajó de 38000 en 1998 a menos de 1000 en 2018. No obstante, es probable que estas cifras subestimen la verdadera incidencia de la enfermedad ya que debido a los continuos conflictos armados una extensa superficie del continente africano no se haya accesible al monitoreo sanitario público. Por otro lado, históricamente la enfermedad ha sido subdiagnosticada debido a que las poblaciones afectadas se encuentran en zonas remotas, de difícil acceso y con bajos recursos. Se estima que 8.5 millones de personas viven en áreas de moderado a muy alto riesgo de contraer infección.



Figura 2. Distribución geográfica de enfermedades causadas por Tripanosomas. A) Distribución geográfica de

la enfermedad de Chagas. En rojo se indican los países donde la enfermedad es endémica y en naranja se indican aquellos países donde la enfermedad no es endémica, pero está presente. Imagen obtenida de https://dndi.org/diseases/chagas/facts/. B) Distribución geográfica de la enfermedad del sueño. Se indican las zonas con casos producidos por T. b. gambiense en rojo, por T. b. rhodesiense en azul y sin casos detectados (con screening activo) en verde. Imagen obtenida de https://dndi.org/diseases/sleeping-sickness/facts/.

Existen tres subespecies de T. brucei que resultan morfológicamente indistinguibles: T. b. brucei que causa la nagana y no es infectiva para humanos, y T. b. rhodesiense y T. b. gambiense que infectan tanto a otros mamíferos como humanos debido a que poseen un gen que les confiere resistencia a la lisis mediada por la proteína sérica apolipoproteína L1 o factor tripanolítico (TLF)^{13–15}. La infección aguda por estas especies se presenta con manifestaciones clínicas comunes que luego evolucionan hacia estadios crónicos más complejos dependiendo de la capacidad del hospedero de controlar el desarrollo de la misma. En general, tanto la infección aguda como la crónica son altamente incapacitantes como mortales si no son tratadas a tiempo. La fase aguda de la enfermedad es hemolinfática, la cual puede derivar en la invasión del sistema nervioso central (SNC) por penetración de la barrera hematoencefálica, dando lugar a una meningoencefalitis que caracteriza a la segunda fase de la enfermedad. La colonización del SNC provoca confusión, problemas en la coordinación motora y mental y perturba el patrón normal de vigilia-sueño ^{16,17}. La enfermedad producida por *T. b. rhodesiense* presenta un desarrollo rápido, progresando a la segunda etapa de la enfermedad en pocas semanas y conduciendo a la muerte en los primeros seis meses de la infección. Por otro lado, la enfermedad producida por T. b. gambiense, presenta un desarrollo más lento y progresivo que se caracteriza por un largo período asintomático que puede durar años, por lo cual, se la considera una afección tipo crónica. Un estudio filogenético de 142 aislados de T. brucei del África sub-sahariana analizó la relación entre T. b. brucei y T. b. rhodesiense, y concluyó que ésta última subespecie es una variante fenotípica de T. b. *brucei* y no un taxón aislado², lo cual fue confirmado en estudios posteriores de secuenciación ¹⁸. De hecho, ambas sub-especies presentan una composición genómica idéntica distinguiéndose únicamente la presencia del gen que confiere resistencia al TLF en la variante patogénica¹⁸. Esto, sumado a que T. b. brucei no es patógeno humano, convierte a este organismo en un excelente modelo de estudio de las variantes patogénicas para seres humanos.

Existen seis fármacos aprobados que se utilizan para combatir la HAT según la subespecie que ha infectado al paciente y la etapa de la enfermedad en la que se encuentre. La fase aguda de HAT causada por *T. b. gambiense* se trata con fexinidazol (formulación oral) o pentamidina (inyección intramuscular), mientras que para la fase neurológica se recurre a una terapia combinada compuesta por Nifurtimox-eflornitina (NECT, por sus siglas en inglés) administrados por vía endovenosa y oral (14 infusiones intravenosas de eflornitina por 7 días y 3 dosis por día, vía oral, de nifurtimox por 10 días). La infección aguda HAT causada por *T. b. rhodesiense* es tratada con inyección intravenosa de suramina o pentamidina mientras que para combatir la meningoencefalitis se administra melarsoprol por vía intravenosa. Dificultades en el diagnóstico temprano de la enfermedad, que requiere personal capacitado en general ausente en zonas rurales, retrasan la implementación de los tratamientos en la fase aguda para la cual la tasa de eficacia es aceptable y más alta que la que corresponde al tratamiento de la infección del SNC. El diagnóstico de esta última requiere del análisis de muestras de líquido cefalorraquídeo obtenidas por punción lumbar, la cual *per se* representa un riesgo importante y debe ser realizada por personal altamente capacitado ¹⁹.

1.2 Ciclo de vida

Trypanosoma brucei es un parásito con un ciclo de vida digenético y pleomórfico, que alterna entre un hospedero mamífero y un vector insecto. Esto resulta en un ciclo de vida complejo (Figura 3) que involucra cambios morfológicos y metabólicos dramáticos en el patógeno que le permiten sobrevivir y proliferar en el hospedero de turno. A diferencia de T. cruzi y Leishmania, que invaden y residen dentro de las células del hospedero, T. brucei es un parásito extracelular, que ha desarrollado un conjunto de estrategias de defensa para evadir y combatir al sistema inmune de su hospedero. El ciclo comienza cuando un insecto infectado pica a un hospedero mamífero inyectando entre cientos y miles de parásitos que se establecen y proliferan en la zona de entrada para luego migrar e invadir el sistema hematolinfático. A esta forma no replicativa que reside en las glándulas salivales de la mosca y tiene la capacidad de infectar al hospedero mamífero se le denomina "metacíclica". Una vez dentro del mamífero, el parásito comienza su proceso de diferenciación hacia la "forma sanguínea" o BSF de su traducción al inglés (bloodstream form) permaneciendo en el torrente sanguíneo, el sistema linfático o bien el espacio intersticial. En el mamífero, el parásito alterna entre dos estadios bien distinguibles desde el punto de vista morfológico y bioquímico que incluyen una forma "fina" y "alargada" denominada long slender (LS) y otra forma "enana", "compacta" llamada short stumpy (SS). La forma LS es la predominante y se caracteriza por poseer un elevado catabolismo de la glucosa que le permite sostener su metabolismo energético y una alta tasa de proliferación. Esta forma replicativa posee una capacidad de quorum sensing (ver más adelante) mediante la cual autoinduce su diferenciación a la forma SS, la cual perdió la capacidad de replicación. No obstante, la forma SS pero no así la LS posee capacidad para infectar al vector insecto. Normalmente, durante la alimentación en un hospedero infectado, la mosca tse-tse succionará muchos tripanosomas LS, los cuales perecerán al poco tiempo, y una pequeña proporción de tripanosomas SS que rápidamente adaptarán su metabolismo y sistemas de defensa para sobrevivir y proliferar en el hospedero invertebrado. En el insecto, la forma SS se diferenciará adquiriendo una forma alargada, denominada "procíclica" (PC) y que posee capacidad replicativa. En determinada etapa, los parásitos PC adquirirán capacidad para migrar y establecerse en las glándulas salivales, donde nuevamente se diferenciarán hacia la forma "metacíclica", no replicativa y con capacidad para establecer un nuevo ciclo de infección en el hospedero mamífero ^{1,19}.

Es evidente que durante su ciclo de vida estos parásitos deberán hacer frente a diferentes condiciones fisicoquímicas y biológicas. Para asegurar su supervivencia y transmisión, el patógeno ha desarrollado distintos mecanismos adaptativos. La forma BSF presenta una envoltura de glicoproteínas de superficie que recubren su membrana celular, denominadas "glicoproteínas variables de superficie" (VSG, por sus siglas en inglés). Si bien las VSG actúan como barrera física frente la acción lítica de componentes de la inmunidad innata (por ej. del sistema del complemento), estas moléculas son altamente inmunogénicas y disparan la producción de anticuerpos específicos que días después desencadenarán una lisis mediada por anticuerpos. Por lo tanto, para evadir la respuesta inmune humoral del mamífero, el parásito recurre al recambio frecuente de las VSG mediante la expresión estocástica y en cantidades importantes de nuevas variantes de esta proteína. Este fenómeno se denomina "variación antigénica" y se asocia al típico patrón ondulante de parasitemia, con picos elevados seguidos de pronunciados descensos. Esta variación antigénica implica procesos de recombinación y silenciamiento de los aproximadamente 1500 genes de VSG que posee T. brucei²⁰. Se expresan muy pocas variantes de estas proteínas de superficie por vez. Otro mecanismo que emplea el parásito para evitar el reconocimiento inmune es la reposición constante de su VSG, producto de la alta tasa de endocitosis que posee²¹. Esto le permite degradar los complejos VSG/anticuerpos u otros mediadores que se puedan haber formado y actúen como activadores de respuesta inmune²². De esta forma, la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra

la versión inicial de VSG elimina a muchos parásitos que presentan esta variante al tiempo que una nueva población clonal que expresa otra variante prolifera ²³.



Figura 3. Ciclo de vida de Trypanosoma brucei. El esquema representa la alternancia entre un hospedero mamífero (fondo verde) y un hospedero insecto (fondo blanco). Se muestran fotografías de microscopia electrónica de las diferentes formas que adopta el parásito según su hospedero. Las flechas violetas indican la transición a una forma replicativa mientras que las flechas amarillas indican la transición a una forma no replicativa. Una mosca infectada pica a un hospedero mamífero e inyecta de forma mecánica cientos a miles de parásitos en su forma "metacíclica". Dentro del hospedero mamífero ésta se diferencia a la forma sanguínea proliferativa "long slender" (LS). Ante una señal de autoinducción ("Stumpy inducing factor" o SIF) algunos parásitos se diferencian a la forma no replicativa señort stumpy" (SS) capaz de infectar a la mosca, que también ante señales de apoptosis ("Apoptosis inducing factor" o AIF) o ciertas prostaglandinas, induce la muerte celular. Al picar a un mamífero infectado la mosca se infecta con parásitos que al llegar al intestino se diferencian a la forma replicativa "procíclica", que luego migra a las glándulas salivales y se diferencia a la forma metacíclica donde eventualmente se reinicia el ciclo con una nueva picadura. Las condiciones de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes y defensas inmunes varían considerablemente entre sus hospederos.

Otro mecanismo que regula la proliferación del parásito es la diferenciación de la forma replicativa LS a la forma no replicativa SS, estableciendo una relación estable hospedero-parásito y asegurando la transmisibilidad al insecto vector. Esta diferenciación se encuentra regulada por medio de un sistema de *quorum sensing* que depende de la secreción de peptidasas por parte del parásito, las cuales degradan proteínas del medio (del hospedero y el parásito) generando oligopéptidos (*stumpy-inducing factor* o SIF) que a través de una cascada de señalización activan el proceso de diferenciación^{24,25}.

Para profundizar en el estudio de las bases moleculares de los procesos de diferenciación se comenzó a cultivar tripanosomas africanos *in vitro* en la década de los 70. Las cepas fueron guardadas por institutos de investigación especializados y mantenidas por pasajes en roedores. La acumulación de "pasajes" llevó a la selección de cepas que perdieron la capacidad de diferenciarse a la forma SS. Estas cepas recibieron el nombre de monomórficas y son las más utilizadas en trabajos de investigación ^{26–28}. Experimentos de infección en ratones con cepas monomórficas resultan en un buen modelo de la fase aguda de la enfermedad. También existen cepas de laboratorio que aún poseen la capacidad de diferenciación a la forma SS que se denominan cepas pleomórficas y resultan un buen modelo de la fase crónica de la enfermedad en experimentos de infección. En este trabajo se utilizaron cepas monomórficas y pleomórficas (ver sección 3.4).

1.3 Detalles destacados de la organización subcelular, metabolismo y genoma

Los tripanosomátidos presentan organelos comunes en células eucariotas, con algunos rasgos distintivos que se desarrollan a continuación. Para comenzar, todos los tripanosomátidos presentan un flagelo que comienza en la parte posterior del parásito en un sitio conocido como "bolsillo flagelar" y se extiende a lo largo del cuerpo celular hasta el extremo anterior. En todo su recorrido hasta el extremo anterior, el flagelo se encuentra unido al cuerpo del parásito. Además de cumplir una función motora, el flagelo tiene un rol clave en la citocinesis, morfogénesis y "limpieza" de la cobertura celular ²⁹. El bolsillo flagelar es el único sitio de endo y exocitosis, por lo que representa un importante sitio de tráfico vesicular. Adyacente al bolsillo flagelar se encuentra el kinetoplasto, que es el genoma de la única mitocondria que posee este parásito, organizado en miles de segmentos de ADN circular conocidos como maxi y mini círculos. Esta única mitocondria, que se observa desplegada a lo largo del parásito, juega un rol muy importante desde el punto de vista metabólico y sufre drásticos cambios morfológicos y funcionales durante los diferentes estadios del ciclo de vida. La mitocondria de parásitos BSF es rudimentaria y estructuralmente subdesarrollada (sin las características crestas), carece de citocromos y no expresa enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por lo que la producción de ATP depende exclusivamente de la glicolisis (discutido en el próximo párrafo). En BSF la casi única actividad enzimática mitocondrial de relevancia en el metabolismo energético lo constituye la glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO) que participa en la regeneración de NAD⁺ glicosomal, un paso crucial para mantener el balance de los equivalentes de reducción en condiciones de aerobiosis^{30,31}. En cambio, en parásitos PCF la mitocondria está totalmente desarrollada (con las típicas crestas de la membrana interna), ocupa un gran volumen celular y expresa el conjunto completo de enzimas de la cadena de transporte de electrones (citocromos) y del ciclo del ácido cítrico ³². Esto le permite a este estadío obtener un buen rendimiento de producción de ATP a partir del catabolismo de aminoácidos.

Los tripanosomátidos compartimentalizan las enzimas encargadas de la mayor parte de la vía glicolítica en unos organelos evolutivamente relacionados a los peroxisomas denominados glicosomas. Los glicosomas poseen una membrana simple la cual es impermeable a NAD⁺/NADH. Estudios proteómicos revelaron que varias proteínas involucradas en protección ante estrés oxidativo, síntesis de purinas y pirimidinas, vía de las pentosas-fosfato y biosíntesis de lípidos se encuentran alojadas en dichos organelos. Se postula que los glicosomas se formaron para explotar la disponibilidad de nutrientes (principalmente la glucosa) presentes en el torrente sanguíneo del hospedero mamífero, dado que además presentan un perfil de expresión de proteínas muy diferente en las formas LS y SS³³. Otros organelos presentes en tripanosomátidos son los acidocalcisomas, sitios de almacenamiento del calcio y fosforo involucrados no sólo en la homeostasis de calcio, sino también en el balance del pH intracelular y la osmorregulación ³⁴.



Figura 4. Esquema representativo de la organización subcelular de la forma sanguínea de Trypanosoma brucei. A) Imagen de microscopía electrónica de escaneo (SEM) donde se aprecia la morfología del parasito y sus dimensiones. B) Esquema de los principales componentes subcelulares. C-G. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) representativas donde se aprecian los componentes indicados en B. La escala de las imágenes no es uniforme. H) Imagen aumentada de SEM donde se aprecian los componentes del bolsillo flagelar, un sitio importante de transporte vesicular. Figura tomada y modificada de ³⁵, las imágenes de SEM y TEM fueron adquiridas por Marcelo Comini.

El genoma de *T. bruc*ei fue secuenciado de forma completa en 2005³⁶. Con un tamaño de 26 megabases, los 9068 genes identificados se distribuyen en 11 pares de cromosomas. Alrededor de 1700 secuencias corresponden a genes específicos de *T. brucei* y 900 secuencias serían pseudogenes. La comparación del genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania major*, reveló que comparten un proteoma común de alrededor de 6200 genes, agrupados en grandes racimos de genes policistrónicos sinténicos.

1.4 Prostaglandinas

Los eicosanoides son lípidos oxigenados de 20 carbonos que derivan del ácido araquidónico (AA) y otros ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés). Son señalizadores bioactivos de acción local y regulan procesos homeostáticos y de inflamación asociados a diferentes enfermedades³⁷. Existen cientos de especies de eicosanoides estructural y estereoquímicamente diferentes que se pueden producir a partir de ácido araquidónico y otros PUFAs derivados de ácidos grasos ω 6, como el ácido dihomo- γ -linolénico (DGLA) (cuyo origen es el ácido graso esencial de 18 carbonos ácido linoleico, LA), así como de PUFAs derivados de ácidos grasos ω 3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) (que tiene como precursor al ácido α -linolénico, otro ácido graso esencial de 18 carbonos)^{38,39}.

Los eicosanoides se sintetizan principalmente a partir del AA, que como la mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentra en membranas celulares, esterificados a fosfolípidos. Las reservas de AA tisular provienen de la dieta y de la elongación y desaturación hepática y extrahepática del LA, que también se adquiere a través de la alimentación. Las personas que mantienen una dieta occidental ingieren aproximadamente 0,2-0,3 gramos de AA y 10-20 gramos de LA y en estos casos la formación de AA a partir de LA supera el suministro dietético de AA⁴⁰.

Los eicosanoides incluyen a las prostaglandinas, los tromboxanos, las prostaciclinas, los leucotrienos y las lipoxinas. El término prostanoides se utiliza para referirse exclusivamente a las prostaglandinas y los tromboxanos^{37,41,42}. Las prostaglandinas (PGs) son potentes autacoides lipídicos derivados del ácido araquidónico (AA), que mantienen funciones homeostáticas al mismo tiempo que median mecanismos de defensa, como la respuesta inflamatoria, a través de la cual se encuentran ligados a mecanismos de patogénesis⁴³. Los autacoides son mediadores potentes como las hormonas, que producen su efecto a concentraciones nanomolares y actúan a través de la unión a receptores específicos. Diferentes tipos celulares son capaces de sintetizar *de novo* y localmente estos mediadores en respuesta a diferentes estímulos. Estas moléculas tienen corta vida media y ejercen su efecto sobre la misma célula (efecto autocrino), o células muy próximas (efecto paracrino)^{37,44}. Su biosíntesis se encuentra significativamente elevada en tejidos inflamados y contribuyen al desarrollo típico de la inflamación aguda, constituyendo biomarcadores específicos de afecciones inflamatorias. Si bien las propiedades pro- y anti-inflamatorias de las diferentes PGs durante la inflamación aguda se encuentran bien documentadas, su rol en la resolución de la inflamación es un tema controversial en la literatura ⁴⁵.

En mamíferos, la biogénesis de estos compuestos inicia con la acción de la fosfolipasa A2, que libera al ácido araquidónico, un ácido graso insaturado de 20 carbonos, de la membrana lipídica (**Figura 5**). Las enzimas PGH-1 y PGH-2, también conocidas como ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), son enzimas bifuncionales que catalizan la formación de prostaglandina G₂ (PGG₂) a partir de AA a través de su actividad ciclooxigenasa, y su posterior conversión a prostaglandina H₂ (PGH₂) a través de su actividad peroxidasa. COX-1 es expresada de forma constitutiva en la mayoría de las células y es la fuente principal de prostanoides que cumplen funciones de homeostasis. Por otro lado la COX-2 es inducida por estímulos inflamatorios, hormonas y factores de crecimiento y es la fuente principal de prostanoides que participan en la inflamación y enfermedades proliferativas como el cáncer⁴⁶. La PGH₂ es producida por ambas isoformas de la COX y es el sustrato común para una serie de isomerasas y sintasas específicas que producen prostaglandinas y tromboxanos. La producción diferencial de estas sintasas en células presentes en sitios de inflamación determina el perfil de producción de prostaglandinas ⁴⁵.

Existen 4 prostaglandinas bioactivas principales: prostaglandina E_2 (PGE₂), prostaciclina (PGI₂), prostaglandina D_2 (PGD₂) y prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF_{2 α}). En mamíferos, estas moléculas se producen de forma ubicua, generalmente cada tipo de célula genera uno o dos tipos dominantes ⁴⁷, y se asocian a

funciones fisiológicas básicas de muchos tejidos y órganos, pero su rol más destacado es en la modulación de procesos inflamatorios. Tanto el nivel como el perfil de la producción de prostaglandinas varía drásticamente en una respuesta inflamatoria. En una inflamación aguda la concentración de prostaglandinas alcanza altos niveles y cumplen un importante rol en la expresión de citoquinas por células dendríticas, diferenciación de células T y reclutamiento de leucocitos, células vitales del sistema inmune⁴⁵.



Figura 5. Biosíntesis de prostanoides. La acción de la fosfolipasa A_2 libera AA de la membrana fosfolipídica que es luego convertido en PGH₂ por la acción de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). La PGH₂ es luego transformada en diferentes PGs y tromboxanos mediante la acción de sus respectivas sintasas. Modificada de ⁴⁸.

La comprensión de las funciones fisiológicas de estos eicosanoides es compleja y controversial. Inicialmente la señalización mediada por eicosanoides se veía como un componente pro-inflamatorio de la respuesta inmune innata, pero estudios recientes de lipidómica han demostrado que en situaciones algunos eicosanoides y docosanoides (PUFAs bioactivos oxigenados de 22 carbonos) relacionados presentan funciones anti-inflamatorias y pro-resolutivas ³⁸. También existen numerosos receptores de prostaglandinas en distintos tejidos que desencadenan diferentes respuestas celulares, por lo que, el contexto en el cual se enmarca su acción determina en gran parte su efecto. Cada PG, dependiendo de sobre cual receptor actúe, afecta de forma específica a diferentes células inmunes como macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T ⁴⁹. Históricamente los estudios de los eicosanoides en la inflamación se han centrado principalmente en las vías de señalización activadas por los lípidos producidos por las enzimas COX, ya que colectivamente provocan los signos característicos de la inflamación como el calor, la hinchazón, el enrojecimiento, el dolor y la pérdida de función. La comprensión de las funciones fisiológicas de estos lípidos se complica por las diferentes funciones que desempeñan en los diferentes tejidos. Por ejemplo, la unión de PGE₂ a sus receptores en las neuronas causa dolor asociado con la inflamación, mientras que la señalización autocrina por PGE₂ en los

macrófagos (y posiblemente en otros leucocitos) puede regular negativamente al TNF y aumentar la producción de IL-10, lo que lleva a una reducción neta de las señales inflamatorias⁵⁰.

En este trabajo nos centraremos en la PGE₂, una de las prostaglandinas mejor estudiada. PGE₂ es producida por muchas células como fibroblastos, macrófagos y células tumorales. En condiciones fisiológicas PGE₂ es un importante mediador de diferentes funciones biológicas como la regulación de la respuesta inmune, presión arterial, integridad gastrointestinal y fertilidad. En la inflamación, la PGE₂ despierta un interés particular, ya que lidera los efectos clásicos de la inflamación: enrojecimiento, hinchazón y dolor⁴⁵.

En mamíferos existen tres PGE₂ sintasas que catalizan la conversión de PGH₂ a PGE₂, una citosólica (cPGES) v dos asociadas a membrana (mPGES-1 v mPGES-2)⁵¹. cPGES se expresa de forma constitutiva v abundante en el citosol de varios tejidos y células y requiere glutatión como cofactor. El rol de cPGES e incluso su capacidad de producir PGE₂ es controversial. Su localización en el citosol sugiere un acoplamiento a la cercana COX-1 en el retículo endoplasmático en preferencia a la distante COX-2 en el bolsillo perinuclear⁵². Ensayos en ratones deficientes en cPGES no lograron revelar la importancia de su rol como sintasa de PGE₂ ya que la deleción de la misma provoca muerte perinatal⁵³. mPGES-1 es una miembro del grupo de proteínas asociadas a membranas en el metabolismo de eicosanoides y glutatión (grupo denominado MAPEG, por sus siglas en inglés) y, tal como cPGES, emplea al glutatión como cofactor⁵⁴. El glutatión reducido no es consumido en la formación de PGE_2 sino que facilita el clivaje al grupo endoperóxido y la formación del grupo 9-keto. La mPGES-1 es una proteína perinuclear que se encuentra fuertemente inducida por citoquinas y factores de crecimiento y marcadamente reprimida por glucocorticoides anti-inflamatorios, de la misma forma que la COX-2. Se encuentra funcionalmente acoplada a la COX-2 con una gran preferencia por esta frente a la COX-1. La generación de ratones mutantes deficientes en mPGES-1 reveló un rol dominante de esta enzima en la generación de PGE₂ para promover la inflamación⁴⁵. mPGES-2 es sintetizada como una proteína asociada a la membrana del aparato de Golgi y la proteólisis de su dominio hidrofóbico N-terminal la convierte en una proteína citosólica funcional. Se expresa de forma constitutiva en varios tejidos y células y se encuentra acoplada tanto a COX-1 como a COX-2³⁷.mPGES-2 necesita reductores para producir PGE₂ pero no exclusivamente glutatión⁵⁵. Experimentos en ratones deficientes en mPGES-2 no demostraron un fenotipo específico ni alteración en los niveles de PGE₂ en varios tejidos y en macrófagos estimulados con LPS⁵⁶.

Luego de ser formada, la PGE₂ es transportada activamente a través de la membrana por la proteína MRP4, que pertenece al grupo de proteínas multirresistentes a drogas (MRPs, por sus siglas en inglés) al mismo tiempo que difunde de forma pasiva, para de esta forma actuar a nivel extracelular y próxima al sitio de secreción⁵⁷.

La PGE₂ actúa sobre cuatro receptores (EP₁, EP₂, EP₃, EP₄) que a su vez poseen distintas isoformas en distintas especies. Estos receptores tipo rodopsina poseen siete dominios transmembrana y se encuentran acoplados a diferentes proteínas G en la porción intracelular. A través de diferentes mensajeros secundarios activan diferentes cascadas de señalización intracelular. Estudios de KO de las diferentes PGE₂ sintasas en ratones reveló que la PGE₂ modula tanto respuestas pro-inflamatorias como anti-inflamatorias y que este efecto depende en gran parte de la regulación de la expresión de los receptores en los tejidos relevantes. Al unirse a diferentes receptores EP, la PGE₂ puede regular las funciones de diferentes tipos de células incluyendo macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B provocando tanto efectos anti- como pro-inflamatorios ⁴⁵.

1.5 Prostaglandinas en tripanosomátidos

Numerosos trabajos que estudian las relaciones entre parásitos y sus hospederos plantean una influencia cruzada entre ambos y mediada por hormonas o compuestos tipo hormonas que tiene por fin modular varios aspectos fisiológicos de su contraparte 58-60. Para "tener éxito" un parásito debe adaptarse al entorno fisiológico de su hospedero y completar su ciclo de vida y desarrollo sin causar la muerte prematura del mismo. En este sentido los eicosanoides juegan un rol vital en esta comunicación parásito-hospedero, donde la regulación fina de la expresión sitio-específica de estos compuestos puede determinar la vida o la muerte para ambos. Varios estudios reportan que, así como lo hacen sus hospederos, algunos parásitos (artrópodos, protozoarios y helmintos) producen prostaglandinas durante la infección 61,62, cambiando drásticamente la visión acerca de los roles que estos mediadores juegan durante las infecciones parasitarias. ¿Por qué produciría un patógeno estos compuestos? En organismos protistas, incluyendo parásitos, los eicosanoides juegan un rol en el control del ciclo de vida, proliferación, diferenciación y maduración sexual⁶³. Además se ha observado que la producción de eicosanoides por parte de los parásitos se ve aumentada en el contexto de la infección, lo que sugiere un rol en el desarrollo de la patogénesis, desde el establecimiento de la infección hasta la modulación de la respuesta inmune⁶². Varios estudios demostraron que la inmunosupresión por inducción de la liberación de prostaglandinas, en particular PGE₂, por células del sistema inmune, sería una característica común en varias infecciones parasitarias y podría facilitar el establecimiento de la infección⁶².

La producción de prostaglandinas también se ha descrito en kinetoplastidos^{64–67}. *T. brucei*^{64,65}, *T. cruzi*^{66,68}, *Leishmania*⁶⁷ y *Crithidia fasciculata*⁶¹, convierten AA y PGH₂ en PGs. Estas PGs están asociadas al desarrollo de síntomas clínicos tales como fiebre, dolor de cabeza, inmunosupresión, hiperestesia muscular profunda, aborto espontáneo, disfunción ovárica y somnolencia^{61,69,70} al mismo tiempo que actúan como inmunomoduladores colaborando con la transición y establecimiento (y sostenimiento en el tiempo) de la etapa crónica de la enfermedad⁶⁹.

Por ejemplo, en T. brucei, parásitos SS producen PGD₂ la cual a concentraciones elevadas induce la muerte celular de este estadio mediante un mecanismo apoptótico. Llamativamente, el estadio SS es mucho más sensible a la acción de la PGD₂ que los parásitos LS. En el marco de una infección, la reducción de la carga parasitaria inducida por la PGD₂ podría actuar como control poblacional evitando la emaciación del hospedero, asegurando el establecimiento de un nuevo ciclo de proliferación clonal y por otro lado incrementando las chances de transmisión a la mosca tsé-tsé⁷¹. Durante la infección también se liberan otros factores inmunosupresores⁷² que previenen un daño tisular excesivo y permiten a los parásitos evadir la respuesta inmune innata en ciertos tejidos. Uno de estos factores es PGE₂, que es liberado por la forma LS de *T. brucei*⁶¹. PGE₂ puede inducir fiebre además de ejercer efectos anti-inflamatorios, mientras que la PGD₂ es somnógena y se acumula en el cerebro en respuesta a la falta de sueño⁷³. Los receptores para PGD₂ están localizados en las meninges aracnoideas que cubren el pro-encéfalo basal⁷⁴. PGD₂ participa en la regulación del sueño NREM y sus efectos están mediados a través de la adenosina después de unirse a los receptores de adenosina A2A en los núcleos preópticos ventrolaterales^{75,76} y los receptores de adenosina A1 en los núcleos tuberomamilares⁷⁷. Dado que los tripanosomas se infiltran en las meninges basales, la PGD₂ sintetizada por los tripanosomas, o por las células hospedero en respuesta a la infección, puede no sólo desempeñar un papel en la regulación del crecimiento del parásito, sino que también puede estar involucrada en contribuir a las alteraciones del sueño características de HAT 65,71,78.

Las bases moleculares del metabolismo de AA y producción de prostaglandinas en tripanosomátidos no se encuentran aun completamente elucidadas. Hasta el momento, en tripanosomátidos sólo se han descrito las actividades enzimáticas de las fosfolipasas A_1 , $A_2^{79,80}$ y la sintasa de la PGF₂ α^{65} .

Las únicas fosfolipasas que liberan ácidos grasos de la posición SN-2 de los fosfolípidos de membrana, que es la posición en la que se encuentra principalmente el AA^{81} , son las PLA₂. En la forma sanguínea de *T. brucei* se reportó una PLA₂ estimulada por Ca²⁺ y/o por el péptido anfipático melitina, responsable de la liberación de AA, que juega un rol central en el control de la entrada de Ca^{2+ 82,83}. También, se demostró que en la forma procíclica de *T. brucei*, el AA generado de forma endógena puede inducir tanto la entrada como la salida de Ca²⁺ de los acidocalcisomas, sugiriendo que la actividad PLA₂ participa en eventos de señalización en *T. brucei*^{84,85}.

En cuanto a la presencia de enzimas COX, la búsqueda de estas enzimas en eucariotas unicelulares ha sido dificultosa. Se han detectado proteínas similares a las COX y lipooxigenasas (enzimas involucradas en la síntesis de leucotrienos) de mamíferos que aún deben ser caracterizadas a nivel bioquímico y biológico⁶³. Varias líneas de evidencia sugieren que no existe una COX clásica que participe en la síntesis de eicosanoides en parásitos. Por un lado, los inhibidores de las COX no son capaces de afectar la síntesis de prostaglandinas en varios de estos organismos. Por otro lado, la búsqueda de genes por homología de secuencias (método BLAST, por *Basic Local Alignment Search Tool*) no detecta en estos genomas secuencias con homología significativa a las COX clásicas⁶¹. Aun así, existen otras enzimas capaces de generar el grupo pentacíclico. Una vía alternativa sería a partir de la actividad lipooxigenasa que emplea al ácido lipoico como sustrato y en reacciones sucesivas da lugar a la formación del ácido jasmónico⁸⁶. Compuestos tipo prostaglandina también pueden formarse mediante reacciones radicalares no enzimáticas, como es el caso de la generación de isoprostanos⁸⁷. Estas moléculas se forman por la autooxidación de AA mediada por radicales libres. Estas reacciones deberían ocurrir de manera controlada y/o local (compartimentalizada) para evitar la oxidación inespecífica y deletérea de otras macromoléculas.

En *T. brucei* se observó la producción enzimática de PGE₂, PGD₂ y PGF_{2 α}⁶⁶, aunque sólo la sintasa de esta última fue identificada y estudiada. La liberación de PGD₂, PGE₂ y PGF_{2 α} al medio por tripanosomas cultivados en un medio definido, con o sin la adición de AA, fue cuantificada mediante inmunoensayo enzimático de competencia (EIA, por sus siglas en inglés) y verificada por análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (ver Figura 6). En el panel A se observa la cuantificación de PGs secretadas al medio de cultivo, donde se evidencia una mayor producción de PGs, especialmente, PGD₂ y PGE₂, con la adición de AA. En el **panel B** se observa la cuantificación de PGs producidas por lisados de parásitos, donde también se observa un aumento de las PGs con la adición de AA, siendo la PGF₂ α la mayoritaria en este caso. Para determinar la naturaleza de los catalizadores que participan en estas reacciones y evaluar si estos se encuentran estrechamente relacionados a las COX-1 y COX-2 descritas en mamíferos, lisados celulares se sometieron a elevadas temperaturas e incubación con drogas antiinflamatorias no esteroideas. La producción de PGs demostró ser sensible al calor y no se vio afectada por la presencia de ácido acetilsalicílico e indometacina, lo que sugiere la participación de una entidad enzimática sensible a altas temperaturas y un mecanismo molecular diferente al de sus contrapartes mamíferas. También se observó que la producción de PGs varía con el ciclo de vida del parásito (Figura 6, panel C) ⁶⁴ siendo la forma SS la que presentó los niveles más altos de las tres PGs, mientras que las formas LS y PC mostraron un contenido significativamente inferior, excepto por la PGF2α que estuvo elevada en LS respecto de PC.

La sintasa de $PGF_2\alpha$ de *T. brucei* (TbPGFS) demostró ser sustancialmente diferente a las PGFS de mamíferos, con las cuales guarda una identidad de secuencia de aminoácidos de 39-40%, y a las aldo-

keto reductasas (AKRs) de plantas, levaduras y procariotas⁸⁸. En TbPGFS, el sitio de unión a cofactores se encuentra expuesto al solvente, mientras que en las enzimas de mamíferos éste se encuentra en un bolsillo interior profundo⁸⁹. A nivel funcional, los residuos catalíticos de la TbPGFS se componen de una díada Lys e His, mientras que en PGFS de mamíferos lo son una tríada Tyr, Lys e His que reducen a la PGH₂ y a la 9,10-fenantrenoquinona (9,10-PQ), respectivamente⁹⁰. En la PGFS humana, sólo un residuo catalítico de Tyr es responsable de la reducción de PGD₂, PGH₂ y 9,10-PQ^{61,91,92}.



Figura 6. Producción de PGs en Trypanosoma brucei. A) PGs secretadas al medio, de cultivo de tripanosomas crecidos en presencia (+AA) o ausencia (-AA) de 66 µM de AA. **B)** Producción de PGs por lisados de cultivos de T. brucei en presencia (+AA) o ausencia (-AA) de 1 mM de AA. Los valores representan el promedio de tres experimentos individuales. Ambas figuras fueron tomados y modificados de ⁶⁵. **C)** PGs producidas por lisados de tripanosomas short-stumpy, long slender y procíclicos en presencia de 1 mM de AA. Figura tomada y modificada de ⁶⁴.

La actividad de síntesis de PGF₂ α también ha sido estudiada en *T. cruzi* ^{66,68}. Un fragmento de secuencia con homología a TbPGFS se amplificó a partir de ADN genómico de *T. cruzi* y su expresión en forma recombinante no resultó exitosa⁶⁶. La búsqueda de secuencias candidatas a llevar a cabo la síntesis de PGF₂ α en *T. cruzi* dio lugar a la identificación del gen que codifica para la *old yellow enzyme* (TcOYE), una flavoproteína que tiene sólo 16-28% de homología con OYEs de otras fuentes y que es notablemente distinta de la familia AKR de PGF₂ α sintasas. TcOYE mostró capacidad para reducir PGH₂ a PGF₂ α así como también algunas naftoquinonas y fármacos tripanocidas nitroheterocíclicos ⁶⁶. El bloqueo de la actividad de esta enzima contribuye de manera destacada en la metabolización y activación de estos fármacos. TcOYE también participa en el metabolismo de la komaroviquinona diterpénica, la cual presenta actividad tripanocida a través de la generación de especies reactivas de oxígeno^{93,61}

Estos experimentos demuestran la existencia de un sistema de síntesis de prostaglandinas no conservado con el presente en organismos mamíferos, con un primer paso dependiente de una ciclooxigenasa no clásica. Las PG sintasas caracterizadas en protozoos parásitos, especialmente los tripanosomátidos, revelan diferencias moleculares y especificidades por sustratos que son notablemente distintas a las de sus contrapartes de mamíferos. Si estas diferencias resultan fisiológicamente relevantes para la biología del parásito, sin duda que estas proteínas constituyen objetivos interesantes para el diseño racional de fármacos antiparasitarios⁶¹.

1.6 Antecedentes de nuestro grupo

Los tripanosomátidos se destacan por poseer un metabolismo redox dependiente de tioles donde la N¹, N⁸ bis-glutationil espermidina (tripanotión) sustituye al glutatión (GSH) como sustrato redox o ligando ⁹⁴. Este metabolismo aporta equivalentes de reducción para sostener la proliferación celular y brindar protección contra el efecto citotóxico de endo- (diferentes tipos de hidroperóxidos y aldehídos) y xenobióticos (especies reactivas del oxígeno generadas por el hospedero, metales pesados y fármacos). Este sistema se compone además de varias proteínas que pueden utilizar al tripanotión como equivalente redox y catalizan reacciones de transferencia de electrones o bien que ligan complejos organometálicos que permiten el correcto funcionamiento de diferentes procesos celulares. El estudio de estas proteínas es de gran relevancia para comprender la bioquímica y biología de estos patógenos, así como para estimar su potencial como dianas farmacológicas. En este contexto, un estudio bioinformático realizado por miembros de nuestro grupo identificó en el genoma de T. brucei varios genes con un alto grado de homología a nivel de secuencia y estructural con proteínas que presentan el plegamiento de tiorredoxina ³⁵ (Figura 7). Estos genes pudieron ser agrupados en diferentes familias de acuerdo al grado de similitud con proteínas relacionadas (pertenezcan o no al mismo Orden) y caracterizadas a nivel funcional. Algunas de ellas no poseen aún actividades o funciones asignadas. Uno de los grupos identificados pertenece a genes con secuencias homólogas a glutatión transferasas (GSTs).

Las GSTs son proteínas ubicuas que catalizan la conjugación al GSH de moléculas electrofílicas, así como también la isomerización, reducción u oxidación de sustratos. De esta manera, las GSTs contribuyen a neutralizar grupos altamente reactivos y citotóxicos presentes en endo- y xenobióticos, incrementar la solubilidad y eliminación de moléculas tóxicas y biosintetizar mediadores inmunes como los leucotrienos o las prostaglandinas⁹⁵. Por su distribución subcelular, las GSTs se clasifican en tres superfamilias: las citosólicas, las mitocondriales y las microsomales (conocidas como MAPEG por *membrane associated proteins with functions in eicosanoid and glutathione metabolism*). Todas ellas se caracterizan por

presentar un dominio N-terminal con plegamiento tiorredoxina fusionado a otro C-terminal rico en hélices alfa. El patrón de conservación de secuencia/estructura permite a su vez distinguir 13 clases de GST citosólicas y mitocondriales y 6 familias de MAPEG.



Figura 7. Relación de identidad de secuencia de los dominios con plegamiento Trx presentes en T. brucei. Se realizó una búsqueda dentro de las secuencias no redundantes de proteínas de T. brucei con el programa Delta-BLAST utilizando como sonda una secuencia representativa de las glutarredoxinas (proteínas con plegamiento tiorredoxina) más distribuidas en eucariotas (clase II), de longitud estándar (100 aminoácidos) y con el motivo de sitio activo de mayor representación en eucariotas: CGFS. Las secuencias resultantes se sometieron a análisis de predicción de dominios de estructura secundaria con los programas PROSITE, SMART y PSI-PRED. Se identificaron dos secuencias con homología a proteínas de la familia GST/mPGES-2 que fueron provisoriamente denominadas GST1 y GST2. Imagen tomada y modificada de ³⁵.

El análisis bioinformático mencionado, confirmó resultados inferidos anteriormente por Ströher y Millar en ⁹⁶ que proponían la existencia de dos secuencias con homología a proteínas de la familia GST/mPGES-2, que fueron provisoriamente denominadas GST1 y GST2. De estas dos, la GST1 es la estudiada en este trabajo y de ahora en más será referida como TbGST1. La TbGST1 se encuentra claramente relacionada a la prostaglandina E₂ sintasa microsomal de mamíferos (mPGES-2), una proteína emparentada tanto con GST solubles como con las GST de membrana. En mamíferos las mPGES-2 participan en la vía de síntesis de prostanoides catalizando la isomerización de PGH₂ a PGE₂ en una reacción que depende del GSH como cofactor "no redox" y de un dominio glutarredoxina con un sitio activo conservado del tipo "CXXC"^{35,97}.

La secuencia de TbGST1 presenta un 24% de identidad y un 38% de similitud con la secuencia de mPGES-2 de *Macaca fascicularis*, una especie de primate catarrino de la familia *Cercopithecidae*. En la **Figura 8** se presenta un alineamiento de secuencia donde se observa una conservación en la organización estructural de la proteína en tres dominios: I) Un dominio transmembrana (TMD, por sus siglas en inglés) en la región N-terminal; II) un dominio glutarredoxina con un sitio activo conservado conteniendo dos residuos de cisteína y III) un dominio C-terminal rico en hélices alfa ^{35,98,99}. La estructura tridimensional de la mPGES de *Macaca fascicularis* fue resuelta⁹⁸, lo cual permitió generar un modelo por homología de la TbGST1 e inferir un alto grado de conservación estructural entre ambas proteínas. Este análisis *in silico* sugiere que la GST1 de *Trypanosoma brucei* está estrechamente relacionada a la familia de las MAPEG y, en principio, podría ser capaz de sintetizar PGE₂.



Figura 8. Comparación de TbGST1 con mPGES-2 de Macaca fascicularis (MfmPGES-2). Se observa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos con tres dominios claramente conservados: Un dominio transmembrana resaltado en color rojo, un dominio glutarredoxina con un sitio activo conservado marcado en violeta y un dominio helicoidal encasillado en un recuadro en negro. Un modelado molecular de ambas proteínas predice un plegamiento tridimensional bien conservado. Imágenes gentilmente cedidas por el Dr. Bruno Manta.

Con el fin de evaluar la conservación de TbGST1 en organismos representativos de diferentes clados evolutivos, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas utilizando como sonda la TbGST1 desprovista de su región N-terminal. En la **Figura 9** se puede observar que TbGST1 posee homólogos distribuidos prácticamente en todos los eucariotas, con una marcada presencia en el filo Euglenozoa, lo que sugiere un rol conservado y relevante para el desarrollo de estos organismos.

Estudios de transcriptómica revelaron que el gen de TbGST1 se expresa en la forma BSF y PC, presentando en esta última un pico en la fase G2/M ^{100,101}. Por otro lado, estudios de proteómica sugieren que existen diferencias en el contenido de TbGST1 durante la diferenciación de LS a SS ¹⁰² así como también entre los estadios BSF y PC, aunque estos resultados son algo contradictorios y poco concluyentes^{103–105}.



Figura 9. Conservación de TbGST1 en la escala evolutiva. La secuencia de TbGST1 sin señal de localización subcelular se utilizó para realizar una búsqueda con la herramienta PSI/Delta-BLAST en la base de datos del NCBI y GeneDB. La marca verde indica la presencia de una secuencia que se considera ortóloga a la correlativa de T.brucei, mientras que la marca roja indica su ausencia. La marca en amarillo engloba situaciones de homología, pero con incertidumbre. Modificado de ³⁵.

Ensayos de silenciamiento masivo de un gran número de genes de *T. brucei* mediante la técnica de interferencia del ARN (ARNi) y en diferentes estadios del ciclo de vida, no asociaron efectos adversos en la proliferación al suprimir la expresión de TbGST1⁹⁹. Este resultado fue parcialmente confirmado en nuestro laboratorio para la forma BSF¹⁰⁰. En cuanto a la localización subcelular de TbGST1, varios estudios de proteómica han detectado su presencia en fracciones ricas en membrana: membrana plasmática^{108,109}, bolsillo flagelar¹¹⁰, membrana mitocondrial¹¹¹ y acidocalcisomas¹¹².

En un trabajo realizado en nuestro laboratorio¹⁰⁷, la sobreexpresión de TbGST1 en la forma infectiva de este patógeno nos permitió determinar que la misma se localiza en vesículas intracelulares (desarrollado en la sección 4.6) y que altos niveles de la misma no confieren ninguna ventaja selectiva ni generan efectos negativos para el patógeno tanto *in vitro*, al menos bajo condiciones normales de crecimiento,

como *in vivo* (modelo de infección murino) donde la infección se monitoreo por sobrevida de los animales y nivel de parasitemia. Sin embargo, estudios desarrollados en colaboración con la Dra. Camila de Olivera (Laboratorio de Inmunoparasitología, FioCruz Bahía, Brasil) mostraron que ratones infectados con parásitos sobreexpresantes de la TbGST1 presentan alteraciones significativas en el perfil de citoquinas séricas respecto de los controles de infección con las líneas de *T. brucei* salvaje o sobreexpresante de TbGST1 no inducida (no publicado).

Si bien preliminares, estos resultados nos permiten especular que la TbGST1 podría estar involucrada en la síntesis de PGE₂ y, por lo tanto, en la modulación de la respuesta inmune del hospedero frente a la infección. Por otra parte, resulta extremadamente interesante poder determinar el rol de las PGs producidas por parásitos en la patogénesis de varias enfermedades. En este sentido, la generación de líneas mutantes que involucren silenciamiento o KO de los genes de estas sintasas pueden poner en evidencia su función en el ciclo de vida y en el contexto de la infección. Además, el estudio de estas sintasas puede aportar a la identificación de características moleculares y funcionales que podrían ser explotadas en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En este marco se delinean los objetivos de este proyecto que busca elucidar la importancia y el rol de TbGST1 en un organismo de relevancia en el área de la salud animal y modelo para especies patógenas del ser humano.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

La proteína GST1 de *T. brucei* es una prostaglandina E₂ sintasa cuyo producto, la PGE₂, cumple algún rol importante en el curso del proceso infeccioso en un hospedero mamífero.

2.2 Objetivo general

Caracterización funcional de una glutatión-transferasa del tipo MAPEG en *Trypanosoma brucei brucei* (TbGST1).

2.3 Objetivos específicos

- A) Purificar y caracterizar bioquímicamente la forma recombinante de TbGST1,
- B) Generar líneas celulares de T. b. brucei (cepas mono y pleomórfica) deficiente (KO) en GST1,
- C) Caracterización fenotípica *in vitro* de *T. b. brucei* (cepas mono y pleomórfica) deficiente (KO), sobreexpresante (SE) y ARNi de GST1,
- D) Confirmar la localización subcelular de TbGST1 endógena,
- E) Determinar si TbGST1 tiene actividad PGE₂ sintasa a nivel celular,
- F) Determinar la concentración intracelular de TbGST1,
- G) Estudiar la capacidad infectiva (modelo murino) de las cepas SE y ARNi (mono y pleomórfica) de TbGST1,
- H) Poner a punto un modelo de infección no invasivo que permita determinar la localización de parásitos en el modelo crónico de la infección.

3. Materiales y Métodos

3.1 Generación de construcciones

Las construcciones para la generación de las líneas transgénicas y las construcciones para la expresión recombinante de TbGST1 fueron desarrolladas en conjunto con la Lic. Sofia Zardo y los detalles de metodología están descritos en¹⁰⁷.

La generación de la construcción que permite la expresión constitutiva del gen reportero de una versión de la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpyRE9H o RE9HLUC) que ha sido modificada para que su reacción con la luciferina de lugar a la emisión de bioluminiscencia a 617 nm¹¹³ se describe en¹¹⁴.

3.2 Expresión y purificación de TbGST1 recombinante en E. coli

Para la expresión de las formas recombinantes de TbGST1 se usaron las cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3), y BL21 CodonPlus (Agilent). La cepa BL21 CodonPlus fue cultivada en presencia del antibiótico Cam para mantener los plásmidos de esta cepa modificada.

La forma quimiocompetente de estas cepas fue preparada en nuestro laboratorio usando el método descrito en¹¹⁵. Para esto se crecieron colonias en placas de Petri con medio LB agar. Se tomó una colonia de una placa con la punta de un *tip* y se subcultivó en 10 mL de medio LB con (incubación *overnight* (ON.) a 37°C). 500 μ L de este cultivo se transfirieron a 50 mL de medio LB con 30 μ g/mL de cloranfenicol y se incubó este cultivo a 37°C con agitación vigorosa y monitoreo de absorbancia a 600 nm. Al alcanzar una absorbancia de 0.4 se transfirió el cultivo a un tubo de centrífuga estéril, el cual se enfrió en hielo por 10 min. Luego, las células se cosecharon mediante centrifugación a 1000 *g* por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 25 mL de medio LB frío por agitación suave. La suspensión celular se centrifugó a 1000 *g* por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 5 mL de solución fría de TSS (*transformation and storage solution*: 50 mM MgSO4, 5% (v/v) DMSO y 10% (p/v) PEG) en medio Iíquido LB 1/10 por agitación suave. Se centrifugo a 100 *g* por 10 minutos a 4°C y se resuspendió en 1 ml de medio LB. Se prepararon alícuotas que se congelaron a -80°C hasta su posterior uso.

La forma quimiocompetente de cada cepa fue transformada con los diferentes plásmidos de expresión de TbGST1 (en una relación de 10 μ L ADN/100 μ L de bacterias) mediante incubación en hielo (30 min) seguido de un shock térmico (90 segundos a 42°C) y resuspensión en 400 μ L de medio de cultivo SOC (Invitrogen) (Triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, glucosa 3,6 g/L, KCI 0,186 g/L, NaCI 0,5 g/L, MgCl2 0,96 g/L). Las células transformadas fueron incubadas 1 h a 37°C con agitación y luego sembradas sobre placas de LB agar (10 g/L Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl y 15 g/L agar) conteniendo ampicilina 100 μ g/ μ L. Al menos una colonia resistente por cada construcción fue criopreservada haciéndola crecer O.N. en medio de cultivo líquido LB, agregando 15% de glicerol y almacenando alícuotas de esta mezcla a -80°C hasta su posterior uso.

A partir de los criostocks generados se inoculó un precultivo en 5 mL de medio LB con ampicilina. El precultivo fue incubado O.N. a 37°C en una estufa con agitador a 220 rpm. Se ensayaron dos condiciones de expresión clásicas en medio 2YT ¹¹⁶ (16 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona y 5 g/L de

NaCl, ajustado a pH 7.4 con hidróxido de sodio) y dos condiciones de autoinducción en medio ZYM-5052 según detalla la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de inducción

Condición	Inducción clásica (2YT)	Autoinducción (ZYM-5052)
1)	1 mM IPTG, 4 hs, 37°C, 220 rpm	4 hs, 37°C, 220 rpm + O.N., 25°C, 70 rpm
II)	200 μM IPTG, O.N., 20°C, 220 rpm	48 hs, 20°C, 170 rpm

Al día siguiente, el cultivo fue escalado (dilución 1/100) a 150 mL de medio LB conteniendo los antibióticos correspondientes (en matraz de 500 mL). En el caso de la inducción clásica se creció el cultivo a 37°C y 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD600) de aproximadamente 0.8-1, luego de lo cual se procedió a la inducción de la expresión de la proteína de interés mediante el agregado de IPTG. Las células inducidas fueron cosechadas por centrifugación a 4000 *g* durante 10 min a 4°C y resuspendidas en amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH 7,8 con 300 mM NaCl (amortiguador A) suplementado con 1 mM de PMSF, 40 μ g/mL TLCK, 150 nM pepstatina, 4 nM cistatina, 100 μ g/mL aprotinina y 1 mg/mL de lisozima (amortiguador de lisis), en relación 5 mL/g de pellet celular húmedo. La suspensión celular se incubó 1 hr en hielo previo a su disrupción mediante 3 ciclos de sonicado en baño de hielo (Sonicador Branson 450, EUA) usando un programa de 1 segundo ON: 1 segundo OFF hasta completar 2 min totales en modo ON, generalmente usando el *macrotip* o *microtip* al 30% o 50% de potencia, respectivamente, y con descansos de 1-2 min en hielo entre ciclos. La suspensión celular sonicada se trató con aproximadamente 0,01 U/mL de ADNasa (Invitrogen) y 10 mM MgCl₂ y posteriormente se centrifugó a 20.000 *g* durante 1 hr a 4°C para remover el *detritus* celular. Se procedió al análisis de las proteínas presentes de las fracciones soluble e insoluble empleando SDS-PAGE al 12%.

3.2.1 Purificación de TbGST1 de la fracción insoluble

El proceso de purificación se esquematiza en la **Figura 15**, dentro de la sección "Resultados, Análisis y Discusión". Para purificar la proteína de interés de la fracción insoluble se centrifugó el sonicado y el pellet se resuspendió en amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl (amortiguador de lavado) con adición de 1% Triton X-100, y 1 M urea (10 mL/g). La suspensión fue centrifugada (30.000 g, 20 min, 4°C) y sometida a tres ciclos de lavado con amortiguador de lavado. Para facilitar la resuspensión se la sometió a 2 ciclos de sonicado como se describió anteriormente. A continuación, la suspensión se ultracentrifugó a 125.000 g por 1 h a una temperatura de 4°C.

El pellet se resuspendió en amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7,5 con 8 M urea, 1 mM DTT y 1 mM PMSF (amortiguador de extracción) y se incubó O.N. a temperatura ambiente en una rueda giratoria. La suspensión se dializó en una membrana de diálisis (Sigma Aldrich, MWCO 12 kDa) contra 1 L de amortiguador de lavado O.N. con agitador magnético, y posteriormente se ultracentrifugó nuevamente (125.000 g, 1 h, 4°C).

Dado que TbGST1 aún se encontraba en el pellet de la última centrifugación, se procedió a resuspender el pellet en 10 mL de amortiguador A + 6 M Urea (Amortiguador A1). Esta fracción fue filtrada por filtros de 0,45 µm (Sartorius) y cargada en una columna de IMAC conteniendo 5 mL de resina con iones de níquel inmovilizados (IMAC-Ni⁺²; Ge healthcare), previamente equilibrada en amortiguador A1, con un flujo de 1-2 mL/min. La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna (VC) de amortiguador A1 y se colectó conjuntamente la fracción no unida de la siembra y este primer lavado (fracción "Fracción no unida 1"). La columna cargada se lavó con 5 mL de 4% de amortiguador A1 conteniendo 500 mM imidazol (amortiguador B) y la proteína unida fue eluida aplicando un gradiente lineal de 4 a 60% de amortiguador B en 8 minutos a un flujo de 1 ml/min en cromatógrafo AKTA (GE) con detección UVvisible en línea a 280 nm. Se colectaron fracciones de 1 mL en placa "Deep well" de 96 pocillos (A1-B20).

La muestra eluida de la columna IMAC-Ni⁺² se sometió a una segunda purificación en una matriz de cobalto (IMAC-Co⁺²) (columna empaquetada con resina de Co⁺² Thermo 89965). Para esto primero fue necesario reducir la concentración de imidazol diluyendo la muestra 10 veces en amortiguador A. La muestra diluida se concentró por ultrafiltración en un AMICON (Sigma) de 10 KDa de corte de peso molecular y se inyectó en la columna de IMAC-Co⁺² (volumen de resina de 2 mL). Los pasos de lavado y elución fueron los mismos descritos anteriormente para la purificación por IMAC-Ni⁺². El pico correspondiente a la proteína de interés (cuya identidad fue confirmada luego por electroforesis y espectrometría de masas) fue colectado, concentrado, filtrado por 0,22 μ m y almacenado a 4° en amortiguador A1.

3.2.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó con el ensayo del ácido bicinconínico (kit BCA1 Sigma-Aldrich) adaptado para lectura en microplaca según las instrucciones del fabricante. Para la curva de calibración se utilizó una solución de BSA 1 mg/mL preparada al momento de su uso.

3.3 Producción de anticuerpos anti-TbGST1

Para la generación de anticuerpos específicos anti-TbGST1 (**Figura 10**) dos ratones hembra Balb/cJ (6-8 semanas) se inmunizaron con 250 μ L de una mezcla 1:1 de TbGST1(-)TMD recombinante purificada (aproximadamente 75 μ g) y adyuvante completo de Freund. A los 21 días se dio un *booster* con igual cantidad de proteína en una mezcla 1:1 con adyuvante incompleto de Freund. A los 42 días se inyectó un segundo *booster* con menor cantidad de proteína (aproximadamente 35 μ g) en una mezcla 1:1 con adyuvante incompleto de Freund. A los 42 días se inyectó un segundo *booster* con menor cantidad de proteína (aproximadamente 35 μ g) en una mezcla 1:1 con adyuvante incompleto de Freund para incrementar la afinidad de los anticuerpos contra TbGST1, al mismo tiempo que se extrajo una muestra de sangre de cada ratón por punción submandibular para evaluar por *Western blot* la capacidad de detección de la proteína de interés por parte de los sueros. A los 52 días de la inmunización se efectuó el sangrado final, previa anestesia total de los animales. El suero fue separado de la sangre coagulada y otras células por centrifugación a 500 *g* por 5 min a temperatura ambiente.



Figura 10. Esquema representativo del protocolo de inmunización con TbGST1(-)TMD recombinante purificada. Se extrajo sangre para ensayos de western blot los días 42 y 52.

3.4 Cultivos celulares de T. brucei

En el presente trabajo se utilizaron como líneas parentales dos líneas modificadas de la forma sanguínea (BSF) de *T. brucei* cepa 427. Por un lado, la línea monomórfica 514-1313 que contiene integrado en su genoma las secuencias que codifican para la expresión constitutiva de T7-ARN polimerasa y dos copias del gen para la proteína represora de tetraciclina¹¹⁷. Por otro lado, la cepa pleomórfica AnTat 1.1-1313 que expresa la proteína represora de tetraciclina de manera constitutiva^{117,118}.Estas líneas fueron gentilmente cedidas por la Dra. Christine Clayton (ZMBH, Heidelberg, Alemania).

Los parásitos se cultivaron en medio HMI-9 completo, compuesto por *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM - Invitrogen) suplementado con bactocupreína 28,2 µg/mL, timidina 39 µg/mL, hipoxantina 0,136 mg/mL, L-cisteína 0,182 mg/mL, β -mercaptoetanol 0,143 M, 10% v/v de suero fetal bovino libre de tetraciclina (Invitrogen) y penicilina/estreptomicina 50 U/mL y 50 µg/mL respectivamente (concentración final).

En el caso de la línea 514-1313 WT se adicionaron al medio de cultivo gentamicina 0,5 μ g/mL y bleomicina 0,2 μ g/mL mientras que en el caso de la línea AnTat 1.1-1313 WT sólo se adicionó al medio de cultivo bleomicina 0,2 μ g/mL. En el caso de líneas transgénicas se agregó higromicina 5 μ g/mL como antibiótico de selección. La incubación se realizó en condiciones aeróbicas en estufa húmeda con temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

El cultivo de la cepa monomórfica se mantuvo en densidades entre 1-5 millones de parásitos/mL mientras que la cepa pleomórfica se mantuvo en densidades menores a 1,5 millones de parásitos/mL para evitar su diferenciación a la forma no replicativa SS.

Los recuentos de parásitos se realizaron en cámara de Neubauer (Precicolor HBG, Germany) diluyendo los cultivos en amortiguador fosfato salino (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM y KH₂HPO₄ 1,76 mM, pH 7,4) con glucosa al 1% (p/v) (PBS-G) inmediatamente antes de su conteo, considerándose como células viables aquellas que tenían movilidad y eran morfológicamente normales.

Para la generación de criostocks se cosecharon cultivos en fase de crecimiento exponencial por centrifugación a 2.000 g por 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron de forma tal de obtener 10 millones de parásitos en 1 mL de medio de cultivo HMI-9 completo con glicerol 10% v/v y con los antibióticos apropiados. Los criotubos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.5 Transfección de líneas celulares de T. brucei

La generación de las líneas transgénicas se realizó en conjunto con otros miembros de nuestro grupo de investigación y la metodología de generación y selección de las líneas se encuentra descrita en ¹⁰⁷. Para la transfección, se cosecharon aproximadamente 30 millones de parásitos de la línea celular deseada en fase de crecimiento exponencial media (0,7-1 x 10 millones de parásitos/mL) por centrifugación a 1500 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizó un lavado de volumen igual al volumen de partida con Cytomix (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂) y los parásitos se resuspendieron en 100 µL de solución de nucleofección preparada fresca (combinando 81,8 µL de Basic Parasite Nucleofector Solution 1 con 18,2 µL de Supplement 1, correspondientes al kit Basic Parasite Nucleofector Kit 1, Lonza). Se agregaron 5 µL de la construcción de ADN elegida (10 µg en total), previamente linealizada con la enzima de restricción NotI-HF (New England Biolabs) (para favorecer su integración por recombinación homóloga) y concentrada por precipitación con acetato de sodio e isopropanol. La mezcla ADN/parásitos se colocó en una cubeta de electroporación (Lonza) de 2 mm y se aplicó el programa de electroporación X-001 del equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). A continuación, lamezcla de transfección se transfirió a 30 mL de medio de cultivo HMI-9 completo conteniendo los antibióticos correspondientes a la cepa parental y luego se realizaron dos diluciones seriadas 1:10 en un volumen final de 30 mL con el mismo medio de cultivo fresco. Para la selección clonal de los parásitos transfectados, las tres preparaciones se distribuyeron en tres placas de 24 pocillos (1 mL por pocillo, Placas A, B y C en orden de dilución) y fueron incubadas en las condiciones de cultivo descritas en la sección anterior. Luego de 24 hs, se adicionó 1 mL/pocillo de medio de cultivo fresco suplementado con el antibiótico de selección que correspondiera (de manera tal de alcanzar una concentración final de 5 µg/mL para Higromicina y Blasticidina y 0,8 µg/mL para Puromicina. Los clones viables fueron bautizados según su posición en la placa y repicados en medio de cultivo fresco con antibiótico de selección. Se procedió a criopreservar cada uno de estos clones de acuerdo con la técnica descrita en la sección anterior.

3.6 Inmunoensayos

3.6.1 Cosecha de parásitos

Una cantidad deseada de parásitos en fase de crecimiento exponencial (0,5-2 millones de parásitos por mL) fueron cosechados mediante centrifugación a 2.000 *g* por 10 min a temperatura ambiente. El pellet fue lavado dos veces con un volumen de PBS igual al volumen de la cosecha. Tras el último lavado, el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS y se procedió al recuento celular en cámara de Neubauer. Por último, se centrifugó en minífuga por 5 min, se retiró el sobrenadante y las muestras se acondicionaron para su posterior análisis por inmunofluorescencia o *Western blot*.

3.6.2 Western blot

Luego del recuento de parásitos, se resuspendió el pellet en un volumen de PBS conteniendo amortiguador de carga 1X (preparado al 5X: Tris 62,5 mM pH 6,8, con 2 % (p/v) dodecilsulfato de sodio (SDS), 10 % (v/v), glicerol, 0,01 % (p/v), 5 % v/v β -mercaptoetanol (aproximadamente 710 mM final) y una punta de espátula de azul de bromofenol) de manera tal de obtener 5 millones de parásitos en 20 μL. La muestra se calentó en un termobloque a 100°C por 5 min, se centrifugó en minífuga por 5 min y se guardó a -20°C hasta su uso. El extracto de proteína fue separado por SDS-PAGE 12% y electrotransferido a una membrana de PVDF a corriente constante (450 mA) durante 3 hs en baño de hielo. Luego de la transferencia las membranas fueron bloqueadas en PBS con 4% (p/v) de leche en polvo descremada (PBS-L) en cámara fría O.N. con agitación orbital a 90 rpm. Se realizaron dos lavados con 50 mL de PBS con Tween-20 al 0,2% (v/v) (PBS-T) por 5 min cada uno. Para la inmunodetección de TbGST1 se utilizó un suero murino generado como se describe en la sección 3.3 a una dilución 1:500 o, para la versión etiquetada con c-Myc de esta proteína, un anticuerpo comercial anti-c-Myc (Roche) a una dilución 1:2000. Como control de carga se recurrió a la detección de la triparredoxina (una proteína abundante en BSF de T. brucei¹¹⁹). con un suero de conejo anti-TXN (dilución 1:32.000) cedido gentilmente por la Dra. Krauth-Siegel (Heidelberg, Alemania). En todos los casos la membrana se incubó en presencia de los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en PBS-T con 4% (p/v) de leche en polvo descremada (PBS-T-L) durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación orbital a 60 rpm. Luego la membrana se lavó 3 veces con PBS-T (5 min a 80 rpm/lavado) y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (Invitrogen): anti-ratón (1:20.000) o anticonejo (1:40.000) en PBS-T-L por 45 min a temperatura ambiente con agitación orbital 60 rpm. Finalmente se lavó la membrana 4 veces con PBS-T más un último lavado con PBS bajo las condiciones descritas anteriormente. La detección de la peroxidasa se desarrolló por quimioluminiscencia con el kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante y las láminas radiográficas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) se revelaron utilizando la máquina de revelado Hyperprocessor (Amersham Biosciences).

3.6.3 Inmunofluorescencia indirecta

Luego del recuento de parásitos, se resuspendió el pellet en *p*-formaldehído 4% p/v en PBS (50 μ L cada 1 millón de parásitos) y se incubó por 18 min a temperatura ambiente para permitir el proceso de fijación de las estructuras celulares. Se realizaron 3 lavados con PBS-G, intercalados con centrifugaciones a 2.000 *g* durante 10 min a temperatura ambiente y por último el pellet se resuspendió en PBS de forma tal de obtener 1 millón de parásitos/50 μ L (una gota). Se colocaron dos gotas en un portaobjeto recubierto con poli L-lisina (Starfrost) y se incubó O.N. en camara húmeda para permitir la adhesión de las células a la superficie.

Al día siguiente las membranas de los parásitos se permeabilizaron con una solución de Tritón X-100 0,2% (v/v) en PBS (20 min, temperatura ambiente). Luego de tres lavados con PBS se bloqueó con una solución de BSA 0,2% p/v en PBS filtrada a 0,22 μ m (PBS-BSA) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS, los portaobjetos fueron incubados O.N. a 4°C en cámara húmeda con 100 μ L de los diferentes anticuerpos primarios diluidos en PBS- BSA: dilución 1:250 para el suero anti-Tb-GST1; 1:500 para el anti-c-Myc. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS e inmediatamente se

incubó durante 45 min en oscuridad con 100 µL de una dilución 1:1.000 en PBS-BSA del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen), para el caso del suero anti-TbGST1, o al anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa 594 (Invitrogen), para el caso del anticuerpo anti-c-Myc. Por último, se realizaron 5 lavados con PBS y se agregó una gota del líquido de montaje Fluoroshield con DAPI (Sigma) sobre la cual se colocó el cubreobjetos y se procedió al sellado perimetral con esmalte de uñas.

Los preparados se observaron con el microscopio confocal Zeiss LSM880 con asistencia técnica de Marcela Díaz (Unidad de Microscopia, Institut Pasteur de Montevideo) empleando láseres y juegos de filtros que permitieran las siguientes longitudes de onda de excitación: 579, 495 y 461 nm para la detección de las señales correspondientes a los fluoróforos Alexa 594, Alexa 488 y DAPI, respectivamente. Se tomaron imágenes de distintos planos del eje Z utilizando un *zoom* 4X y lente objetivo 100X de inmersión en aceite. Las imágenes seleccionadas fueron deconvolucionadas con el software Huygens (versión profesional 19.04, Scientific Volume Imaging, The Netherlands, http://svi.nl). Para el procesamiento de imágenes se utilizó el programa Fiji¹²⁰. Los tres canales (campo claro, DAPI y fluorescencia) se separaron utilizando el comando "Split channels" y se procesaron por separado. Para las imágenes de DAPI y fluorescencia que contaban con varias adquisiciones en el eje Z se utilizó el comando "Z Project" en su función "Max intensity" que elige el píxel de máxima intensidad en cada adquisición para componer una nueva imagen en un único plano del eje Z. Para superponer los tres canales se utilizaron los comandos "Composite – merge channels" y "make composite to rgb".

3.7 Recuento por citometría de flujo

El recuento de parásitos por citometría de flujo se realizó en un citómetro BD Accuri C6 con el apoyo técnico de la Msc. Paula Céspedes, de la Unidad de Biología Celular del Instituto. Se tomó 1 mL del cultivo (densidad entre 1 y 5 millones de parásitos) y se agregó loduro de Propidio, un intercalante de ADN que permite discriminar la población de parásitos viables de la no viable, a una concentración final de 2 μ g/mL. En un experimento "control" 3 muestras de parásitos en fase exponencial y densidad celular conocida determinada por recuento manual fueron utilizadas para ajustar los marcos (*gates*) de la región de interés y establecer los parámetros óptimos de adquisición de datos. Antes de iniciar el análisis de las muestras se realizó un lavado con 400 μ L de etanol seguido de un lavado con 400 μ L de H₂O y se procedió al recuento celular en un volumen de 400 μ L por muestra. Las células se excitaron con láseres de 488 nm y se midió la dispersión frontal (forward-scatter) en función de la dispersión lateral (side-scatter) para discriminar las células de los detritos celulares en un gráfico de puntos forwards vs side-scatter con ambos ejes en escala logarítmica. La señal del ioduro de propidio se observó con un detector de fluorescencia de 670 LP (filtro long pass) y se graficó en histograma de eventos *vs* fluorescencia de PI con este último en escala logarítmica. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software BD Accuri C6 software.

3.8 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico de *T. brucei* BSF se cosecharon 100 millones de parásitos por centrifugación (2.000 g, 10 min, 4°C) y se lisaron con 1 mL de TRI REAGENT (Invitrogen) mediante pipeteo suave. La muestra se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y a continuación se agregó

0,2 mL de cloroformo. Luego de agitar de forma vigorosa por 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Por último, el lisado se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C. La centrifugación separa la mezcla en 3 fases, una fase orgánica inferior de color rojo (que contiene proteína), una interfase (que contiene ADN) y una capa acuosa incolora superior (que contiene ARN). Con sumo cuidado se removió y descartó la fase acuosa superior. A continuación, se precipitó el ADN agregando 0,3 mL de etanol 100% v/v, mezclando por inversión e incubando durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 15.000 g por 15 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante y el pellet de ADN se incubó durante 30 min con 1 mL de citrato de sodio 0,1 M conteniendo 10% v/v de etanol. Este paso se repitió una vez más. Por último, se centrifugó la muestra (15.000 g, 5 min, 4°C) y el pellet se resuspendió en amortiguador 10 mM Tris/HCl pH=8,5 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.9 Generación de líneas *knock-out* para TbGST1

3.9.1 Producción por PCR de fragmentos para knock-out de TbGST1

Las construcciones conteniendo los casetes UTR-BLA-UTR y UTR-PURO-UTR (sección 1.17.1) fueron generadas por BIOBASIC (Canada). Estas construcciones fueron transformadas en células competentes XL1 (la preparación de células competentes y la transformación se realizó como se describe en la sección 3.2). Las colonias obtenidas fueron subcultivadas en medio LB y el cultivo se incubó en estufa a una temperatura de 37°C con agitación a 220 rpm hasta alcanzar una densidad OD600 de aproximadamente 1. El ADN plasmídico fue purificado (PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep kit, Invitrogen) seguido de precipitación con isopropanol (según las instrucciones del fabricante) y resuspendido en 1 mL de amortiguador Tris/HCl 5,0 mM pH= 8,5 (concentración final 553 ng/ μ L). Los casetes fueron amplificados por PCR utilizando los cebadores Cebador Fo y Cebador Re (ver anexo, sección 7.2) empleando la enzima ADN Polimerasa Pfx50 (Invitrogen), junto con el mix de reacción y aplicando el programa de amplificación descritos en la Tabla 2.

Mix Reacción	Volumen X1 (μL)					
H ₂ O	17,25	Programa		Programa Temperatura		
10x PCR Bufffer	2,5	Desnaturalización inicial		94°C	2 min	
10 mM dNTP mix	0,75	25	Desnaturalización	94°C	15 seg	
Pfx50 (5 U/mL)	0,3	35 ciclos	Hibridación	62°C	25 seg	
10 μM Cebador Fo	1,25	CICIOS	Extensión	68°C	45 seg	
10 μM Cebador Re	1,25	Extensión final		68°C	5 min	
DNA (dil 1/1000)	2		-			
Vol Total	25*	*Se prepararon 4 reaccio		les de 25 ul nor c	ondición	

Tabla 2. Mix de reacción y programa de PCR

*Se prepararon 4 reacciones de 25 μ L por condición

El rendimiento de los productos de PCR estuvo en el orden de los 500 ng/ μ L (en un volumen total de 100 µL, correspondiente a 4 reacciones) y la integridad/tamaño de los amplicones fue confirmado por análisis en gel de agarosa antes de proceder a su purificación por extracción en fenol/cloroformo. Para la extracción se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente por un min. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente por 10 min a 16.000 g. La fase acuosa superior (que contiene el ADN) se transfirió a un tubo fresco teniendo cuidado de no transferir fenol. Se agregó un volumen de cloroformo y se repitió el proceso. A continuación, se realizó una purificación por precipitación con etanol, donde se agregaron 2,5 volúmenes de etanol 95% v/v y 1/10 del volumen original de acetato de sodio 3 M. La mezcla se incubó por 30 min a -80°C y se centrifugó a máxima velocidad por 15 min a 4°C. El pellet se lavó con 1 mL de etanol 70% v/v y se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a temperatura ambiente. Por último, el ADN se resuspendió en 5 μ L de agua estéril para ser utilizado en la transfección.

3.9.2 Genotipado de líneas transfectadas

La transfección de los casetes se realizó como se describe en la **sección 3.5**. Para confirmar el remplazo de la secuencia endógena de TbGST1 por el casete UTR-BLA-UTR se procedió a amplificar estas secuencias a partir del ADN genómico de la línea transfectada empleando diferentes combinaciones de cebadores. Se diseñaron dos juegos de cebadores, un juego flanquea las regiones UTR de TbGST1 (5UTRGST1Fo y 3UTRGST1Re) mientras que el otro se ubica en el marco abierto de lectura de los genes contiguos (DWORFGST1 y UPORFGST1) (ver anexo, **sección 7.2**). La composición de la reacción de PCR y del programa de amplificación se detalla en la Tabla 3.

Mix Reacción	Volumen X1 (μL)						
H ₂ O	14,45	Programa		Temperatura	Tiempo		
10x PCR Bufffer	2,5	Desnaturalización inicial		94°C	3 min		
50 mM MgCl ₂	0,75		25	Desnaturalización	94°C	30 seg	
10 mM dNTP mix	° mix 0,5	35 ciclos	Hibridación	60°C	30 seg		
Taq Polymerase	0,3			CICIOS	Extensión	72°C	3 min
10 μM Cebador Fo	1,25		Extensión final		72°C	10 min	
10 μM Cebador Re	1,25	-					
DNA ~200 ng	4						

Tabla 3. Mix de reacción y programa de PCR

3.10 Evaluación de la producción de PGE₂ por las líneas transgénicas de *T. brucei*

3.10.1 Cuantificación por ELISA

Se cultivaron las líneas celulares Tb 514-1313 WT y Tb 514-1313 SE hasta alcanzar una densidad de 2 millones de parásitos/mL. En una placa de 96 pocillos, se colocaron por pocillo 200 μ L de una suspensión conteniendo 10 millones de parásitos en medio de cultivo HMI-9 completo y suplementado con diferentes concentraciones de ácido araquidónico (0 μ M, 3 μ M, 7 μ M and 15 μ M). La placa se incubó durante 2 o 6 hs en condiciones aeróbicas en estufa húmeda con temperatura de 37°C y 5% de CO₂. La placa fue centrifugada a 2.000 g y los sobrenadantes fueron colectados y congelados a -20°C hasta su

análisis. Se analizó la presencia de PGE₂ en los sobrenadantes utilizando el *Prostaglandin E₂ ELISA kit* (Cayman chemical), según las instrucciones del fabricante. El mismo se basa en la competencia entre la PGE2 incógnita y un *tracer* (control) compuesto por PGE2 unida a la proteína acetilcolinesterasa (PGE2-AChE) por la reacción con un anticuerpo monoclonal anti-PGE2 agregado en concentración limitante. La concentración del *tracer* se mantiene constante mientras que la concentración de PGE2 varía en las diferentes muestras, por lo que la cantidad de *tracer* que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de PGE2 en el pocillo. La adición de una solución que contiene acetilcolina y DTNB provoca una reacción enzimática, donde la AChE convierte acetilcolina en tiocolina y esta última reacciona con el DTNB para dar un producto de color amarillo que presenta una fuerte absorción a 412 nm. La intensidad de este color se determina en un espectrofotómetro y se correlaciona con la cantidad de PGE2 libre en cada pocillo.

3.10.2 Análisis de la producción de PGE₂ por espectrometría de masas

La producción de PGE₂ por las líneas 514-1313 SE y 514-1313 ARNi se analizó por la técnica de HPLC acoplada a espectrometría de masas. Cada línea celular fue cultivada en ausencia (-Tet) y presencia (+Tet) de oxitetraciclina 1 µg/mL durante 48 hs y se cosecharon aproximadamente 130 millones de parásitos por centrifugación a 2.000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS-G de volumen igual al volumen de cosecha y el pellet de parásitos se resuspendió en un volumen final de 360 µL de medio de cultivo HMI-9 completo sin suero fetal bovino y conteniendo 70 µM de ácido araquidónico ⁶⁵. Los parásitos se incubaron por 30 min en condiciones aeróbicas en estufa húmeda a 37°C y 5% de CO₂ y luego se separó la muestra de sobrenadante mediante centrifugación a 2.000 g por 10 min a temperatura ambiente.

A los sobrenadantes de cada muestra se les agregaron 2,5 µL de una mezcla de estándares internos deuterados de PGE₂, PGD₂ y 5-HETE (ácido 5-hidroxieicosatetraenoico) a 500 pg/µL (d4-PGE₂, d4-PGD₂ y d8-5HETE respectivamente) y posteriormente se agregó metanol 20 % v/v en H₂O con 0,1 % v/v de ácido fórmico en proporción 1:1 (v:v). Se agitaron vigorosamente las muestras y se incubaron a -20 °C por 30 min. Por último, las muestras se centrifugaron a 14.000 q, 4 °C, 30 min y se procedió a la extracción en fase sólida. Para esto se pre-trataron columnas Strata-X 33 μm, 60 mg /3 mL (PN 8B-S100-UBJ, Phenomenex) con metanol (2 x 1 mL) y posteriormente se equilibraron con metanol 10 % v/v en H₂O pH 3 – 3,5 (2 x 1 mL). Las muestras, que poseen una concentración de metanol de 10% v/v, se siembran en las columnas de SPE pre-equilibradas a presión atmosférica. Las columnas fueron lavadas con metanol 10 % v/v en H₂O pH 3 – 3,5 (2 x 1 mL) y luego se aplicó vacío (10-15 mm Hg) por 5 min empleando un manifold (PN: AH0-6023, Phenomenex). Los metabolitos de interés y estándares fueron eluídos de las columnas mediante la adición de 1 mL de metanol, el cual luego se evaporó en speedvac (SPD1010, Thermo) a 45 °C hasta sequedad (aproximadamente 2 hs). A su vez, el método de extracción en fase sólida descrito permite extraer también ácidos grasos no modificados, por lo que se monitorizaron transiciones correspondientes con el ácido araquidónico (303/259 y 303/205) para evaluar su consumo por parte de las muestras.

Las muestras se resuspendieron en 50 μ L de metanol 50 % v/v en H₂O y fueron analizadas por HPLC-MS/MS en la Unidad de Espectrometría de Masas del CEINBIO, Facultad de Medicina. El método de análisis empleado se basa en una cromatografía líquida realizada en una columna de fase reversa (Luna C-18(2), Phenomenex, 5 μ m, 100 x 2,0 mm) empleando un gradiente de acetonitrilo (30 – 100 %) con 0,15 % v/v de ácido fórmico en agua por 15 min a un flujo de 300 μ L/min. Posteriormente se emplea un espectrómetro de masas (QTRAP4500, ABSciex) en modo triple cuadrupolo con un método MRM

(*Multiple Reaction Monitoring*) en modo negativo, diseñado y optimizado para monitorear transiciones características de prostaglandinas (más detalles en **Figura 32**).

El tratamiento de los sobrenadantes de cultivo y el análisis por espectrometría de masas se realizaron en una gentil colaboración con Msc Mauricio Mastrogiovanni y Dr. Homero Rubbo integrantes de dicha Unidad.

3.11 Cuantificación de bioluminiscencia (actividad luciferasa)

Para evaluar la actividad de la luciferasa de los diferentes clones de la línea AnTat-SE GST1-LUC fue primero necesario sincronizar los cultivos mediante repiques cada 24 hs sembrando a una densidad de $4x10^4$ parásitos/mL en medio HMI-9 completo en placas de 24 pocillos. Se empleó el kit Luciferase Assay System (Promega) para determinar la actividad luciferasa. Para esto, primero se equilibró el amortiguador de lisis y el Luciferase Assay Reagent (LAR) a temperatura ambiente. Se cosecharon 1 millón de parásitos de cada clon en eppendorf de 1,5 mL seguido de dos lavados con 1 mL de PBS intercalados con centrifugaciones de 10 min a 2.000 *g*. Se agregaron 200 µL de amortiguador de lisis 1X a cada tubo y se agitó vigorosamente durante 2 min. Se centrifugó a 12.000 *g* por 2,5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Los parámetros de adquisición del luminómetro (LUMIstar OPTIMA, BMG Labtech) fueron ajustados a una ganancia de 4095, con medidas de 10 s seguido de un retardo entre medidas de 0,2 s. Se mezclaron 50 µL de LAR con 20 µL del lisado de parásitos por pipeteo suave en una placa negra de 96 pocillos (Greiner F-Bottom #655209). La placa se colocó de forma inmediata en el luminómetro y se inició la lectura de la señal. Los resultados se guardaron en una planilla de Excel y fueron posteriormente analizados.

3.12 Ensayos de Infección

Para el estudio del rol de TbGST1 en el contexto de la infección se trabajó con hembras Balb/cJ de entre 6 y 8 semanas criadas en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo. Los procedimientos experimentales se realizaron acorde a la reglamentación nacional (Ley 18611) bajo un protocolo de experimentación aprobado por la Comisión de Ética de Uso Animal (CEUA; Protocolo 004-11) del propio instituto. La salud de los animales y su sobrevida fue monitoreada diariamente por personal de nuestro laboratorio y la parasitemia fue evaluada por recuento manual en cámara de Neubauer. Los animales que presentaran salud muy deteriorada o niveles de parasitemia ≥10⁸ parásitos/mL fueron inmediatamente eutanasiados. La infectividad de cada una de las líneas celulares (monomórficas: Tb SE-GST1, Tb RNAi-GST1 y pleomórfica: Tb AnTat-SEGST1-LUC) se estudió inoculando parásitos BSF por vía intraperitoneal a grupos de ratones (n=6). Por animal se inyectaron 10.000 parásitos provenientes de cultivos en fase exponencial media y resuspendidos en un volumen de 0,2 mL de medio HMI-9 completo fresco y estéril. Se trabajó con 2 grupos de animales por línea celular, uno de los cuales recibió agua con 1 mg/mL de oxitetraciclina desde 3 días antes de la infección y con reposición cada 48 hs (+Tet) y otro que recibió agua sin oxitetraciclina (-Tet). Los grupos -Tet y +Tet fueron infectados con parásitos de cada línea celular en fase exponencial de crecimiento, que fueron cultivados durante 48 hs en medio de cultivo sin o con oxitetraciclina (1 μg/mL),
respectivamente. La inducción *in vivo* de las líneas transgénicas fue evaluada por *Western blot* como se detalla en la sección 3.6.2.

El recuento de parásitos en sangre se realizó a partir de aproximadamente 50 µL de sangre obtenida por punción del seno submandibular colectada en tubos con EDTA tripotásico (3K-EDTA, preparado por dilución de 70 µL de 3K-EDTA comercial en PBS con 2 mM EDTA (PBS-E) hasta un volumen final de 1 mL) en una relación 1:7 de anticoagulante: sangre. La sangre anticoagulada se homogeniza por agitación suave y se diluye 20 veces en amortiguador de lisis de eritrocitos (preparado en agua como stock 10X: 0,8% (p/v) NH₄Cl, 0,084% (p/v) NaHCO₃ y 0,038% (p/v) Na₂-EDTA, y filtrado por 0,22 µm), como se detalla en¹²¹. Cuando disminuye la turbidez de la muestra producto de la lisis de glóbulos rojos se realiza una dilución al medio en PBS-G para mantener la viabilidad de los parásitos hasta su recuento en cámara de Neubauer. Posteriores diluciones para facilitar el recuento se realizaron en PBS-G. El límite de detección del recuento manual en sangre es de 2,5x10⁴ parásitos/mL. En las muestras donde no se observaron parásitos en el recuento manual se anotó el límite de detección para el tratamiento estadístico de los datos.

Para los ensayos de imagenología, los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal con D-luciferina (Perkin Elmer) 150 mg/kg y luego de 2-4 min fueron anestesiados con 2-5% de isofluorano en oxígeno y colocados en posición ventral en el receptáculo para animales del equipo de imagenología Xtreme II (Bruker). La emisión de luminiscencia y las imágenes de rayos X fueron adquiridas a temperatura ambiente, con detector de carga acoplada de cuatro megapíxeles retroiluminado y software Molecular Imaging "MI" 7.5 win para adquisición de imágenes en dos modalidades, luminiscencia y rayos X (reflectancia alternativa).

La configuración para la modalidad de luminiscencia fue: High sensitivity mode, Binning 4 x 4 pixels, Time lapse 30 seconds exposure time/Interval 60 seconds, Field of view 190 mm, fStop 1.1, Focal plane 0, Tray Focal reference, Stop After 20 or 10 minutes, delivering 20 or 10 luminescence's pictures, respectively.

Para la modalidad de rayos X se empleó el siguiente protocolo: High speed sensitivity mode, No Binning, 4 seconds exposure time, Field of view 190 mm, fStop 5.60, Focal plane 0, X ray Focal reference.

Para la modalidad de reflectancia la configuración fue: High sensitivity mode, No Binning, 0.1 seconds exposure time, Field of view 190 mm, fStop 1.1, Focal plane 0, Tray Focal reference.

Con esta configuración se tomaron 20 imágenes de luminiscencia y una imagen de rayos X. Las imágenes en formato BIP se analizaron utilizando el software FIJI. Primero las imágenes BIP se convirtieron a un *stack* en formato TIF. Un *stack* agrupa las 20 imágenes con diferencia de intensidad en el eje Z. Para la visualización de imágenes, a partir del *stack* de imágenes se obtuvo una única imagen (1 único valor en el eje Z) donde se asigna el máximo valor de intensidad para cada píxel. A esta imagen se le asignó una paleta de colores (Fire Look-Up Tables) para el rango de intensidad de luminiscencia y se solapó con la imagen de rayos X.

Para la comparación de imágenes de diferentes días, se asignó para el máximo de intensidad (color amarillo) el valor máximo para una imagen de 16 bits que equivale a 65535 "gray values". Para la visualización de la localización de los parásitos en un día específico, se asignó para el máximo valor de intensidad (color amarillo) el valor máximo registrado para esa imagen.

Para el cálculo de intensidades, se seleccionó una región de interés (ROI) utilizando un macro generado por nuestros colegas de la Unidad de Microscopía del Institut Pasteur de Montevideo (Técnico asistente Tabaré de los Campos). Este macro utiliza la imagen de rayos X para definir la ROI que es igual al

contorno de cada ratón. Esto posibilita realizar una comparación entre ratones que toma en cuenta su tamaño y posición a la hora de adquirir la imagen. Para obtener la ROI primero se abre la imagen de rayos X y se cambia su escala para medir en pixeles mediante los comandos: Analyse, Set scale, Click to remove. Se abre el macro, se obtienen las ROI y se guardan en un archivo ZIP.

Las regiones de interés seleccionadas se utilizan sobre el *stack* de las imágenes de luminiscencia para cada día, siguiendo estos pasos: Se abre el *stack* y se ajusta el tamaño con los comandos: Image, Adjust Size, 2048px. Se abre el zip con las ROI y se selecciona de a uno por vez cada ratón. Se toma la medida de intensidad con el comando: Multi measure (hacer click en "Append results"). Los resultados de cuantificación de la intensidad se despliegan en una ventana emergente y se graban en un archivo Excel formato .xls. De esta forma, la luz emitida, expresada en unidades arbitrarias de luminiscencia adquiridas durante 30 seg, es normalizada por la ROI seleccionada para cada ratón y graficada en función del tiempo.

Para el análisis de intensidad de luminiscencia entre grupos en el curso de la infección se tomó el valor máximo de intensidad para cada ratón en cada día y se graficó como Luminiscencia/Área.

Para el tratamiento estadístico se realizó un análisis de supervivencia utilizando la prueba de log-rank (Mantel-Cox) del programa de software GraphPad Prism (versión 6.0). Para el análisis parasitemia se realizó la prueba de Mann Whitney, para muestras no apareadas, con un valor alfa de 0.05 utilizando el mismo software.

4. Resultados, Análisis y Discusión

4.1 Expresión de TbGST1 en E. coli

Un objetivo importante del proyecto apuntaba a producir la TbGST1 en su forma recombinante y activa ya que esto posibilitaría: 1) caracterizarla a nivel molecular y enzimático (estructura oligomérica, actividad PGE₂ sintasa, especificidad, etc.) y 2) generar anticuerpos contra esta proteína, una herramienta necesaria para confirmar el correcto funcionamiento de las líneas transgénicas de *T. brucei* y realizar estudios de inmunohistoquímica.

El análisis de la secuencia de TbGST1 (ver capítulo 8 en ³⁵) permitió identificar una región N-terminal con una gran proporción de residuos hidrofóbicos y características de dominio transmembrana (TMD) que probablemente cumpla la función de anclar la proteína a membranas del parásito. A su vez, estudios de localización subcelular mostraron que la proteína se localiza en vesículas ¹⁰⁷. Una estrategia común para favorecer la expresión de proteínas de membrana en forma soluble es omitir el TMD. La **Figura 11** muestra un esquema representativo de las diferentes construcciones de TbGST1 que se generaron para su expresión en *E. coli*. Las construcciones consistieron de la secuencia que codifica para la TbGST1 con y sin su región TMD fusionada o no a proteínas que han mostrado favorecer altos niveles de expresión y/o solubilidad de diferentes proteínas ¹²². Las proteínas de fusión seleccionadas fueron la Tiorredoxina (Trx), la proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés) y la endoglucanasa CelD. En total se generaron 6 construcciones que se detallan en la **Tabla 4**.



Figura 11. Representación esquemática de las formas recombinantes de TbGST1 a expresar en E. coli. Las primeras dos construcciones poseen la región transmembrana (TMD) mientras que en las dos últimas construcciones esta región fue eliminada. Todas las construcciones contienen una cola de histidinas (HIS) en su extremo N-terminal, una proteína de fusión (o ninguna) y un sitio de corte para la proteasa del tabaco (TEV) que permite separar la proteína de fusión de la proteína de interés. A la derecha se muestran los pesos moleculares estimados que cuando corresponda incluyen el de la tiorredoxina como proteína de fusión.

Estas construcciones fueron generadas empleando una serie de vectores derivados de pET32a ¹²³ (ver sección 3.2.1 en ¹⁰⁷) que contienen un promotor reconocido por la ARN polimerasa del fago T7 (T7 ARNpol). Esta ARN polimerasa ha sido usada en numerosos sistemas de expresión de genes en sistemas heterólogos debido a que presenta una alta especificidad por su promotor y una elevada actividad y procesividad ¹²⁴. La expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo en cepas de *E. coli* que tienen integrado a su genoma un profago (λ DE3), que contiene el gen de la T7 ARNpol, bajo el control transcripcional del promotor *lacUV5*, y el gen para la proteína represora *lac*I. La secuencia del promotor *lacUV5* tiene gran afinidad por los factores de transcripción sigma bacterianos, lo cual incrementa la eficiencia del reclutamiento de la ARN polimerasa. En estos sistemas de expresión inducibles, la activación de dicho promotor está regulada por la presencia en este promotor de una secuencia operadora que une a la proteína LacI. Esto posibilita la inducción de la expresión en presencia de lactosa

o su análogo no hidrolizable el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG), los cuales al unirse a la proteína LacI disminuyen la afinidad de esta proteína por la unión a la secuencia operadora, lo que en consecuencia desreprime la inhibición de la transcripción de la T7 ARNpol¹²⁵.

Inserto	Proteína de fusión	Construcción	Proteína recombinante
TbGST1	-	pET32a/TbGST1	TbGST1
TbGST1	Trx	pET32a_Trx/TbGST1	Trx-TbGST1
TbGST1 (-)TMD	-	pET32a/TbGST1(-)TMD	TbGST1(-)TMD
TbGST1 (-)TMD	Trx	pET32a_Trx/TbGST1(-)TMD	Trx-TbGST1(-)TMD
TbGST1 (-)TMD	CelD	pET32a_CeID/TbGST1(-)TMD	CelD-TbGST1(-)TMD
TbGST1 (-)TMD	MBP	pET32a_MBP/TbGST1(-)TMD	MBP-TbGST1(-)TMD

Tabla 4. Construcciones generadas para la expresión en procariotas de la TbGST1

Para los ensayos de expresión se emplearon dos estrategias de inducción. Por un lado, se realizó un proceso de inducción clásica que consiste en cultivar las bacterias hasta alcanzar una OD₆₀₀ de aproximadamente 0,8 a 1, para luego activar la producción de la proteína de interés mediante el agregado del inductor (IPTG). Por otro lado, se empleó un proceso de autoinducción propuesto por Studier¹¹⁶, que se ha convertido en una estrategia ampliamente empleada para la expresión de proteínas insolubles, tóxicas o de difícil expresión en E. coli. Las bacterias se cultivan en un medio de autoinducción que contiene, glucosa, lactosa y glicerol. Mientras los niveles de glucosa sean altos en el medio de cultivo, ésta representa la principal fuente de carbono y energía que promueve el crecimiento de las bacterias (aumento de biomasa), dado que evita completamente la captación y el metabolismo de lactosa por mecanismos bien estudiados¹²⁵. Una vez consumida la glucosa del medio (etapa del crecimiento media o tardía) se inicia el consumo de glicerol y lactosa, y esta última, induce la expresión de la proteína de interés mediante los mecanismos descritos más arriba. El glicerol asegura una fuente de carbono y energía que permita sostener los altos niveles de expresión de la proteína recombinante, dado que el catabolismo del azúcar inductor puede no ser suficiente, ya que el operón para el metabolismo de ese azúcar puede no estar bien inducido en competencia con la fuerte expresión dirigida por la ARN polimerasa T7 altamente activa del ARNm y la proteína de interés. El medio de autoinducción contiene una concentración de glucosa que se agota, dando lugar al inicio de la autoinducción, en la fase logarítmica media o tardía del crecimiento, cuando la aeración disminuye y la expresión de la proteína de interés es robusta. Este mecanismo ha demostrado buenos resultados en la expresión de proteínas tóxicas en E.coli.

En primer lugar, se estudió la expresión de la forma completa de la TbGST1 con y sin fusión a Trx en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* bajo diferentes condiciones de cultivo e inducción, tal cual se detalla en la sección 3.2 (ver **Tabla 1**). Para el protocolo clásico de inducción por IPTG se testearon dos condiciones de expresión que se fundamentan a continuación. La condición I emplea 1 mM IPTG y extiende el cultivo a 4 h y 37°C. Esta estrategia busca favorecer una expresión potente de la proteína recombinante, aunque por tiempo corto para evitar, eventualmente, la agregación o formación de cuerpos de inclusión por acumulación de altos niveles de la proteína de interés. Dado el tiempo acotado de esta inducción la temperatura de cultivo se mantiene a 37°C de manera de no enlentecer el crecimiento celular y lograr una biomasa razonable a partir de la cual purificar la proteína en cuestión. La condición II consiste en inducir la expresión con una menor concentración de IPTG (0,2 mM) y prolongar el cultivo a 18 h aproximadamente a una temperatura de 20°C. Estas condiciones tienden a favorecer una cinética lenta

de expresión de la proteína de interés y del crecimiento bacteriano, lo cual ha mostrado ser efectivo para la producción en forma soluble de proteínas tóxicas o de difícil expresión ¹¹⁶.

Como se observa en los geles de la **Figura 12** para el caso de la versión Trx-TbGST1, bajo ambas condiciones de inducción clásica (paneles A y C), aunque sólo en las muestras correspondientes a la fracción insoluble, se logró detectar una banda prominente con un PM de aproximadamente 55 kDa que se corresponde con el esperado para la Trx-TbGST1. Los paneles B y D muestran los resultados para los ensayos de autoinducción, donde también se logra detectar una banda prominente con un PM de aproximadamente 55 kDa en las muestras correspondientes a la fracción insoluble.



Figura 12. Expresión de Trx-TbGST1 en E. coli BL21(DE3). Células BL21 (DE3) transformadas con la construcción pET32a_Trx/TbGST1 fueron cultivadas e inducidas según las estrategias de inducción clásica (l: 1 mM IPTG, 37°C y 4 h o II: 0,2 mM IPTG, 20°C y aproximadamente 18 h) y autoinducción (I: 4 h, 37°C, 220 rpm + ON, 25°C, 70 rpm, II: 48 h, 20°C, 170 rpm). Se analizaron por SDS-PAGE las fracciones insolubles (Ins) y solubles (Sol) de los lisados bacterianos correspondientes, sin inducir (-IPTG) o inducidas con IPTG (+IPTG) o provenientes de condiciones de autoinducción.

En función de estos resultados se decidió fusionar la forma de TbGST1 sin su región TMD (TbGST1(-)TMD) a la MBP y CelD. La MBP (es una proteína periplásmica y soluble de *E. coli* que ha demostrado mejorar la solubilidad de proteínas independientemente de si la misma se incorpora a la proteína de interés como fusión N- o C-terminal¹²⁶. En estudios comparativos, MBP ha mostrado ser más eficiente que la Trx en solubilizar la proteína objetivo¹²². Por otro lado, CelD es una endoglucanasa de *Clostridium thermocellum* que, dependiendo de la proteína blanco que se le fusione, ha mostrado mejores rendimientos de obtención de proteína soluble que incluso la Trx o la MBP ¹²³.

La **Figura 13** muestra los resultados de los ensayos de expresión de la TbGST1(-)TMD fusionada a MBP o CelD en condiciones de inducción clásica I (**sección 3.2, ver tabla 1**). Para la versión MBP-TbGST1(-)TMD (**panel A, izquierda)** no se observa una banda prominente en la fracción soluble, mientras que se observa en la fracción insoluble una banda prominente de aproximadamente 55 kDa que no se corresponde con el tamaño esperado para esta proteína(72 kDa). Para la versión CelD-TbGST1(-)TMD (panel A, derecha) se observa en la fracción soluble una banda prominente de aproximadamente 60 kDa

que no se corresponde con el tamaño esperado (93 kDa) y en la fracción insoluble se observa una banda prominente de aproximadamente 80 kDa.

Ante la posibilidad de que en estos dos casos una pequeña proporción (no evidente por SDS-PAGE) de la proteína de fusión etiquetada con histidinas se estuviera expresando en forma soluble, se procedió a realizar una cromatografía de afinidad por metales (IMAC) con el fin de enriquecer dicha fracción. Como se observa en el panel B de la Figura 13, en ninguna de las muestras analizadas se logra distinguir una banda prominente en el rango de PM esperado para la fusión MBP-TbGST1(-)TMD (72 kDa). Con respecto a la fusión CeID-TbGST1(-)TMD (Figura 13C), en este caso se detectó una banda intensa en la muestra correspondiente a la fracción de elución de la IMAC, aunque ésta presenta un PM de aproximadamente 70 kDa, el cual es significativamente inferior al esperado (PM teórico de 93 kDa). Para conocer la identidad de dicha banda, la misma se escindió del gel y se analizó por espectrometría de masas luego de tratamiento proteolítico con tripsina (servicio prestado por la Unidad de Bioquímica Analítica y Proteómica, IP-Montevideo). El resultado de este análisis (ver anexo, sección 7.3) reveló la presencia de una gran cantidad de péptidos pertenecientes a CelD, lo cual arrojó un grado de cobertura de secuencia del 60% y sólo unos pocos péptidos correspondientes a la TbGST1, correspondientes a la porción más N-terminal de la proteína. Esto se condice con el menor PM observado en los geles para la fusión CelD-TbGST1(-)TMD y sugiere que la forma soluble de esta proteína sufre procesamiento proteolítico específico dentro de la bacteria y no durante el proceso de lisis/purificación.



Figura 13. Expresión y purificación de MBP-TbGST1(-)TMD y CelD-TbGST1(-)TMD. Células BL21 (DE3) transformadas con las construcciones pET32a_MBP/TbGST1(-)TMD y pET32a_CelD/TbGST1(-)TMD fueron cultivadas e inducidas según la estrategia de inducción clásica I (sección 3.2, ver tabla 1). Análisis por SDS-PAGE de A) Fracciones solubles e insolubles de lisados totales de bacterias con cada construcción **B)** Fracciones de la purificación por IMAC-Ni⁺², para MBP-TbGST1(-)TMD: 1- Fracción soluble, 2- Fracción no unida , 3- Lavado 1 (amortiguador A1), 4- Lavado 2 (4% de amortiguador B, aproximadamente 20 mM imidazol), 5- Eluido (24 % amortiguador B aproximadamente 120 mM imidazol) y **C)** Fracciones de la purificación por IMAC-Ni⁺² para CelD-

Debido a los resultados obtenidos, se decidió ensayar la expresión de la TbGST1(-)TMD en una cepa de *E. coli* BL21(DE3) diferente denominada CodonPlus. Esta cepa contiene un plásmido que codifica para diferentes ARNt que se hallan poco representados dentro de la población de ARNt empleados habitualmente por *E. coli*, pero que suelen ser comunes en organismos eucariotas. Esta opción fue planteada frente a la posibilidad que la baja abundancia de ARNt específicos requeridos por los codones de la secuencia de TbGST1 influyeran negativamente durante el proceso de transducción y esto determinara un plegamiento inadecuado de la proteína y su concomitante falta de solubilidad. Se ensayó el protocolo de inducción clásica condición II para la expresión de TbGST1(-)TMD en estas células. Bajo estas condiciones, y únicamente en la muestra correspondiente a la fracción no soluble del extracto bacteriano correspondiente al cultivo inducido, se logró identificar la presencia de una banda prominente de aproximadamente 30 kDa (**Figura 14**), PM que se aproxima al esperado para la TbGST1(-)TMD etiquetada con histidinas (32 kDa).



Figura 14. Expresión de TbGST1(-)TMD. Células BL21 (DE3) CodonPlus fueron transformadas con la construcción pET32a/TbGST1(-)TMD y sometidas al siguiente protocolo de inducción de la expresión: 0,2 mM IPTG, 20°C y aproximadamente 18 h. Las fracciones insolubles (Ins) y solubles (Sol) de los lisados bacterianos correspondientes fueron analizadas por SDS-PAGE (tamaño esperado: 32 kDa).

Si bien la imposibilidad de obtener la TbGST1 en su forma soluble impide proceder con su caracterización bioquímica *in vitro*, la purificación de la forma insoluble de la proteína aún permitiría la inmunización de ratones con el fin de generar anticuerpos anti-TbGST1 para ser empleados en estudios celulares (por ej. análisis de nivel de expresión y localización subcelular de la TbGST1 endógena o transgénica). Los detalles de dichas actividades y sus resultados se abordan en las siguientes secciones.

4.2 Purificación de TbGST1 a partir de la fracción insoluble del lisado bacteriano

En base a los resultados obtenidos, se optó por producir TbGST1(-)TMD, fusionada o no a Trx (**Figura 14**) y etiquetada con histidinas empleando el protocolo de inducción clásica II, y proceder a su purificación a partir de la fracción insoluble mediante un protocolo de extracción seguido de una IMAC.

En el panel A de la **Figura 15** se esquematiza el proceso de extracción/solubilización de los cuerpos de inclusión (éste se describe en detalle en la **sección 3.2.1**), mientras que en los paneles B y C se muestra el análisis por SDS-PAGE de las muestras de cada una de las etapas de dicho proceso. En primer lugar, se procedió a lavar la fracción insoluble del lisado bacteriano en una solución amortiguadora de lavado conteniendo Tris-HCl pH 7,5 que contiene urea 1 M y Triton 1% v/v, con el fin de reducir el contenido de detrito celular. Luego de una ultracentrifugación, que separa el detrito de los cuerpos de inclusión, estos últimos se resuspendieron y solubilizaron en amortiguador de extracción que contiene urea 8 M, para luego proceder a su diálisis contra el amortiguador de lavado. Esta etapa tiene por objetivo facilitar el plegamiento a su conformación nativa de la proteína que fue desnaturalizada luego del tratamiento con una alta concentración de urea. Por esta razón, se decidió utilizar tanto la construcción sin proteína de fusión como la que la incluye. La proteína de fusión podría colaborar en este último paso de plegamiento y en la obtención de la proteína en conformación nativa en la fracción soluble. El proceso de purificación finaliza con una nueva ultracentrifugación, donde se espera obtener la proteína de interés en la fracción soluble.

Este no fue el caso para TbGST1(-)TMD ya que no encontramos la banda correspondiente al tamaño esperado (32 kDa) en la fracción soluble post segunda ultracentrifugación (**Figura 15B, carril 6**). En el caso de Trx-TbGST1(-)TMD se observa una banda de tamaño similar al esperado (55 kDa) en la fracción soluble post segunda ultracentrifugación (**Figura 15C, carril 6**). Esta fracción se sometió a una IMAC con resina de Ni⁺², en la cual no se observa una banda predominante en la elución, indicando que esta banda no es la proteína de interés o bien que perdió la etiqueta de histidinas, complicando su posterior purificación por columna de afinidad a metales. Para ambos casos se observa una fuerte banda predominante aproximadamente del tamaño esperado en la fracción insoluble post segunda ultracentrifugación (**Figuras 15B y 15C, carril 7**). En este punto se decidió resolubilizar ambas proteínas en un amortiguador A + 6M Urea (amortiguador A1) y proceder a su purificación por IMAC con resina de *Ni*⁺².



Figura 15. Proceso de extracción/solubilización de TbGST1(-)TMD y Trx-TbGST1(-)TMD a partir de la fracción insoluble del lisado bacteriano. A) Esquema representativo del proceso de extracción/solubilización. Los recuadros grises indican en qué fracción se encontró TbGST1(-)TMD. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones del proceso de purificación de TbGST1(-)TMD (B) y Trx-TbGST1 (-)TMD (C). Los números indican la fracción analizada según el esquema. 1- Fracción soluble, 4-FSPU1, 6-FSUP2, 7-FIPU2. La fracción 1 presentó un precipitado en el fondo que se centrifugó, se separó, se resolubilizó y se sembró (*1) para analizar su composición.

En la **Figura 16** se observan los cromatogramas y el análisis por SDS-PAGE de las purificaciones por IMAC de TbGST1(-)TMD (paneles A y B) y Trx-TbGST1(-)TMD (paneles C y D) a partir de la extracción de la fracción insoluble. Se analizó la potencial pérdida de proteína por filtrado antes de la IMAC (ver carriles 2 y 3, notar que los carriles 3 de los paneles B y D quedaron intercambiados). En ambos casos se

observan bandas predominantes con los tamaños esperados para cada proteína recombinante en las fracciones de la elución. La presencia de TbGST1 en dichas bandas fue confirmada por espectrometría de masas lográndose una cobertura de secuencia del 58% para TbGST1(-)TMD y del 57% para Trx-TbGST1(-)TMD (ver anexo, **sección 7.4**).



Figura 16. Purificación por IMAC-Ni⁺² de TbGST1(-)TMD y Trx-TbGST1(-)TMD a partir de la extracción de las fracciones insolubles. A) y C) Cromatograma (absorbancia a 280 nm en función del volumen de elución) de la IMAC realizada para TbGST1(-)TMD y Trx-TbGST1(-)TMD, respectivamente. Las barras azules indican fracciones sometidas a electroforesis. B) y D) Análisis por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 12% de las fracciones de interés indicadas en los correspondientes cromatogramas. 1- Fracción no unida 1, 2- filtrado, 3- pre-filtrado (muestra de panel B corresponde al D y viceversa), M- Marcador de peso molecular, A4-B3 y A7-B9- fracciones de elución colectadas para TbGST1(-)TMD y Trx-TbGST1(-)TMD, respectivamente.

En resumen, si bien no fue posible obtener TbGST1 en forma soluble y en la ausencia de agentes caotrópicos, se tuvo éxito en la purificación bajo condiciones desnaturalizantes de la proteína desprovista de la región TMD y fusionada o no a Trx a partir de cuerpos de inclusión. Comprobamos que la fusión a Trx no brindó una ventaja significativa en términos de niveles de expresión y/o como agente facilitador de solubilidad. Además, su clivaje de la proteína de interés supone un paso extra y dificultoso en las condiciones de trabajo (Urea 6M).

En base a estas observaciones y con el fin de obtener TbGST1(-)TMD con alto grado de pureza para la generación de anticuerpos murinos específicos, se combinaron las fracciones A6-B3 de la IMAC

correspondiente a la muestra de TbGST1(-)TMD. La solución resultante fue diluida para reducir la concentración de imidazol y luego concentrada por ultrafiltración. Esta muestra fue sometida a una nueva IMAC en columna de Co⁺² siguiendo el mismo protocolo que para la IMAC anterior realizada sobre resina de Ni⁺². A comparación del Ni⁺², los iones Co⁺² inmovilizados establecen interacciones más débiles con los grupos imidazólicos de las histidinas, lo cual disminuye las uniones inespecíficas de proteínas no deseadas, obteniéndose en general un menor rendimiento, pero mayor pureza que con las matrices de Ni⁺². El eluido se colectó, se ultrafiltró para reducir su volumen y la pureza de la preparación se evaluó por SDS-PAGE .



Figura 17. Análisis por SDS-PAGE (15%) del eluido de la purificación de TbGST1(-)TMD con resina de Co⁺² a partir de las fracciones A6-B3 de la purificación por IMAC-Ni⁺².

En la **Figura 17** observamos una banda predominante de aproximadamente 30 kDa, lo cual se corresponde con el PM esperado para esta construcción (PM teórico de 32 kDa) y la cual muestra una pureza estimada por densitometría de un 90%. Los contaminantes de bajo peso molecular presentes se encuentran en proporción minoritaria. Se determinó que tanto el grado de pureza como la integridad de la TbGST1(-)TMD eran satisfactorios para proceder a la inmunización de ratones.

4.3 Producción de anticuerpos anti-TbGST1

Se generó un suero murino anti-TbGST1 siguiendo el protocolo de inmunización descrito en la sección 3.2.3 y esquematizado en la

Figura 10, utilizando como antígeno TbGST1(-)TMD purificada a partir de cuerpos de inclusión. La primera inmunización se realizó inyectando por vía subcutánea aproximadamente 75 µg de proteína, mientras que en los sucesivos *boosters*/refuerzos se administró primero la misma cantidad y luego aproximadamente 35 µg de proteína con el fin de favorecer la expansión clonal de células B que produzcan mayores títulos de anticuerpos específicos contra la proteína en estudio.

La especificidad y sensibilidad del suero policional fue evaluado por técnica de *Western blot* empleando muestras de sangre, obtenidas previo a la aplicación del segundo *booster* (Figura 18A) o al final del procedimiento (sangrado final; Figura 18B), empleando TbGST1(-)TMD recombinante o extractos celulares totales de la línea celular 514-1313 SE GST1 de *T. brucei*. Esta línea celular sobre-expresa la TbGST1 (ver sección 4.4) por lo que su empleo permite verificar la sensibilidad del anticuerpo policional para detectar tanto la forma endógena como la transgénica de esta proteína. El peso molecular teórico de la forma endógena de la TbGST1 es de 31,7 kDa, mientras que el de la forma transgénica es ligeramente mayor (35,4 kDa) debido a la inclusión de dos etiquetas de c-Myc en el extremo carboxiloterminal de su secuencia.

El análisis de sueros (ensayados a una misma dilución de 1:500) muestra que luego de la primera inmunización y *booster* con TbGST1(-)TMD el animal 1, y no así el 0, ha logrado generar anticuerpos específicos contra esta proteína. Sin embargo, el título es moderado, ya que se aprecia detección de la TbGST1 sobre-expresada por el parásito, pero no de la forma endógena de la proteína (**Figura 18A**).

En el panel B de la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos para los sueros finales extraídos el día 52, es decir 10 días posteriores al segundo *booster* y ensayados a una dilución de 1:500, donde para ambos animales se observa un incremento en el título de anticuerpos contra TbGST1 respecto de las muestras obtenidas luego del primer *booster*. Esto se evidencia por la capacidad de ambos anticuerpos de detectar no sólo la expresión de la copia ectópica de la TbGST1 sino fundamentalmente la forma endógena de la misma. Si bien los sueros finales de ambos animales muestran una alta especificidad por la TbGST1, es notorio el escaso título de anticuerpos desarrollados contra el antígeno por el animal 0 respecto del animal 1. El análisis por densitometría de las bandas de suero 1 determinó que en la forma monomórfica de la forma infectiva de *T. brucei*, el nivel de expresión de la copia ectópica de TbGST1 es 2,5 veces superior al de la forma endógena de la misma.



Figura 18. Detección de TbGST1 con sueros anti-TbGST1. La detección se realizó por la técnica de Western blot en lisados de 5 millones de parásitos/carril de la línea Tb 514-1313 SE GST1 (SE) y 100 ng de la forma recombinante de la TbGST1(-)TMD (REC) para sueros extraídos del animal 0 y 1 el día 42, previo al segundo booster (**A**) y del sangrado final (**B**). En todos los casos se usó una dilución 1:500 del suero correspondiente. Se observa que a lo largo del proceso de inmunización el ratón 1 ha generado mayores títulos de anticuerpos específicos contra TbGST1 que el ratón 0. Con los símbolos – y + se indica si los parásitos fueron cultivados en ausencia o presencia de oxitetraciclina (Tet), respectivamente. TbGST1-c-Myc (x2) y TbGST1 indican las posiciones de las bandas que se corresponden con los PM esperados para la forma endógena (32 kDa) y ectópica (35,5 kDa) de la TbGST1. Sobre la izquierda de las imágenes se muestran las bandas de referencia de los marcadores de PM empleados.

4.4 Generación y caracterización de líneas transgénicas ARNi y sobre-expresantes de TbGST1

Para el estudio de la función de genes (indispensabilidad, rol biológico, metabólico, etc.) existen distintas estrategias basadas en la manipulación genética de sus niveles de expresión como por ejemplo: a) la eliminación o "mutilación" de la secuencia de ADN del gen de interés (*Knock-Out* o KO), lo cual se logra mediante técnicas de recombinación homóloga o de edición génica, b) el silenciamiento post-transcripcional o ARN de interferencia (ARNi), un proceso que llevan a cabo diferentes organismos eucariotas, que es activado por la presencia de una secuencia (al menos parcial) de ARN doble cadena del gen de interés y desencadena la degradación del ARNm correspondiente, y c) sobre-expresión (constitutiva o inducible) de la secuencia nativa o mutantes funcionales del gen de interés (sobre-expresante o SE) que se logra incorporando una copia ectópica de esta secuencia o bien editando la secuencia endógena del organismo ^{127–130}.

Dado que no se conoce *a priori* si la ausencia de la TbGST1 puede tener un efecto letal en *T. brucei*, para estudiar el rol de esta proteína sobre la biología de la forma infectiva de diferentes cepas/líneas celulares de este parásito se generaron líneas SE y ARNi en las cuales la sobre-expresión y el silenciamiento de la proteína son inducidas por la adición de oxitetraciclina al medio de cultivo. Las cepas/líneas celulares empleadas fueron: a) la línea celular monomórfica Tb 514-1313 WT, derivada de la cepa Lister 427 que ha perdido la capacidad de diferenciarse a la forma que reside en el insecto y muestra una alta tasa de replicación y virulencia en animales (modela la BSF), y b) la línea celular pleomórfica Tb AnTat 1.1-1313 WT, derivada de la cepa AnTat 1.1 que es capaz de completar el ciclo de diferenciación y muestra una tasa de replicación y virulencia en animales que es significativamente menor a la de la línea monomórfica^{131,132}. Cabe destacar que en las condiciones de cultivo que se trabajaron en este proyecto, los parásitos de esta línea se encuentran en el estadio sanguíneo (BSF). Ambas líneas celulares tienen integradas en sus genomas una secuencia del plásmido pLew 1313, el cual codifica la expresión constitutiva de la proteína represora de tetraciclina (tetR)¹¹⁷. La **Figura 19** muestra un esquema representativo del funcionamiento de los sistemas de ARNi y SE empleados en este estudio.



Figura 19. Esquema representativo de las estrategias para sobre-expresar y silenciar TbGST1. Los casetes de expresión de cada uno de estos vectores de ADN poseen una secuencia promotora PARP (procyclic acid-repetitive protein)¹³³ adyacente a una secuencia operadora de la proteína represora de tetraciclina (tetR). Mientras la tetR permanezca unida a esta secuencia operadora la transcripción de la secuencia de interés por parte de las polimerasas endógenas estará inhibida. La unión del antibiótico tetraciclina a la TetR produce un cambio de conformación en la misma y una consecuente pérdida de afinidad de esta proteína por la unión a la secuencia operadora y posibilita que tenga lugar la transcripción por las polimerasas del parásito. Es así como este sistema, en ausencia de tetraciclina en el medio impide la transcripción y en presencia de tetraciclina en el medio permite la producción del transcripto. La construcción de la línea sobre-expresante incluye el marco abierto de lectura completo de TbGST1 seguido de dos etiquetas c-Myc. La construcción de la línea ARNi incluye fragmentos complementarios sentido y antisentido de una porción (ver capítulo 4.7 en ¹⁰⁷) de la secuencia codificante de TbGST1 separadas por un espaciador. El transcripto resultante forma una estructura de tallo-bucle debido a hibridación de estas secuencias complementarias. Este transcripto de doble hebra es procesado por una endonucleasa del tipo DICER generando micro ARN de interferencia (ARNmi). Estos ARNmi reconocen y se unen a los transcriptos de la secuencia endógena de TbGST1 por complementariedad de bases induciendo su degradación por este mismo complejo o bien afectando su traducción.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio ¹⁰⁷ se comprobó el correcto funcionamiento de las líneas celulares monomórficas y pleomórficas sobre-expresantes mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo comercial anti-c-Myc. Mediante esta misma técnica, pero empleando anticuerpos generados a partir de inmunizaciones con péptidos sintéticos correspondientes a regiones de la TbGST1 predichas como inmunogénicas, se intentó verificar el correcto funcionamiento de las líneas celulares monomórficas y pleomórficas ARNi pero los resultados no fueron concluyentes, debido a la baja especificidad que mostraron estos sueros en ensayos de *Western blot*. Esta verificación fue posible en esta tesis gracias a la obtención del suero policional anti-TbGST1 descrito en la sección anterior, tal como se describe a continuación.

Dado que en este trabajo se procederá a ampliar y profundizar la caracterización fenotípica *in vitro* e *in vivo* de todas estas líneas celulares, en primer lugar, se procedió a verificar en los diferentes clones la estabilidad y correcto funcionamiento de los sistemas de regulación de expresión de la TbGST1 al alta (SE inducido) y a la baja (ARNi inducido). Esto fue evaluado mediante la técnica de *Western blot* empleando los anticuerpos policionales específicos contra la TbGST1 generados durante esta tesis (ver sección anterior) y el anticuerpo monocional contra la etiqueta de c-Myc (**Figura 20**).



Figura 20. Análisis por Western blot de la sobre-expresión y silenciamiento de TbGST1 en las líneas transgénicas de T. brucei. A) Detección de TbGST1-Myc2 con el anticuerpo comercial anti-c-Myc (Roche, dilución 1:2000) en lisados de parásitos (5x1 millones de parásitos/carril) de las líneas TbGST1 SE que fueron inducidos (+Tet) o no (-Tet) en las condiciones de cultivo. B) Detección de TbGST1 con suero anti-TbGST1 (dilución 1:500) en lisados de parásitos de las líneas TbGST1 ARNi que fueron inducidos (+Tet) o no (-Tet) con oxitetraciclina.

En el panel A de la **Figura 20** se muestran los resultados de *Western blot* para las líneas sobreexpresantes de TbGST1-c-Myc₂ en su versión pleomórfica y monomórfica. En primer lugar, se puede observar que en muestras provenientes de cultivos de ambas líneas celulares realizados en presencia de agente inductor (+tet) el anticuerpo comercial anti-c-Myc detecta la presencia de una banda única con un PM compatible con el esperado para TbGST1-c-Myc₂. Por otro lado, la inclusión de muestras correspondientes a cultivos crecidos sin agente inductor muestra claramente la presencia de una banda tenue de TbGST1-c-Myc₂ para extractos de parásitos pleomórficos y la ausencia de señal en extractos de parásitos monomórficos. Esto sugiere que la represión de la expresión del transgen es eficiente en la línea SE monomórfica y no así en la SE pleomórfica. Para esta última, se estimó que el nivel de expresión relativa de la TbGST1-c-Myc₂ en ausencia de oxitetraciclina representa un 29% del nivel de expresión alcanzado para esta proteína en condiciones de inducción.

Para analizar los resultados de la línea ARNi, debemos tener en cuenta que el éxito del silenciamiento depende de varios factores como ser la tasa de generación de los micro ARNs, la eficiencia de estos miARN y la maquinaria de silenciamiento para interferir con los transcriptos de TbGST1 endógena, la abundancia del ARNm blanco del silenciamiento, así como la abundancia y *turnover* de la proteína endógena. Con respecto a este último factor, el efecto del silenciamiento post-transcripcional podría tardar más en ponerse en evidencia para una proteína abundante y con una tasa de recambio lenta. Otro aspecto importante para destacar es que a diferencia de la técnica de *knock-out*, el ARNi no anula por completo la expresión de un gen, sino que la disminuye. En ese sentido, debe tenerse en cuenta que la capacidad de detección de la proteína blanco dependerá en gran medida de la sensibilidad de la técnica utilizada para detectarla. En el caso de la TbGST1 estimamos que el límite de detección de nuestro mejor anti-suero en la técnica de *Western blot* es de aproximadamente 2 ng de TbGST1 (ver **Figura 31**).

En el panel B de la **Figura 20** se puede observar que la inducción con oxitetraciclina logró silenciar de manera eficiente la expresión de la TbGST1 endógena en la línea celular monomórfica de *T. brucei* ya que el suero anti-TbGST1 no logra detectar señal para esta proteína como sí lo hace en extractos de parásitos para los cuales no se indujo el ARNi. En muestras de cultivos inducidos de la línea celular pleomórfica se detecta la banda correspondiente a TbGST1, pero en menor intensidad (50% de acuerdo con análisis por densitometría) que en la muestra de parásitos no inducidos, lo cual indica una menor eficiencia del sistema de interferencia a ARN en esta línea.

En resumen, las líneas celulares SE y ARNi generadas sobre parásitos monomórficos dieron lugar a sistemas más eficientes en cuanto al control de la expresión de las secuencias transgénicas respecto de las respectivas líneas celulares generadas sobre parásitos pleomórficos. Dado que tanto la línea pleomórfica como la monomórfica fueron transfectadas con exactamente las mismas construcciones de ADN que dirigen la producción de ARN doble cadena o la sobre-expresión de la TbGST1, tales diferencias en la eficiencia de dichos sistemas pueden atribuirse a características intrínsecas a cada línea parental.

Habiendo comprobado la funcionalidad de las distintas líneas transgénicas, se procedió a evaluar el fenotipo de crecimiento *in vitro* de las mismas. Los ensayos consistieron en monitorear las curvas de crecimiento de cultivos continuos (**Figura 21**) y de cultivos que fueron repicados cada 24 horas (**Figura 22**), tal como se describe en la sección 3.7.



Figura 21. Curvas de crecimiento de cultivos continuos de las líneas transgénicas monomórficas. Curvas de crecimiento para la línea celular parental o salvaje (WT), la línea transgénica sobreexpresante (SE) y la línea transgénica de ARN de interferencia (ARNi) de la TbGST1, crecidas en presencia (+) o ausencia (-) de oxitetraciclina. En todas las figuras se grafica la media de 3 réplicas biológicas. Se partió de un inoculo inicial 10⁴ parásitos/mL y se determinó el número viable de células por recuento en citómetro cada 24 h. Se cosecharon muestras para ensayos de Western blot a las 24, 48 y 72 h (ver **Figura 30**).

Por un lado, el ensayo sobre la línea WT muestra que la oxitetraciclina *per se* no afecta el crecimiento de los parásitos (**Figura 21**). Tampoco se observó un fenotipo adverso o beneficioso en el crecimiento de las líneas transgénicas SE y ARNi inducidas o no con oxitetraciclina. Además de mostrar una tasa de replicación similar a la de la línea parental, las líneas transgénicas, independientemente de la presencia de inductor, alcanzaron densidades celulares máximas casi idénticas entre sí. Por lo tanto, se concluye

que ni la sobre-expresión ni el silenciamiento de la TbGST1 tienen efecto sobre el crecimiento *in vitro* de la forma sanguínea monomórfica de *T. brucei* en estas condiciones.

Con respecto a las líneas pleomórficas transgénicas, el perfil de crecimiento de parásitos sobreexpresantes en un régimen de cultivo continuo en presencia o ausencia de oxitetraciclina no mostró diferencias significativas (**Figura 22A**). Tampoco la línea ARNi sometida a un régimen de cultivo sostenido mediante repiques diarios en medio fresco con o sin oxitetraciclina mostró un patrón de crecimiento diferencial para ambas condiciones (**Figura 22B**).



Figura 22. Curvas de crecimiento de cultivos de las líneas transgénicas pleomórficas. A) Curva de crecimiento continuo de cultivos con (+) y sin (-) oxitetraciclina de la línea SE GST1. Se partió de un inóculo inicial de 10⁴ parásitos/mL y se determinó el número de células viables cada 24 hs. B) Curva de crecimiento por repiques de cultivos con (+) y sin (-) oxitetraciclina de la línea ARNi GST1. Cada 24 hs se determinó el número de células viables por recuento en citómetro, las cuales fueron re-inoculadas en medio fresco a una densidad de 50.000 parásitos/mL. En todas las figuras se grafica la media de 3 réplicas biológicas.

En resumen, estos resultados sugieren que el silenciamiento o sobre-expresión de TbGST1 no produce un efecto adverso o beneficioso en el crecimiento *in vitro* de las líneas sanguíneas transgénicas mono y pleomórficas de *T. brucei*. Esto indica que la TbGST1 no cumpliría un rol fundamental en la regulación homeostática de estos parásitos, al menos en la forma sanguínea, que resulta la más importante desde el punto de vista clínico. Resta determinar si esta proteína juega un rol determinante en el metabolismo de fármacos y/u oxidantes y en la inmunomodulación de la respuesta inmune del hospedero en el contexto de una infección.

4.5 Generación y caracterización de una línea monomórfica KO condicional para TbGST1

Para indagar acerca de la función de una proteína, sea *in vitro* o *in vivo*, una línea *knock-out* (KO) permite obtener un resultado definitivo en comparación con una línea ARNi. Esto se debe a que, en una línea KO, se han reemplazado las copias del gen de interés por copias de un gen de resistencia a un antibiótico particular. En la estrategia de ARNi, el silenciamiento de la expresión del gen de interés tiene lugar a nivel pos-transcripcional y, como se mencionara anteriormente, el nivel de supresión de la expresión de la expresión de la expresión de varios factores. En este proyecto, con las herramientas disponibles, logramos confirmar que la cepa monomórfica ARNi para TbGST1 logra regular a la baja y de manera muy eficiente

la expresión de esta proteína. En condiciones de inducción del ARNi, el contenido intracelular de TbGST1 estuvo por debajo del límite de detección del ensayo por *Western blot* (2 ng) y no afectó el crecimiento *in vitro* del parásito. Sin embargo, no podemos descartar que incluso a concentraciones bajas la proteína aún sea capaz de cumplir su rol. Por este motivo y con el objetivo de obtener un resultado más concluyente con respecto a la posible indispensabilidad de esta proteína es que se intentó generar una línea KO de TbGST1 mediante sustitución por recombinación homóloga.

Estudios recientes¹³⁴ reportan que 80 nucleótidos de homología a cada extremo del gen de resistencia son suficientes para la sustitución por recombinación homóloga. A diferencia de las estrategias clásicas que emplean regiones de recombinación extensas, el clonado de las mismas junto al gen de resistencia en un vector y posteriores pasos de digestión con endonucleasas, este nuevo método permite generar casetes de recombinación más cortos que incluso pueden producirse mediante simples reacciones de PCR y evitan ser sometidos a digestiones enzimáticas. Aplicando esta estrategia se diseñaron casetes que contienen la secuencia codificante de genes de resistencia a blasticidina y puromicina (BLA y PAC, respectivamente) flanqueados por 80 nucleótidos de las regiones no traducidas (UTR) 5'y 3' adyacentes a la secuencia codificante del gen de TbGST1 (**ver anexo, sección 7.1**). Esto permitiría sustituir mediante recombinación homóloga dirigida la secuencia codificante de la TbGST1 por la de estos otros genes.



Figura 23. Esquema de la estrategia de sustitución por recombinación homóloga de TbGST1 por genes de resistencia BLA y PAC^R. Se diseñaron casetes que contienen los genes de resistencia flanqueados por 80 nucleótidos de las regiones UTR 5' y 3' inmediatamente contiguas a la secuencia codificante del gen TbGST1. Se diseñaron dos juegos de cebadores (ver sección 7.2), el par UTR hibrida con los extremos de las UTR 5' y 3' mientras que el par ORF hibrida en las secuencias de los marcos abiertos de lectura (ORFs) 5' y 3' que flanquean a TbGST1. Al amplificar con el juego de cebadores UTR se espera un producto de 1099 pb para la secuencia de TbGST1 y un producto de 559 pb para la secuencia de BLA. Con el juego de cebadores ORF se espera un producto de 2090 pb para la secuencia de TbGST1 y un producto de 1550 pb para la secuencia de BLA.

Se solicitó la síntesis y clonado de los casetes en vectores pUCSP con sitios de corte para EcoRI en sus extremos. Dado que los costos de adquirir estas construcciones eran comparables a los de primers largos que incluyeran la secuencia de las regiones de homología de 80 nt, nuestra primera estrategia fue obtener los casetes de resistencia por digestión de estas y no por PCR como en el trabajo original. Estos vectores se transformaron en bacterias competentes XL1. Las bacterias transformadas fueron cultivadas y el ADN purificado según lo descrito en la sección 3.9.1.

El casete con el gen BLA fue obtenido por digestión del plásmido que lo contiene con enzimas de restricción, se precipitó con isopropanol para concentrarlo y se transfectó la cepa Tb 514-1313 LUC (una cepa que expresa la proteína luciferasa)¹¹⁴ según el protocolo descrito en la sección 3.5, sin purificar este fragmento para separarlo del esqueleto del vector. Al cabo de 15 días no se observaron clones

resistentes en las placas de transfección. Se realizó un segundo intento, esta vez transfectando además de la línea Tb 514-1313 LUC, la línea Tb 514-1313 WT siguiendo la misma estrategia. Al cabo de 15 días no observamos clones resistentes en las placas de transfección.

Frente a la incapacidad de obtener líneas celulares resistentes nos planteamos las siguientes posibles causas: una baja eficiencia de integración del casete al locus (sea por fenómenos epigenéticos como la condensación de esa región del ADN o por el tamaño de las secuencias complementarias a los UTR empleadas, o una combinación de estos factores con una pérdida importante de ADN durante la precipitación), problemas técnicos durante la transfección que reducen la biodisponibilidad del ADN (ej. baja permeabilización de membrana celular y nuclear, degradación rápida del ADN a nivel intracelular o secuestro por otras moléculas) o bien la TbGST1 es esencial y ni siquiera una de sus secuencias alélicas puede eliminarse sin que esto resulte en la muerte del parásito.

Contemplando estas interrogantes, se decidió cambiar la estrategia para la obtención del casete según lo descrito en¹³⁴ y amplificar el casete por PCR seguido de una purificación con fenol-cloroformo. Para esto se diseñaron cebadores que hibridan en los extremos 5' y 3' de las UTR (Cebador Fo UTR y Cebador Re UTR, ver **Figura 23**) (ver secuencias en el anexo, **sección 7.2**).

Ante la posibilidad de que el primer intento haya fracasado debido a la esencialidad de la proteína, en este segundo intento decidimos generar un KO condicional sobre la línea monomórfica SE (Tb 514-1313 SE GST1). En una estrategia de este tipo una copia ectópica inducible del gen produce la proteína de interés al mismo tiempo que se intenta reemplazar la copia endógena de la misma. Una vez que se logra sustituir la copia endógena se puede interrumpir transitoriamente la inducción de la copia ectópica para poder evaluar el fenotipo de la línea en ausencia de la proteína de interés.

Se realizaron ensayos de puesta a punto de una PCR para amplificar el casete a partir del vector y otra PCR para detectar por genotipado la presencia de TbGST1 a partir de ADN genómico purificado. En este proceso se evaluaron diferentes polimerasas, concentraciones de molde de ADN y temperaturas de hibridación. La **Figura 24** muestra los resultados de la puesta a punto de la PCR de amplificación del casete, donde se observa un buen rendimiento de la amplificación del fragmento del tamaño esperado.



Figura 24. Puesta a punto y producción del casete para la generación de una línea de T. brucei KO para GST1. Se realizaron tres reacciones de PCR empleando el par de cebadores UTR y la enzima Pfx 50 (Thermo) a partir de dos diluciones de molde (1/10.000 y 1/100.000) y un control negativo (C-) sin molde. Los productos fueron

analizados por electroforesis en gel de agarosa 1 %. Tamaño esperado: 559 pb. Se cuantificó la concentración de amplicón (tamaño estimado 570 pb) por medida de absorbancia a 260nm (450 y 431 ng/ μ L) y se verificó un buen grado de pureza según la relación A_{260}/A_{280} = 1,84. MPM: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher)).

Para producir el casete a mayor escala se eligió la condición en la cual el molde se diluye 1/10.000, se purificó el producto de PCR por extracción en fenol cloroformo y se lo empleó para transfectar la línea Tb 514-1313 SE GST1, según lo descrito en la **sección 3.9.1**. En este caso todos los cultivos se realizaron en presencia de oxitetraciclina desde las 48 hs previas a la transfección para inducir y mantener la expresión de la copia ectópica de TbGST1. Al día 10 se detectó un clon, al cual se lo denominó clon B1. Este clon fue cultivado y se procedió a la extracción de ADN genómico y genotipado por PCR según el protocolo descrito en la **sección 3.9.2**.

En la **Figura 25** se muestran los resultados de la amplificación sobre el ADN genómico del clon B1 con los cebadores dirigidos a las UTRs, por un lado, y con los dirigidos a los marcos abiertos de lectura (ORFs) 5' y 3', por otro. Para analizar estos resultados es necesario tener en cuenta que: 1) el gen de la TbGST1 es de copia única en el genoma de *T. brucei*, y 2) que *T. brucei* es un organismo diploide, y por tanto existen dos alelos de TbGST1, uno en cada cromosoma homólogo. Empleando ambas combinaciones de cebadores sobre ADN genómico de la línea WT, y como era de esperarse, se amplifican fragmentos que por su tamaño se corresponden con el producto esperado para el gen de la TbGST1 con (2090 bp para los cebadores ORF) o sin (1099 bp para los cebadores UTR) las secuencias UTR adyacentes. En el caso del clon B1 se amplifica además un producto que se corresponde con la presencia del gen de resistencia a blasticidina (BLA) (tamaño esperado: 1550 bp para los cebadores UTR y 559 bp para los cebadores ORF). Esto indica que en este clon se logró reemplazar un único alelo de la TbGST1 por la secuencia BLA, es decir, se obtuvo un simple KO (sKO condicional).



Figura 25. Genotipado por PCR del clon B1 para la transfección de la línea Tb 514-1313 SE GST1 con el casete para KO de TbGST1 conteniendo el gen BLA. Se realizó PCR sobre ADN genómico de la cepa WT y sobre ADN genómico del clon B1 con los juegos de cebadores ORF y UTR. Los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%. Con el juego de cebadores UTR se espera un producto de 1099 pb para la secuencia de TbGST1 y un producto de 559 pb para la secuencia de BLA. Con el juego de cebadores ORF se espera un producto de 2090 pb para la secuencia de TbGST1 y un producto de 1550 pb para la secuencia de BLA. MPM: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher)). Para intentar sustituir el segundo alelo de la TbGST1, y conseguir entonces el doble KO condicional, se siguieron dos estrategias. La primera fue transfectar el clon B1 sKO condicional con un segundo casete, que contiene la secuencia del gen PAC. Este casete fue generado, acondicionado y transfectado tal cual se describió arriba para el casete BLA (amplificación por PCR y extracción con fenol-cloroformo). La transfección y posterior selección no dio lugar a clones resistentes. Al mismo tiempo se empleó otra estrategia que consistió en aumentar progresivamente la concentración de blasticidina hasta 30 veces (150 µg/mL) en busca de forzar la sustitución del segundo alelo por el mismo casete de BLA presente en el sKO condicional. Cada vez que se aumentó la concentración de antibiótico se cultivó en esa condición por 7 días y se procedió a extracción de ADN y genotipado. La concentración de antibiótico se aumentó 10, 20 y 30 veces, y en ningún caso se detectó el reemplazo de la secuencia endógena de TbGST1 del segundo alelo cromosómico (ver **Figura 26**).



Figura 26. Genotipado sobre ADN genómico del clon B1 sKO condicional de TbGST1 cultivado en concentraciones crecientes de blasticidina. Se realizó extracción de ADN genómico del clon B1 (sKO) luego de ser cultivado por 7 días con concentraciones de hasta 30 veces de blasticidina (30X BLA). Se realizó genotipado por PCR con ambos juegos de cebadores (UTR y ORF) para determinar la sustitución del segundo alelo de TbGST1. El control negativo (C-) corresponde al genotipado sin ADN molde. Los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%. Con el juego de cebadores UTR se espera un producto de 1099 pb para la secuencia de TbGST1 y un producto de 559 pb para la secuencia de BLA. Con el juego de cebadores ORF se espera un producto de 2090 pb para la secuencia de TbGST1 y un producto de BLA. MPM: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher)).

En resumen, fue posible la obtención de una línea celular BSF monomórfica sKO para TbGST1 siempre y cuando se co-expresó una copia ectópica de este gen. La refractariedad a que tenga lugar el segundo evento de recombinación homóloga aún sigue siendo una incógnita siendo que las diferentes estrategias aplicadas (recombinación por duplicación de casete de resistencia previamente integrado o incorporación de un casete con resistencia diferente) se llevaron a cabo bajo condiciones que aseguran buenos niveles de TbGST1 por inducción de expresión de una copia ectópica (SE).

4.6 Localización subcelular de TbGST1

La localización subcelular de TbGST1 fue previamente estudiada por otros miembros de nuestro laboratorio¹⁰⁷. Ensayos de inmunofluorescencia (IF) empleando el anticuerpo anti-c-Myc sobre la línea monomórfica sobre-expresante (Tb 514-1313 SE GST1) revelaron un claro patrón de localización citosólica en estructuras bien definidas, de forma circular, que hacen pensar en vesículas, dispuestas como un collar de perlas que crecen en tamaño a medida que se acercan a la parte anterior del parásito. La tinción con un colorante de membranas (FM4-64 FX) sugiere que estas estructuras están rodeadas de membrana, lo cual es compatible con la presencia de una TMD en la TbGST1. Estudios con otros marcadores específicos permitieron determinar que las vesículas conteniendo a la TbGST1 no co-localizan con glicosomas ni cuerpos lipídicos (*lipid droplets*). Además, en varias imágenes se observaron vesículas presentes en la zona anterior del parásito que solapan con el kinetoplasto. Cabe recordar que éste se encuentra adyacente al bolsillo flagelar, que es el principal sitio de endo y exocitosis en estos parásitos, lo que sugiere un destino exocítico para TbGST1 o bien su producto.

Los resultados anteriores fueron tomados con precaución y sólo orientadores en cuanto a la posible localización subcelular de la proteína, ya que los mismos derivan del análisis de líneas celulares SE de TbGST1 y la sobre-expresión de una proteína puede determinar su disposición y distribución en regiones subcelulares en las cuales normalmente no se localizaría.

De manera complementaria, también se realizaron ensayos de IF sobre las líneas ARNi (Tb 514-1313 ARNi GST1 y AnTat ARNi GST1), cultivadas en ausencia o presencia de oxitetraciclina, empleando anticuerpos contra péptidos sintéticos de TbGST1. Estos estudios revelaron un marcado similar para la proteína endógena (en los cultivos sin inducir) al obtenido con el anti-c-Myc, sugiriendo que la sobre-expresión de la proteína no provoca una alteración de su localización subcelular.

Con el propósito de aportar evidencias conclusivas con respecto a la localización subcelular de la TbGST1 endógena, en la presente tesis se realizaron ensayos de IF empleando el suero anti-TbGST1 sobre muestras de diferentes líneas celulares monomórficas y BSF de *T. brucei*. La **Figura 27** muestra las imágenes de IF empleando el anticuerpo monoclonal anti-c-Myc (mAb-anti-c-Myc) y el suero anti-TbGST1 en parásitos de la línea SE en condiciones de inducción.



Figura 27. Localización subcelular de TbGST1-c-Myc2 y TbGST1 endógena en la línea sobre-expresante monomórfica. Se observan imágenes de IF obtenidas con microscopio confocal. Los parásitos fueron cultivados en presencia de 1 μg/mL de oxitetraciclina por 48 hs y cosechados en fase de crecimiento exponencial (2 millones de parásitos/mL). Se utilizó DAPI (tinción azul) para marcar el ADN nuclear (de mayor tamaño) y el mitocondrial (de menor tamaño). Para la detección de TbGST1-c-Myc₂ se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-c-Myc (dilución 1:500 PBS-0,4 % p/v BSA) y anticuerpos anti-ratón Alexa 488 (verde) como anticuerpo secundario. Para la detección de TbGST1 (endógena o ectópica) se utilizó el suero anti-TbGST1 (dilución 1:250) y anticuerpos anti-ratón Alexa 488 (verde) como anticuerpo secundario. Las muestras Control no incluyen incubación con anticuerpos primarios.

Las imágenes obtenidas para las muestras incubadas con el mAb-anti-c-Myc revelan nuevamente un patrón de localización citosólico de partículas que pueden interpretarse como estructuras de conformación esférica de contornos bien definidos. Se observa que estas estructuras varían en tamaño y se distribuyen casi de manera homogénea en todo el citosol. A diferencia de la señal obtenida con el mAb-anti-c-Myc, las imágenes correspondientes al suero anti-TbGST1 mostraron un marcado menos intenso, más difuminado y uniforme con zonas de mayor intensidad de señal. La menor intensidad puede deberse a un título más bajo de anticuerpos específicos en el suero policional respecto del mAb-anti-c-Myc o bien a que los anticuerpos policionales no estén reconociendo epítopes estructurales de la TbGST1 ya que los mismos fueron generados contra la proteína desnaturalizada, es decir contra epítopes lineales. La tinción de base o *background* (difuminado) puede ser causada por una reacción inespecífica y/o cruzada de los anticuerpos policionales con alguna otra proteína del parásito ya que no debe olvidarse que este suero se generó contra una proteína recombinante que presentaba un bajo contenido (<10%) de contaminantes de bajo peso molecular.

Figura 28 y 29 contienen imágenes de IF representativas obtenidas empleando el suero anti-TbGST1 sobre la línea WT y las líneas transgénicas SE y ARNi monomórficas en condiciones de inducción y de no inducción.



Figura 28. Localización sub-celular de TbGST1-c-Myc2 y TbGST1 endógena en la línea SE monomórfica en condiciones de inducción (+Tet) y de no inducción (-Tet). Se observan imágenes de IF obtenidas con microscopio confocal. Los parásitos fueron cultivados en presencia o no de 1 μg/mL de oxitetraciclina por 48 hs y cosechados en fase de crecimiento exponencial (2 millones de parásitos/mL). Se utilizó DAPI (tinción azul) para marcar el ADN nuclear (mayor tamaño) y el mitocondrial (menor tamaño). Para la detección de TbGST1-c-Myc₂ se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-c-Myc (1:500 PBS-0,4% BSA) y anti-ratón Alexa 488 (verde) como anticuerpo secundario. Para la detección de la versión endógena de TbGST1 se utilizó el suero anti-TbGST1 (1:250) y anti-ratón Alexa 488 (verde) como anticuerpo secundario. Las imágenes fueron deconvolucionadas con el software Huygens. Cada imagen representa un compilado de la máxima intensidad de 4 secciones iguales en el eje Z.

La señal obtenida con el mAb-anti-c-Myc (primera fila de imágenes) para la línea SE monomórfica inducida reproduce exactamente las observaciones anteriores (**Figura 27**). Al comparar la detección de TbGST1 en la línea SE monomórfica en condiciones de inducción y no inducción (segunda y tercera filas, respectivamente), se observa una diferencia de intensidad que concuerda con el mayor contenido de TbGST1 en las muestras donde se indujo la expresión de la copia ectópica de esta proteína (**Figura 20A**).

En parásitos de la línea parental (WT) la señal correspondiente a TbGST1 (**Figura 29, primera fila**) mostró un patrón puntillado similar al observado en la línea SE aunque de menor intensidad y en partículas de menor tamaño.



Figura 29. Localización sub-celular de TbGST1 en la línea WT y ARNi monomórfica en condiciones de inducción (+Tet) y de no inducción (-Tet). Se observan imágenes de IF obtenidas con microscopio confocal. Los parásitos fueron cultivados en presencia o no de 1 μg/mL de oxitetraciclina por 48 hs y cosechados en fase de crecimiento exponencial temprano (70 mil parásitos por mL) para la línea WT o exponencial tardía (2 millones de parásitos/mL) para la línea ARNi. Se utilizó DAPI (tinción azul) para marcar el ADN nuclear (mayor tamaño) y el mitocondrial (menor tamaño). Para la detección de TbGST1 se utilizó el suero anti-TbGST1 (1:250) primario y anti-ratón Alexa 488 (verde) como anticuerpo secundario. Las imágenes fueron deconvolucionadas con el software Huygens. Cada imagen representa un compilado de la máxima intensidad de 4 secciones iguales en el eje Z.

Esto probablemente se deba a que éstas muestras de parásitos fueron tomados de un cultivo en fase temprana del crecimiento exponencial (densidad aprox. 70 mil parásitos/mL) y, como se muestra en la sección 4.7, la concentración intracelular de TbGST1 es mayor en la fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria.

En la línea ARNi no inducida (Figura 29, filas segunda y tercera), la señal de TbGST1 muestra una distribución y patrón similar al observado en la línea SE no inducida (

Figura 28, tercera fila) o en la línea WT (Figura 29, primera fila), aunque de mayor intensidad, por las razones señaladas arriba. En muestras donde se indujo el silenciamiento de la TbGST1 (Figura 29, tercera fila), si bien la señal para esta proteína decae de manera significativa respecto del control no inducido (Figura 29, segunda fila), aún persiste un marcado de fondo con patrón puntillado. Esto en parte confirma la regulación a la baja de la TbGST1 por el sistema ARNi que también fuera observado por técnica de *Western blot* (Figura 20B) y por otro lado está en línea con nuestra hipótesis que parte de

la señal detectada por el anticuerpo policional anti-TbGST1 se deba a reacción cruzada con alguna otra proteína del parásito.

En resumen, la detección de TbGST1 con el suero anti-TbGST1 permitió confirmar los resultados de localización subcelular descritos en ¹⁰⁷ y descartar la sospecha de una localización artificial producto de su sobre-expresión. El mAb-anti-c-Myc aplicado sobre la línea SE permitió una mejor visualización de la localización de TbGST1 y resolución de las estructuras donde esta proteína residiría que parecerían ser vesículas con destino exocítico.

4.7 Expresión y concentración intracelular de TbGST1

El patrón de expresión de la TbGST1 durante las distintas fases del crecimiento *in vitro* de la forma infectiva del parásito fue estudiado en la línea monomórfica Tb 514-1313 WT mediante técnica de *Western blot* (Figura 30).



Figura 30. Expresión de TbGST1 en distintas fases del crecimiento in vitro de la línea 514-1313 WT. Western blot realizado con suero anti-TbGST1 (dilución 1:500) en lisados de parásitos (50 millones por carril) provenientes de cultivos en distinta fase del crecimiento (ver Figura 21). Se realizó una tinción post-transferencia con rojo Ponceau para verificar la uniformidad de carga. Se observa una diferencia considerable en la carga de parásitos correspondientes a las 48 hs de cultivo y una diferencia menor pero notoria a las 72 hs, que explica, al menos de forma parcial, la ausencia de la banda en la condición con inductor.

En la **Figura 30** podemos observar que el nivel de TbGST1 se incrementa en el curso del cultivo alcanzando una concentración máxima en la fase estacionaria (96 hs).

La concentración intracelular de TbGST1 en la línea Tb 514-1313 WT se estimó por *Western blot* sembrando como referencia cantidades conocidas de TbGST1 recombinante. Los resultados se muestran en la **Figura 31 (panel A)**. Se observa que el límite de detección para este ensayo es de aproximadamente 2 ng de proteína recombinante. Las bandas detectadas fueron cuantificadas mediante un análisis por densitometría y se construyó una curva de calibración en base a estos valores para las diferentes cantidades de proteína recombinante **(panel B)**.



Figura 31. Determinación de la concentración intracelular de TbGST1 en T. brucei 514-1313 WT. A) Se analizaron por Western blot (suero anti-TbGST1 dilución 1:500) lisados conteniendo dos cantidades diferentes de parásitos y diferentes cantidades de TbGST1 recombinante correspondiente a un batch "fresco" y cuantificada por el método de BCA el mismo día de su uso. B) Las bandas de proteína detectada fueron analizadas por densitometría con el software Fiji ¹³⁵ y se construyó una curva de calibración en base a los valores obtenidos.

Para construir la curva de calibración se eligió un rango de concentración de TbGST1 recombinante (5-20 ng) que comprendiera el nivel de intensidad de señal para la muestra incógnita (señal correspondiente a 10 millones de parásitos, **Figura 31A**). Estos datos se pudieron ajustar a la ecuación de una recta con un valor de R²=0.996, a partir de la cual se extrapoló el valor de señal correspondiente al lisado de 10 millones de parásitos para hallar la masa correspondiente de TbGST1. A partir de esta masa, y considerando el volumen celular de 58 femtolitros reportado para *T. brucei* BSF¹³⁶, podemos estimar una concentración intracelular aproximada de 190 nM, asumiendo que la misma se distribuyera de manera homogénea en todo este compartimento, lo cual, como se mostró por IF no es correcto. Considerando que esta proteína estaría confinada en vesículas cuyo volumen acumulado es mucho menor al volumen celular, cabe esperar que su concentración real *in situ* sea mucho mayor al estimado como contenido intracelular total.

4.8 Producción de PGE₂ por la forma infectiva de T. brucei

Para estudiar el propuesto rol PGE₂ sintasa de TbGST1 se analizaron sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares monomórficas transgénicas. El análisis por *Western blot* de lisados de las líneas SE y ARNi inducidas muestra un contenido comparativamente elevado y bajo, respectivamente, de TbGST1. Por tanto, si TbGST1 produce PGE₂, cabría esperar observar niveles de producción elevados de esta molécula por parte de parásitos SE inducidos y significativamente menores en parásitos ARNi inducidos.

Para evaluar la producción de PGE₂ se cultivaron parásitos de las líneas monomórficas SE y ARNi en presencia o ausencia de oxitetraciclina hasta alcanzar la fase exponencial media de crecimiento (72 hs de cultivo) y una densidad de aproximadamente 2 millones de parásitos/mL. Estos parásitos se cosecharon e incubaron con ácido araquidónico (AA; por detales ver la sección 3.10.2) dado que un

reporte anterior indica que la adición de ácido araquidónico al medio de cultivo aumenta la producción de PGs por *T. brucei*⁶⁵. El análisis y cuantificación se realizaron por análisis de masas en un espectrómetro de masas cuadrupolo acoplado a un HPLC (LC-MS) del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina. La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con tecnología de triple cuadrupolo posee la capacidad de actuar como un filtro de masas para monitorizar selectivamente un ión molecular específico (modo MRM) y uno o varios de sus iones fragmento. La pareja ion precursor/ion fragmento se denomina transición y puede ser altamente específica para un analito determinado. Al acoplar al triple cuadrupolo un cromatógrafo operando a flujos de microlitro/min, la identidad del analito se completa con una dimensión cuantitativa obtenida del área bajo el pico de la transición a lo largo de la corrida cromatográfica, y su tiempo de retención, que lo puede diferenciar de otros analitos con transiciones idénticas ¹³⁷. La **Figura 32** ilustra el ion parental (PGE₂) y los iones fragmentos monitorizados durante la cromatográfia.



Figura 32. Prostaglandina E₂: Ion molecular y fragmentos monitorizados durante la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

La **Figura 33A** compara las señales obtenidas para cada transición de PGE₂ (arriba) y para los estándares internos deuterados de PGE₂ y PGD₂ (abajo) en una muestra representativa de sobrenadantes de cultivo de parásitos incubados con AA. Las prostaglandinas naturales (no deuteradas) eluyen unos segundos después que sus correspondientes estándares deuterados, como es de esperar por efecto del deuterio en corridas cromatográficas de fase reversa. Por esto creemos que el pico sombreado en gris se trata de PGE₂ mientras que los otros picos podrían tratarse de PGE₂-like, PGD₂ y PGD₂-like. Los prostanoides presentan muchos isómeros posibles³⁸ y si bien este ensayo no puede asegurar la identidad de todos los picos, se puede presuponer que se trata de estereoisómeros de PGE₂ y PGD₂.



Figura 33. Análisis por espectrometría de masas cuadrupolo para PGE₂ producida por T. brucei BSF monomórfico sobreexpresante y ARNi de TbGST1. Aproximadamente 130 millones de parásitos de cada línea celular cultivada en presencia (+) o ausencia (-) de oxitetraciclina fueron incubados con 70 μM de AA en un volumen final de 360 μL. El sobrenadante de los cultivos fue purificado y analizado. A) Señal obtenida para cada fragmentación de PG (arriba) y para los estándares internos de PGE₂ Y PGD₂ (abajo). El tiempo de retención del estándar deuterado de PGE₂ fue de 6,54 minutos. **B**) Cromatograma correspondiente a la transición de PGE₂ más sensible (351/271), para las 4 muestras analizadas. El tiempo de retención para el pico de PGE₂ fue de 6,56 minutos. Para cada línea celular se muestran las cantidades relativas de **C**) PGE₂ producida y **D**) ácido araquidónico consumido.

En el cuadrante B se observa el cromatograma correspondiente a la transición de PGE₂ más sensible (351/271) para las diferentes líneas transgénicas. El patrón de picos se repite para las cuatro condiciones ensayadas por lo que nos permite realizar una comparación relativa entre ellas. Se calculó de forma sistemática el área bajo la curva del pico para PGE₂ y se graficó el área normalizada por el estándar interno y la cantidad de parásitos (cuadrante C). Podemos observar que existe un aumento en la producción de PGE₂ por parte de la línea SE inducida. Por otro lado, no vemos una disminución en la producción de PGE₂ por parte de la línea ARNi inducida, lo que sugiere que concentraciones muy bajas de TbGST1 mantienen el nivel de producción de PGE₂ o que puede existir una vía alternativa que mantiene la producción de PGE₂ en ausencia de TbGST1. El cuadrante D muestra el gráfico de consumo

de AA que denota un consumo mayor de sustrato por parte de la línea celular SE inducida en comparación a una muestra de la misma línea celular no inducida a sobreexpresar la TbGST1. Por otro lado, no se observan diferencias significativas tanto en el nivel de PGE₂ como de AA para la línea ARNi inducida y no inducida. Es importante destacar que estos valores son relativos a sus estándares deuterados y no es posible con este ensayo relacionar de manera directa el consumo de AA con la producción de PG's.

El perfil de los picos obtenidos por análisis de espectrometría de masas refleja un nivel de complejidad que requiere una profundización en su análisis para comprender a fondo la comunicación parásitohospedero a nivel de estos prostanoides. Sería de mucho interés estudiar la identidad de estos otros prostanoides (PGE₂-like) a futuro, ya que la actividad PGE₂ sintasa estudiada puede tener estéreoespecificidad diferente a la PGE₂ de mamíferos y producir otro tipo de isómeros. Este análisis escapa de los objetivos de este trabajo, pero plantea interesantes interrogantes para futuras investigaciones.

Los resultados obtenidos para la línea celular SE concuerdan con un experimento realizado por un grupo colaborador del Instituto Fiocruz Bahia (Salvador, Brasil). En este experimento se cultivaron parásitos de la línea celular monomórfica WT y SE de TbGST1 (en presencia o ausencia de inductor) con (15 μ M) o sin AA (detalles en la **sección 3.10.1**). La cantidad de PGE₂ secretada fue cuantificada en los sobrenadantes de cada cultivo por ELISA (**Figura 34**).



Figura 34. Cuantificación por ELISA de PGE₂ producido por las líneas celulares BSF monomórficas WT y SE. 10 millones de parásitos de cada condición fueron incubados (2 hs en placa de 96 pocillos) en 200 μ L de medio de cultivo suplementado con 0 μ M o 15 μ M AA. La PGE₂ se cuantificó en los sobrenadantes del cultivo por ELISA de competencia utilizando un kit comercial.

Es importante destacar que el *kit* de detección empleado no distingue entre isómeros específicos de PGE₂, por lo que asumimos que esta cuantificación toma en cuenta más de uno de los picos observados en el análisis por espectrometría de masas que presenta una mayor sensibilidad y resolución. No obstante, en ambos casos el incremento de PGE₂ observado en muestras correspondientes a la línea celular SE inducida respecto de la no inducida estuvo en el mismo orden de magnitud.

Algo a destacar es que ambos experimentos basados en metodologías diferentes arrojaron un resultado similar: la línea celular estimulada a sobreexpresar la TbGST1 muestra una mayor producción de PGE₂ lo cual nos permite verificar la hipótesis principal de este trabajo de tesis.

En vista de estos resultados es que se concluye que la proteína TbGST1 es capaz de producir PGE₂ en condiciones de cultivo *in vitro* y esta producción aumenta con la disponibilidad de ácido araquidónico que puede ser tomado del medio de cultivo. Los resultados de *Western blot* demuestran que si bien es posible silenciar de manera significativa la expresión de TbGST1 en la línea ARNi inducida (concentración intracelular menor 97 nM), esto no conlleva una disminución en la cantidad de PGE₂, lo que sugiere que existe una ruta alternativa e independiente de TbGST1 para la síntesis de PGE₂. Si bien este resultado sugiere que la GST1 podría no tener un rol indispensable en la supervivencia del parásito, ya que trazas de su actividad o bien por redundancia funcional con otra actividad(es) enzimática(s) *in vitro*, claramente no podemos afirmar que esto sea así *in vivo* y menos que el metabolismo de PGE₂ sea prescindible para este patógeno.

4.9 Modelos murinos de infección con T. b. brucei

Las condiciones de cultivo axénico de la forma infectiva de *T. brucei* se asemejan a las condiciones nutricionales y fisicoquímicas óptimas que estos parásitos pueden encontrar en su organismo hospedero mamífero. Sin embargo, los modelos *in vitro* están lejos de reproducir los diferentes desafíos que el patógeno debe enfrentar para colonizar y sobrevivir en su hospedador. Por lo tanto, decidimos estudiar si tanto la regulación a la baja como al alta de la expresión de la TbGST1 impacta en la capacidad infectiva del patógeno y la sobrevida del hospedero, empleando ratones (hembras de la cepa Balb/cJ) como modelo animal.

Los estudios de infección fueron realizados con las cepas monomórfica y pleomórfica de T. b. brucei ya que esto permitiría determinar si la TbGST1 posee algún rol importante en el proceso infeccioso agudo y crónico y/o en la diferenciación del parásito en el hospedero mamífero. En ese sentido, la cepa monomórfica corresponde a una línea celular que luego de varios años de ser cultivada in vitro perdió la capacidad de diferenciarse a la forma no replicativa en mamíferos (forma SS) y, por ende, de permitirle al parásito atravesar los distintos estadios de su ciclo biológico. No obstante, esta cepa posee una elevada tasa de proliferación la cual es únicamente controlada por la disponibilidad de nutrientes y, además, a nivel in vivo, por los mecanismos de defensa del hospedero. Las infecciones de animales de laboratorio con la cepa monomórfica de T. brucei tienen un desarrollo agudo y fulminante, se acompañan de altas tasas de parasitemia (10-1.000 millones parásitos/mL sangre) que conllevan a la muerte del animal al cabo de 1-2 semanas post-infección^{130,131,138,139}. Por el contrario, la cepa pleomórfica es capaz de desarrollar el ciclo de vida completo del parásito y en animales produce una infección tipo crónica caracterizada por las típicas ondas semanales de parasitemia y la invasión del sistema nervioso central¹³². In vitro e in vivo, el estadío infectivo de esta cepa presenta una tasa de proliferación menor a la de la cepa monomórfica ^{131,132} y alcanza densidades celulares inferiores a esta última debido a un fenómeno de quorum sensing que activa su diferenciación a la forma SS, la cual es apta para proliferar en el insecto no así en el mamífero (discutido en la sección 1.2).

Un aspecto importante abordado en los estudios *in vivo* realizados con la cepa pleomórfica fue la implementación de la técnica de imagenología para el monitoreo de la infección en tiempo real, con propósitos que trascienden la evaluación de la relevancia biológica de la TbGST1 y que serán discutidos más adelante.

4.9.1 Ensayos de infección con línea celular monomórfica ARNi y SE de TbGST1

En el primer ensayo se estudió la capacidad infectiva de *T. b. brucei* cepa monomórfica con expresión reprimida (línea celular ARNi inducida) o elevada (línea celular SE inducida) de la TbGST1. Durante 48 h previas a la infección, estas líneas celulares fueron mantenidas en fase de crecimiento exponencial en medio de cultivo sin y con oxitetraciclina (1 μ g/mL). Se conformaron cuatro grupos de animales (n=6/grupo) los cuales fueron infectados por vía intraperitoneal con parásitos TbGST1 SE no inducidos (SE -Tet) o inducidos con oxitetraciclina (SE +Tet), o con parásitos TbGST1 RNAi no inducidos (RNAi -Tet) o inducidos con oxitetraciclina (RNAi +Tet), respectivamente. Tres días previos a la infección y durante el curso del experimento, los animales correspondientes a los grupos +Tet fueron alimentados con agua conteniendo 1 mg/mL oxitetraciclina de manera de asegurar la inducción de los sistemas que controlan la expresión de TbGST1. Durante el experimento se evaluó la funcionalidad de los sistemas transgénicos que controlan la expresión de la TbGST1 (ARNi o sobreexpresión; **Figura 35**), el estado de salud y la supervivencia de los animales (**Figura 36**), así como la carga de parásitos en sangre (**Figura 37** y **Figura 38**).

Con el objeto de verificar el correcto funcionamiento de las líneas transgénicas en condiciones in vivo, se llevaron a cabo ensayos de Western blot en muestras de parásitos aisladas de animales de los distintos grupos de estudio, los cuales transitaban etapas avanzadas y terminales de la infección (ej. previo a su eutanasia). Tal como se puede observar en la Figura 35, los tripanosomas aislados de un animal infectado con la línea celular ARNi y alimentado con agua con oxitetraciclina (+Tet) presentaron un contenido de TbGST1 endógena 1,7 veces inferior al presente en parásitos aislados del animal que no recibió oxitetraciclina (-Tet). Esto demuestra que el sistema de ARNi dirigido contra la TbGST1 está operativo in vivo, aunque el nivel de silenciamiento alcanzado en dichas condiciones pareciera ser menos efectivo que el observado in vitro (Figura 20B). En lo que refiere al sistema de sobreexpresión de TbGST1, parásitos SE aislados del animal +Tet expresaron la copia ectópica de la TbGST1 en niveles 1,6 veces más elevados que la variante endógena de la proteína expresada por estos mismos parásitos o por los aislados del animal -Tet (Figura 35). Otro dato importante revelado por este análisis es que no se detectó expresión de la copia ectópica de TbGST1 en tripanosomas del animal -Tet, lo cual indica una represión eficiente del sistema de sobreexpresión en ausencia del agente inductor. En conjunto estos resultados permiten concluir que los sistemas inducibles de sobre-expresión y silenciamiento de TbGST1 funcionan de manera adecuada en el modelo de infección murino.



Figura 35. Análisis por Western blot de lisados (aproximadamente 10 millones de parásitos por carril) de T. b. brucei línea celular ARNi y SE de TbGST1 aislados de animales cursando estadíos avanzados de la infección y que fueron alimentados con agua con (+) o sin (-) oxitetraciclina (Tet) (suero anti-TbGST1 dilución 1:500).

La observación regular de los animales reveló diferencias para parámetros clínicos de peso, actividad y aseo. El grupo de la línea ARNi que se alimentó con agua con oxitetraciclina fue el primer grupo en mostrar signos de salud desmejorada (a partir del séptimo día), seguido de los grupos ARNi y SE que se

alimentaron sin agua con oxitetraciclina siendo el grupo SE alimentado con agua con oxitetraciclina el grupo en desarrollar estos signos con un retraso significativo en el tiempo.

Los animales infectados con la línea ARNi y alimentados con agua suplementada o no con oxitetraciclina presentaron una sobrevida media muy similar, de 12 y 11 días, respectivamente. Dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa (p = 0,4472). Algo similar se observó para los animales infectados con la línea celular SE y alimentados o no con oxitetraciclina, los cuales presentaron una sobrevida media idéntica (17 días). A pesar de que el deceso del último par de animales del grupo +Tet ocurrió 4 días posteriores al deceso de los últimos sobrevivientes del grupo -Tet, el análisis estadístico de supervivencia no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (**Figura 36**, p = 0,3278).



Figura 36. Gráfico de supervivencia animal Kaplan Meyer para ratones infectados con la línea celular monomórfica SE o ARNi de TbGST1 y alimentados (+Tet) o no (-Tet) con agua con oxitetraciclina.

El curso temporal de la parasitemia en animales infectados con la línea ARNi de TbGST1 (**Figura 37**) mostró un comportamiento similar al reportado en diferentes trabajos que emplearon diferentes líneas transgénicas de *T. b. brucei*¹³⁸⁻¹⁴¹. En líneas generales, la parasitemia es alta al día 4 post-infección, luego desciende marcadamente (al menos dos órdenes de magnitud) al día 7 para finalmente repuntar de manera significativa (al menos 2-3 órdenes de magnitud) del día 11 en adelante. El descenso en el número de parásitos en sangre que se observa al día 7 coincide con el pico de respuesta inmune innata que monta el hospedador para controlar la fase aguda de la infección ⁷². En la mayoría de los estudios *in vivo* realizados con la línea monomórfica hemos observado que el control de la infección por parte de los ratones es parcial y transitorio, y de manera excepcional algunos animales han logrado resolver exitosamente la infección, como sería el caso en este ensayo de uno perteneciente al grupo -Tet, el cual mostró máxima supervivencia y niveles de parasitemia por debajo del límite de detección. El análisis comparativo de la parasitemia en los grupos de animales - Tet y + Tet (prueba de Mann Whitney) no reveló diferencias estadísticas significativas (*p* > 0,05) para ninguno de los tiempos a los cuales se realizaron los análisis de sangre.



Figura 37. Carga parasitaria en sangre de ratones infectados con parásitos de la línea celular ARNi de TbGST1. La parasitemia fue determinada mediante recuento en microscopio (cámara de Neubauer) de muestras de sangre de seno submandibular. El límite de detección de la técnica de recuento empleada es de 2,5x10⁴ parásitos/mL.

En líneas generales, la infección de animales con la línea celular SE TbGST1 mostró un perfil de desarrollo similar al descrito para los ensayos con la línea ARNi TbGST1, destacándose una capacidad casi idéntica para establecer la infección (parasitemia al día 4; **Figura 38**), un descenso de la parasitemia a la semana post-infección en ambos grupos (inducido y no inducido) y su correspondiente aumento al día 11. Sin embargo, entre los días 11-16 post-infección, las parasitemias medias alcanzadas en los grupos infectados con parásitos SE (5x10⁷ parásitos/mL) fueron menores a las observadas para los grupos de animales infectados con la línea ARNi (5x10⁸ parásitos/mL). Esto sugiere que los parásitos de la línea SE poseen una menor capacidad de re-colonizar o proliferar en sangre luego del pico de respuesta inflamatoria, ya que la capacidad infectiva inicial (día 4) fue similar entre ambas líneas celulares. Tal como se mencionara más arriba, este fenotipo explica también la mayor tasa de supervivencia de los animales infectados con la línea SE respecto de la ARNi.

Al comparar la parasitemia del grupo inducido contra el no inducido para cada tiempo post-infección al cual se tomaron muestras de sangre, se observa que no hay diferencias significativas excepto para el día 7 (p = 0,02 para la prueba de Mann Whitney; **Figura 38**). A la semana post-infección, en 5 de 6 animales del grupo +Tet no fue posible detectar parásitos en sangre (límite de detección 2,5x10⁴ parásitos/mL) mientras que en todos los animales del grupo -Tet se identificaron tripanosomas con un valor promedio de 7,7x10⁵ parásitos/mL. A pesar de esta diferencia de al menos un orden de magnitud en los valores de parasitemia entre uno y otro grupo, 4 días más tarde (y en adelante), los animales del grupo -Tet alcanzaron niveles de parásitos en sangre que en promedio fueron similares a los del grupo -Tet.



Figura 38. Carga parasitaria en sangre de ratones infectados con parásitos de la línea celular SE de TbGST1. La parasitemia fue determinada mediante recuento en microscopio (cámara de Neubauer) de muestras de sangre de seno submandibular. El límite de detección de la técnica de recuento empleada es de 2,5x10⁴ parásitos/mL.

Dado que dicho fenómeno representó la única evidencia experimental de un comportamiento biológico diferencial asociado a la manipulación de la expresión de la TbGST1 es que se decidió repetir el estudio con un número menor de animales (n=3) y sólo analizando la parasitemia al día 7 post-infección (Figura **39**). De manera similar a lo observado en el experimento anterior, la parasitemia media en los animales +Tet (8x10⁵) fue al menos dos órdenes magnitud inferior a la presente en animales del grupo -Tet (1x10⁹). En dos animales del grupo +Tet el número de parásitos en sangre estuvo por debajo del límite de detección, mientras que en el mismo número de animales del grupo -Tet la parasitemia fue superior a 10⁸ parásitos/mL. A pesar de que el n de este experimento no brinda un nivel de robustez estadística adecuado, la reproducibilidad de las observaciones sugiere que los parásitos con alto contenido de TbGST1 son significativamente más sensibles a la acción de componentes de la respuesta inflamatoria aguda o bien escapan anticipadamente del torrente sanguíneo. Vale la pena destacar que nuestro estudio se limitó a detectar la presencia de parásitos en sangre, que si bien es uno de los principales compartimentos extracelulares donde el patógeno reside en el hospedero, no se trata del único. Diversos trabajos han demostrado que en etapas tempranas de la infección T. brucei coloniza el sistema linfático, tejido adiposo, genitales y el espacio intersticial^{142–145}. Por lo tanto, no podemos descartar que eventualmente la reducción del número de parásitos sobre-expresantes de TbGST1 circulando en sangre podría deberse a una reclusión (o tropismo) transitoria de los mismos en dichos compartimentos. Superado el pico de respuesta inmune sistémica, los parásitos que sobreexpresan la TbGST1 recolonizarían el sistema circulatorio del hospedero. La verificación de dichas especulaciones requeriría la realización de ensayos complementarios a nivel in vivo y ex vivo.



Figura 39. Parasitemia de ratones (n=3 por grupo) infectados con la línea celular SE de T. b. brucei y que fueron alimentados con agua con (+Tet) y sin (-Tet) oxitetraciclina. La parasitemia fue determinada mediante recuento en microscopio (cámara de Neubauer) de muestras de sangre de seno submandibular. El límite de detección de la técnica de recuento empleada es de 2,5x10⁴ parásitos/mL.

4.10 Ensayo de infección con línea celular pleomórfica SE de TbGST1

Dado que la sobreexpresión de la TbGST1 afectó la supervivencia de la forma monomórfica de T. b. brucei durante la fase aguda de la respuesta inmune, decidimos extender los estudios in vivo empleando la línea pleomórfica del patógeno y realizando el monitoreo de la infección por recuento de parásitos en sangre y técnica de imagenología. Además de permitir un análisis cuantitativo de la carga parasitaria en todo el cuerpo del animal, esta última técnica nos permite identificar focos de infección en el organismo hospedero. Para ello fue necesario integrar el gen reportero de la proteína luciferasa a la línea celular 1313 SE TbGST1 de la cepa Antat 1.1 utilizada en los experimentos de este trabajo. Se seleccionó la variante RE9H LUC de la luciferasa, la cual es estable a 37°C y al reaccionar con el sustrato (D-luciferina), ATP y O_2 libera energía en forma de luz que se emite a 617 nm¹¹³, es decir, en la zona roja del espectro visible. Esta última propiedad contribuye a reducir significativamente la pérdida de intensidad de luz por absorción de componentes orgánicos que se observa para la luciferasa convencional ($\lambda em = 557 \text{ nm}$) y permite la imagenología de regiones de tejido profundo y por lo tanto una mayor sensibilidad. Dicho reportero fue empleado con éxito para el monitoreo de la infección en una línea celular pleomórfica de T. b. brucei¹⁴⁶ y en nuestro laboratorio se generó una construcción de ADN que permite la integración estable de la RE9H LUC en el genoma de T. b. brucei, la expresión constitutiva y en muy buenos niveles del gen reportero, y la cual contiene un gen de selección que es compatible con el uso de sistemas/vectores inducibles (ARNi o SE) convencionales¹¹⁴. Estos estudios confirmaron además que el nivel de bioluminiscencia en parásitos de la forma sanguínea de T. brucei es directamente proporcional al número de parásitos, así como a su estado metabólico, lo cual, junto con otras propiedades señaladas arriba, convierte a este sistema reportero en una excelente herramienta para estimar la carga parasitaria en condiciones in vivo¹⁴⁷.

La forma sanguínea de parásitos de la línea celular pleomórfica SE GST1 (cepa Antat 1.1, línea 1313) transfectada con la construcción que codifica para la RE9H LUC dio lugar a varios clones resistentes a
puromicina en los cuales se determinó el nivel de expresión de este gen reportero mediante medidas de luminiscencia como se muestra en la **Tabla 5**. El clon AB6 presentó el mayor valor de luminiscencia para las condiciones del ensayo. Este clon (bautizado como Tb AnTat SEGST1-LUC) fue empleado en los estudios de infección animal que se describen a continuación.

Clon	Unidades de luz relativa (RLU)
AB6	69014
BC2	2295
BD5	3866
CB2	47031

Tabla 5. Bioluminiscencia de clones resistentes a puromicina

Durante 48 hs previas a la infección, la línea celular Tb AnTat SEGST1-LUC fue mantenida en fase de crecimiento exponencial en medio de cultivo sin y con oxitetraciclina (1 μ g/mL). Se conformaron dos grupos de animales (n=6/grupo) los cuales fueron infectados por vía intraperitoneal con parásitos no tratados (SE -Tet) o tratados con oxitetraciclina (SE +Tet). Tres días previos a la infección y durante el curso del experimento, los animales correspondientes al grupo +Tet fueron alimentados con agua conteniendo 1 mg/mL oxitetraciclina de manera de asegurar la inducción de los sistemas que controlan la expresión de TbGST1. Durante el experimento se evaluó el estado de salud, la supervivencia de los animales y la carga de parásitos en sangre (**Figura 42**). Los estudios de imagenología implicaron la cuantificación (**Figura 42**) y determinación de la distribución de señal de luminiscencia en cuerpo entero de al menos 3 animales por grupo (**Figura 43**).

Debido a que la producción de bioluminiscencia en condiciones in vivo depende de varios factores (ej. biodisponibilidad del sustrato, nivel de expresión del gen reportero, vida media del complejo bioluminiscente, carga parasitaria y estado metabólico, etc.), se optó por adquirir cursos temporales de imágenes de luminiscencia con el fin de determinar la cinética de la generación de señal y, eventualmente establecer un criterio de punto final (tiempo) al cual realizar el análisis cuantitativo. Con este fin se registraron imágenes de luminiscencia (30 seg de exposición) cada 1 min y por un total de 20 min para animales de ambos grupos. Vale la pena destacar que la imagenología de los animales se lleva a cabo en los 5-7 min posteriores a la inyección del sustrato D-luciferina. En la mayoría de los animales, e independientemente del grupo de estudio (SE -Tet o SE +Tet) y tiempo post-infección al cual se llevó a cabo el análisis, se puede observar que la señal de luminiscencia tiende a alcanzar un plateau o "meseta" luego de los primeros 5 min de iniciada la adquisición de imágenes (Figura 40 y Figura 41). También para la gran mayoría de los animales, el *plateau* de señal se extendió por los siguientes 15 min. Estos resultados muestran que in vivo se da una rápida biodistribución del sustrato, conversión a y estabilidad del producto/señal. Estas características permitirían llevar a cabo adquisiciones de imágenes de punto final (es decir a tiempo fijo) sin verse comprometidos los aspectos cuantitativos del análisis, a la vez que permitirían reducir el tiempo de exposición de los animales a la anestesia. De esta forma se contribuiría a refinar futuros ensayos con este modelo de infección y sistema reportero.



Figura 40. Cursos temporales de señal de luminiscencia para ratones infectados con Tb AnTat-SEGST1-LUC alimentados con agua sin oxitetraciclina (-Tet). Se grafica la densitometría de señal de luminiscencia de cuerpo completo (luminiscencia/área) para adquisiciones realizadas cada 1 min y por un total de 20 min. El día 4 se observó una señal muy débil para el ratón 1, por lo que, bajo la sospecha de tratarse de un caso de no infección, se decidió incorporar al ratón 0 en las adquisiciones posteriores.



Figura 41. Cursos temporales de señal de luminiscencia para ratones infectados con Tb AnTat-SEGST1-LUC alimentados con agua con oxitetraciclina (+Tet). Se grafica la densitometría de señal de luminiscencia de cuerpo completo (luminiscencia/área) para adquisiciones realizadas cada 1 min y por un total de 20 min.

En primer lugar, para el período de tiempo por el cual se extendió el experimento (42 días) no se observaron signos graves de la enfermedad ni se produjeron decesos (espontáneos o voluntarios) de los animales de cada grupo. En otras palabras, se alcanzó una tasa de supervivencia del 100% en ambos grupos. Por otro lado, en concordancia con las descripciones realizadas para el modelo de infección

animal por una cepa pleomórfica de *T. brucei*¹⁴⁶, ésta estuvo caracterizada por ondas regulares de descenso y ascenso de la parasitemia cuyos valores fluctuaron entre 1-100 millones de parásitos/mL (**Figura 42**).



Figura 42. Análisis de parasitemia y luminiscencia en ratones infectados con T. brucei Antat 1.1-1313 SE TbGST1. A diferentes tiempos post-infección se analizó la parasitemia (límite de detección = 2,5x10⁴ parásitos/mL sangre; símbolos rojos) y la señal de bioluminiscencia (máximo de intensidad) de cuerpo completo (luminiscencia/área = cm², símbolos azules) en todos o en al menos tres animales, respectivamente, de cada grupo en estudio: inducido (SE +Tet) y no inducido (SE - Tet) a sobreexpresar la TbGST1. Los asteriscos indican diferencias significativas (prueba de Mann Whitney) en los valores de parasitemia de cada grupo con un p<0,015 para el día 4 y p<0,006 para el día 11.

Para la gran mayoría de animales de cada grupo, la parasitemia alcanzó un valor mínimo por debajo del límite de detección al día 7 post-infección, lo cual en términos generales concuerda con el fenómeno observado para animales infectados con parásitos monomórficos (Fig. 35) y el mencionado pico de la respuesta inmune innata montada por los ratones para controlar la infección ⁷².

Sin embargo, mientras que la sobreexpresión de la TbGST1 en tripanosomas monomórficos tuvo un impacto negativo en los niveles de parásitos en sangre en ese momento específico de la infección, no se observó el mismo efecto en parásitos pleomórficos del grupo SE TbGST1 +Tet (**Figura 42**, día 7) en relación al grupo SE TbGST1 -Tet. No obstante, se notaron diferencias significativas en los niveles de parasitemia entre los grupos + y - Tet en días previos (día 4) y posteriores (día 11) al día 7. En etapas iniciales de la infección (día 4), el grupo de animales infectados con parásitos inducidos a sobreexpresar la TbGST1 presentaron un nivel de parasitemia significativamente superior (p > 0,015; 3,2x10⁸ parásitos/mL) al del grupo no inducido (1x10⁸ parásitos/mL). De manera inversa, al día 11 post-infección, la parasitemia fue significativamente inferior en el grupo de animales + Tet (p > 0,006; 4,3x10⁴ parásitos/mL) respecto a la determinada en animales del grupo no inducido (3,3x10⁵ parásitos/mL). Si bien preliminares, estos datos sugieren cierto rol de la TbGST1 en modular la capacidad del patógeno para proliferar en y/o colonizar el torrente sanguíneo del hospedero en etapas tempranas de la infección (fase aguda).

En ese sentido, el análisis de bioluminiscencia realizado sobre un número representativo de animales ($n\geq3$) de cada grupo reveló detalles interesantes sobre el desempeño de la nueva línea reportera transgénica en condiciones *in vivo*, así como sobre la biodistribución de los parásitos en el cuerpo del animal.

En primer lugar, se pudo verificar la gran estabilidad de la integración y expresión del sistema reportero a nivel *in vivo* ya que en varios animales de ambos grupos se logró detectar señal de bioluminiscencia al día 42 post-infección, siendo que en el curso completo de la infección no existió presión de selección para la retención del gen reportero (**Figura 43** y **Figura 44**). Por otro lado, resultó llamativa la falta de correlación entre el nivel de parásitos circulando en sangre y la señal de luminiscencia registrada al día 7 post-infección. En dicho día la parasitemia sufre un descenso marcado en la gran mayoría de los animales de ambos grupos mientras que a nivel de luminiscencia es cuando se registraron los niveles globales de señal más elevados (**Figura 42**). Esto por un lado indica que un gran número de parásitos escapa del sistema circulatorio para alojarse en tejido profundo intersticial y por otro lado sugiere que estos nichos conforman la reserva de patógeno que, superado el pico de respuesta inmune innata a nivel sistémico, recolonizará el torrente sanguíneo y otros sistemas o espacios extracelulares.



Figura 43. Imágenes de rayos X y bioluminiscencia normalizada de ratones infectados con T. brucei Antat 1.1-1313 SE TbGST1. Las imágenes de bioluminiscencia se muestran en pseudocolor (mpl-inferno, imágenes de 16 bit correspondiente a escala de grises de 0 a 65535) superpuestas sobre imágenes de rayos X que permiten definir el área del cuerpo del animal. Se adquirieron imágenes de al menos tres animales de cada grupo en estudio: inducido (+Tet) y no inducido (- Tet) a sobreexpresar la TbGST1.

Otro aspecto importante que nos permitió abordar la técnica de imagenología *in vivo* basada en bioluminiscencia fue indagar sobre las regiones/sitios colonizados por el patógeno durante el curso de la infección, y poder establecer tropismos específicos que puedan relacionarse con estadios particulares del proceso infeccioso o de la sobreexpresión de la TbGST1. Con tal fin, se procedió a analizar las imágenes de bioluminiscencia correspondientes a las intensidades máximas de señal alcanzadas para cada grupo de animales (n≥3, **Figura 43**). De manera general, las imágenes muestran que en la fase inicial (día 4), el foco de infección se concentra en la región abdominal, lo cual es compatible con el sitio de inoculación del patógeno (inyección intraperitoneal en flanco abdominal). Rápidamente, la infección luego se extiende hacia la zona abdominal superior y el tórax de los animales (día 7). Excepto por un animal del grupo -Tet, al día 11 el foco infeccioso vuelve a reducirse o ubicarse en la zona abdominal

inferior/media. A partir de este día en adelante lo que se observa es una distribución mucho más localizada del patógeno en tejidos que podrían incluir bazo, órganos reproductores y genitales, pulmón, intestinos, riñones, timo y fosas nasales/meninges. También en términos generales no se pudo apreciar un tropismo selectivo de parásitos estimulados a sobreexpresar la TbGST1 respecto de aquellos que no fueron inducidos a hacerlo (**Figura 44**). El único aspecto llamativo fue que al día 11, cuando la parasitemia de los animales infectados con TbGST1 SE -Tet es significativamente superior a la del grupo +Tet, un número importante de parásitos del segundo grupo, y no así del grupo -Tet, permanecería colonizando la zona abdominal (**Figura 44**). Esto en parte indicaría cierta incapacidad del patógeno por recolonizar el torrente sanguíneo cuando la TbGST1 es sobreexpresada y luego de la respuesta inmune innata, o visto de otra forma, cierta capacidad incrementada del patógeno por colonizar y sobrevivir fuera del sistema circulatorio en esta etapa específica de la infección.



Figura 44. Imágenes con escala de LUT según la intensidad máxima de cada adquisición que permite observar localización en cada día de la infección

En resumen, el conjunto de estos resultados confirma que la TbGST1 no juega un rol destacado como factor de virulencia que se haya traducido en supervivencia disminuida o en fenotipos clínicos notorios de los animales infectados. No obstante, el monitoreo de la parasitemia, así como la técnica de imagenología *in vivo* han revelado un comportamiento diferencial de los tripanosomas que sobreexpresan esta proteína sugiriendo que la misma podría regular o estar asociada a procesos de proliferación y colonización tisular en las etapas tempranas o fase aguda de la infección (primeras dos semanas).

5. Conclusiones y aportes

Para caracterizar la TbGST1 a nivel molecular y enzimático y obtener anticuerpos contra la proteína que permitiesen, por un lado, confirmar el funcionamiento de las líneas transgénicas de *T. brucei* y, por otro, realizar estudios de inmunohistoquímica, se buscó obtener la proteína de forma recombinante.

Se ensayó la expresión de TbGST1 en su variante con y sin la región TMD y fusionada o no a diferentes proteínas de fusión que favorecen la expresión de proteínas en su forma soluble en diferentes cepas bacterianas y aplicando 4 protocolos diferentes de expresión. Sin importar las variantes, la TbGST1 siempre fue recuperada en la fracción insoluble de los lisados bacterianos. Las razones detrás de este fracaso las desconocemos y podemos atribuirla a aspectos específicos del plegamiento de esta proteína bajo condiciones fisiológicas que posiblemente *E. coli* no esté brindando. Si bien nuestros estudios de localización subcelular indican que TbGST1 forma parte de vesículas, muy posiblemente anclada a la membrana de estas a través de su región TMD, aún desconocemos si la proteína es secretada o es reciclada una vez que el contenido de esas vesículas es liberado al medio extracelular. Si la TbGST1 fuera secretada, es probable que la misma posea algún tipo de modificación postraduccional que impacte en su estructura y que *E. coli* no es capaz de llevar a cabo, como se verificó recientemente para una proteína de *T. cruzi*¹⁴⁸. En ese sentido, futuros trabajos deberían explorar la expresión de esta proteína

Si bien estos resultados nos impidieron avanzar con la caracterización molecular y enzimática de la proteína, la forma insoluble de la proteína recombinante (luego de ser sometida a un proceso de extracción y purificación a partir de cuerpos de inclusión) fue empleada para la obtención de sueros policlonales murinos. Este suero policlonal demostró una buena especificidad por la TbGST1 tanto en su forma nativa como etiquetada con c-Myc2 lo que permitió evaluar el funcionamiento de las líneas transgénicas de *T. brucei,* así como estimar su concentración y confirmar su localización intracelular y seguir sus niveles de expresión en diferentes condiciones.

La evaluación de las líneas transgénicas que permiten regular a la baja y al alta la TbGST1 ha sido un punto de suma importancia para indagar sobre el rol de esta proteína en el crecimiento de los parásitos *in vitro* y en el contexto de la infección en un modelo murino. Se observó que las líneas SE y ARNi generadas sobre parásitos monomórficos dieron lugar a sistemas más eficientes en cuanto al control de la expresión de las secuencias transgénicas respecto de las respectivas líneas celulares generadas sobre parásitos pleomórficos. En relación a esto, vale la pena destacar que estas líneas celulares se caracterizan por presentar contextos epigenéticos distintivos. Mientras los parásitos BSF monomórficos sólo muestran la expresión activa de genes de locus específicos y asociados a la forma LS¹⁴⁹, la línea celular pleomórfica posee una mayor plasticidad genómica que posibilita la expresión (solapada, en algunas fases del desarrollo) de paquetes de genes necesarios para cada estadio de diferenciación de su ciclo de vida¹⁵⁰. Tal vez esta ductilidad y control más laxo de la regulación de la expresión transgénicos e inducibles empleados en este trabajo.

El análisis del fenotipo de crecimiento *in vitro* para las líneas transgénicas (bajo condiciones que inducen tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de la TbGST1) mostró que las mismas poseen tasas de replicación y capacidad de crecimiento (densidades celulares máximas) similar a la observada para la línea parental. Estos resultados permiten concluir, al menos de manera preliminar en lo que refiere a la condición de silenciamiento de esta proteína (ver comentarios en el próximo párrafo), que la TbGST1 no confiere ninguna ventaja ni desventaja para la proliferación de las líneas sanguíneas transgénicas mono

y pleomórficas en condiciones de cultivo *in vitro* óptimas de *T. brucei*. Este resultado es relevante ya que refiere al estadio del parásito que presenta relevancia desde el punto de vista clínico. No obstante, no podemos descartar que dicha proteína posee algún rol en mecanismos de defensa o metabolización de xenobióticos como puede ser el caso de algunos fármacos y como fue recientemente demostrado para la "old yellow enzyme" de *T. cruzi*, una proteína con capacidad biosintética de PGF2- α^{68} . Estudios futuros deberían investigar este aspecto explotando el uso de las líneas transgénicas generadas en el marco de este y trabajos anteriores.

Dado que la técnica de ARNi no permite suprimir de manera total la expresión del gen blanco, es posible que aún concentraciones bajas de la TbGST1 sean suficientes para sostener el metabolismo/funciones en el/las cual/es ésta participa. Por ese motivo y con el propósito de obtener un resultado concluyente en cuanto a la esencialidad de TbGST1 en *T. brucei*, es que se intentó generar una línea celular KO para TbGST1 mediante sustitución por recombinación homóloga. Se logró obtener una línea KO heterocigota para GST1 (es decir se reemplazó la secuencia de este gen en uno de los alelos cromosómicos) pero no fue posible obtener un KO homocigota, incluso partiendo de una línea celular donde era posible mantener la expresión de una copia ectópica de la TbGST1 o bien empleando diferentes estrategias de presión de selección. Por lo tanto, e independientemente del modelo de estudio (*in vitro, in vivo*), aún no podemos concluir acerca de la esencialidad de la TbGST1.

El suero anti-TbGST1 permitió además confirmar la localización subcelular de TbGST1 previamente determinada por nuestro grupo por ensayos de inmunofluorescencia. La detección de TbGST1 por el antisuero demostró un patrón similar al reportado, pero evidenció una baja sensibilidad con relación al anticuerpo anti-c-Myc, probablemente debido a que el antisuero se obtuvo por inmunización con la proteína desnaturalizada y, principalmente, que el anticuerpo comercial es monoclonal. La intensidad de señal de las imágenes para las líneas transgénicas en presencia o ausencia de inductor guardan concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de Western blot. Se confirma que TbGST1 presenta un patrón de localización en estructuras bien definidas de forma circular (en un plano bidimensional, o esférico), que hacen pensar en vesículas, dispuestas como un collar de perlas que crecen en tamaño a medida que se acercan a la parte anterior del parásito. Estas estructuras están rodeadas de membrana y su detección cerca del bolsillo flagelar, que es el principal sitio de endo y exocitosis en estos parásitos sugiere un destino exocítico para al menos el contenido de las mismas. Esto abre varios interrogantes interesantes como por ej. (i) ¿qué disposición adopta la TbGST1 en dichos compartimentos?, ¿el dominio GST mira hacia el lumen o hacia el citosol?; (ii) ¿es la TbGST1 secretada al medio extracelular o es reciclada junto con otros componentes de estas vesículas? En base a los resultados de las determinaciones de PGE2 realizados sobre las líneas transgénicas es altamente probable que la TbGST1 esté catalizando la formación de PGE₂ en el lumen de estas vesículas, donde dicho producto es compartimentalizado y transportado hasta el bolsillo flagelar para su secreción al medio extracelular, donde ejercería su acción. Por otro lado, un reciclaje activo de la TbGST1 estaría asociado a un turnover bajo de la proteína lo cual, si esta proteína cumpliera un rol esencial, podría en parte explicar el no haber observado efectos deletéreos cuando se suprimió su expresión.

Para la forma monomórfica LS de *T. brucei* se estimó que TbGST1 presenta en la fase exponencial del crecimiento una concentración intracelular de aproximadamente 190 nM, y que su contenido intracelular se incrementa a lo largo de las distintas fases de crecimiento del parásito, alcanzando un máximo en la fase estacionaria. En lo que refiere al contenido intracelular, y teniendo en cuenta el tamaño/volumen reducido de las vesículas donde se detectó la presencia de TbGST1, es altamente probable que la concentración de esta proteína en dichas vesículas sea al menos 10 veces superior al estimado en el volumen citosólico. Restaría realizar estudios similares con la forma pleomórfica para

determinar si existen necesidades estadio-específicas con respecto al contenido de esta proteína (y por ende de su producto).

Para responder una de las preguntas centrales que dieron puntapié a este proyecto se analizó la capacidad de TbGST1 de producir PGE₂ *in situ*, es decir en el parásito y el medio en el cual éste se cultiva *in vitro*. Mediante un análisis cuantitativo por espectrometría de masas cuadrupolo acoplado a HPLC se analizó la cantidad de PGE₂ producida por las líneas transgénicas SE y ARNi en cultivos suplementados con ácido araquidónico y en presencia o no de agente inductor. Este análisis reveló que la línea que sobreexpresa TbGST1 produce mayores cantidades de PGE₂ en presencia de inductor, condición en la cual, se observó una concentración mayor de TbGST1. Este análisis también reveló la presencia de una especie muy similar a PGE₂, posiblemente un estereoisómero al que denominamos PGE₂-like que denota un nivel de complejidad en la composición de prostanoides parasitarios que requiere una profundización en su análisis para comprender a fondo la comunicación parásito-hospedero mediada por estas moléculas. Este resultado concordó con otro experimento similar pero donde la cantidad de PGE₂ producida por estas líneas transgénicas fue cuantificada por un ensayo de ELISA. Estos resultados nos permitieron confirmar la hipótesis principal de este trabajo al poder corroborar que la TbGST1 es capaz de producir PGE₂ a expensas de AA y que por lo tanto su clasificación basada en secuencia y estructura que le asignaba un rol putativo como MAPEG era correcto⁸⁸.

Otra de las hipótesis planteadas en cuanto al rol que podría tener la TbGST1 a través de la producción de PGE₂ era que a través de este mediador el parásito regulara la respuesta inmune del hospedero o su propia diferenciación/proliferación durante la infección. Para abordar este interrogante, se llevaron a cabo experimentos de infección sobre ratones (hembras de la cepa Balb/cJ) con las líneas celulares transgénicas de TbGST1 generadas en las cepas monomórfica y pleomórfica de T. b. brucei. Los primeros ensayos evaluaron la capacidad infectiva de líneas celulares de la cepa monomórfica con expresión reprimida (línea celular ARNi inducida) o elevada (línea celular SE inducida) de la TbGST1, siguiendo parámetros de parasitemia en sangre y supervivencia media. Estos ensayos no revelaron diferencias significativas en la sobrevida media de los parásitos de un mismo grupo en condiciones de cultivo con y sin inductor. El análisis de la parasitemia, sin embargo, reveló diferencias en los niveles de parásitos detectados en sangre entre los grupos SE y ARNi en los días posteriores al día 7, siendo aproximadamente un orden mayor en los grupos ARNi que en los grupos SE. Además, se observó una diferencia interesante al comparar la parasitemia del día 7 de los grupos SE +Tet y SE -Tet. En 5 de 6 animales del grupo + Tet, no fue posible detectar parásitos en sangre, mientras que en todos los animales del grupo -Tet se detectaron parásitos con un valor de parasitemia promedio de 7,7x10⁵ parásitos/mL. Esto sugiere que los parásitos de la línea SE poseen una menor capacidad de re-colonizar o proliferar en sangre luego del pico de respuesta inflamatoria. Es posible también, que los parásitos con altos niveles de TbGST1 sean más sensibles a la acción de componentes de la respuesta inflamatoria aguda o que altos niveles de TbGST1 promuevan la colonización del sistema linfático y espacio intersticial, facilitando el escape del sistema sanguíneo que es donde se concentra la respuesta inmune innata, o en contraposición, que inhiba la re-colonización del sistema circulatorio. Estas hipótesis podrían explicar la baja parasitemia en sangre observada el día 7 de la infección para el grupo SE + Tet.

En vista de estos resultados se extendieron los estudios *in vivo* empleando la línea pleomórfica sobreexpresante para TbGST1 del patógeno realizando el monitoreo de la infección por recuento de parásitos en sangre y técnica de imagenología. El desarrollo de la línea celular pleomórfica que expresa la proteína luciferasa fue un hito de este trabajo, ya que, por un lado, permitió identificar focos de infección y realizar una comparación de dos parámetros clínicos importantes: la parasitemia en sangre vs. la distribución corporal del parásito determinada por medición de luminiscencia, lo cual brinda una información mucho más completa del proceso infeccioso. Por otro lado, este fue el primer trabajo que

reporta la generación de una línea reportera para la expresión constitutiva de una luciferasa "corrida al rojo" sobre parásitos pleomórficos transgénicos que permiten el uso de sistemas inducibles para regular la expresión de genes. La línea reportera generada mostró un muy buen nivel y estabilidad de la señal de bioluminiscencia en condiciones exigentes como lo son experimentos *in vivo*, donde se retira totalmente la presión de selección tanto del gen reportero como del sistema que controla la expresión tetraciclina-regulable de otros genes de interés.

Los animales infectados con la cepa pleomórfica cursaron con ondas regulares de descenso y ascenso de la parasitemia sin mostrar signos graves de la enfermedad ni decesos hasta el día 42, momento en el cual se decidió dar por finalizado el experimento. A diferencia del ensayo con la cepa monomórfica, para esta cepa no se observó un efecto negativo en los niveles de parasitemia de tripanosomas SE+Tet en relación al grupo SE-Tet el día 7 de la infección. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los niveles de parasitemia entre los grupos + y – Tet en días previos (día 4) y posteriores (día 11) al día 7, lo que sugiere cierto rol de la TbGST1 en modular la capacidad del patógeno para proliferar en y/o colonizar el torrente sanguíneo del hospedero en esta fase aguda de la infección, que de hecho es la que determina el establecimiento/colonización exitosa del hospedero por parte del patógeno.

De forma interesante, se observó una falta de correlación muy llamativa entre el nivel de parásitos circulando en sangre y la señal de luminiscencia registrada al día 7 post-infección. En este día la parasitemia sufre un descenso marcado en la gran mayoría de los animales de ambos grupos mientras que a nivel de luminiscencia es cuando se registraron los niveles globales de señal más elevados. Como se comentó anteriormente, estos parásitos han demostrado colonizar otros tejidos y espacios intersticiales, y a diferencia del recuento de parásitos en sangre, este análisis de luminiscencia permite observar y cuantificar este fenómeno. A partir del día 11 se observó una distribución localizada del patógeno en tejidos que podrían incluir bazo, órganos reproductores y genitales, pulmón, intestinos, riñones, timo y fosas nasales/meninges. No se observó un tropismo selectivo de parásitos a sobreexpresar la TbGST1 respecto de aquellos que no fueron inducidos a hacerlo.

La PGE₂ produce efectos en células blanco al unirse a los receptores EP1-4. Estos receptores se expresan en células endoteliales y células del músculo liso, dos tipos de células que recubren vasos sanguíneos y linfáticos¹⁵¹. La PGE₂ ha demostrado regular la permeabilidad del endotelio *in vivo* e *in vitro*^{152,153} y también contribuir a la regulación del tono del músculo liso¹⁵⁴. Estos procesos podrían afectar la capacidad de los tripanosomas de ingresar y/o salir del torrente sanguíneo.

Recordemos también que las líneas transgénicas monomórficas demostraron una mayor eficiencia en regular la expresión al alta y a la baja de TbGST1 que las líneas transgénicas pleomórficas. Se observó una diferencia significativa en la parasitemia en sangre entre el grupo SE +Tet y el grupo SE – Tet de la línea monomórfica al día 7 de la infección, sugiriendo que altos niveles de TbGST1 y en consecuencia altos niveles de PGE₂, afectan de forma negativa la capacidad de estos parásitos de re-colonizar el sistema circulatorio. No se observó el mismo fenómeno para la línea pleomórfica, quizás por sus diferencias intrínsecas o quizás por el deficiente funcionamiento de la línea transgénica SE (se observó expresión de la forma ectópica de TbGST1 incluso en ausencia de inductor), pero gracias al análisis de bioluminiscencia queda en evidencia que la ausencia de parásitos en el sistema circulatorio se debe, al menos en parte, a que estos se localizan en otras zonas del cuerpo del animal.

En ⁶⁴ se reportaron niveles más altos de PGE₂ en la forma *short-stumpy* que en las formas *long-slender* y prociclíca. Este fenómeno de regulación de la permeabilidad de tejido endotelial y tejido del músculo liso puede formar parte de las variadas estrategias que presenta este patógeno para evadir el sistema de defensas de su hospedero.

En organismos muy emparentados se estudió el rol de la PGE₂ como factor de virulencia. Vesículas extracelulares producidas por *T. cruzi* desencadenan la producción de PGE₂ por macrófagos in vitro, incluso en la ausencia de parásitos¹⁵⁵. La inhibición de enzimas COX por aspirina demostró una reducción en la capacidad de internalización de tripomastigotas en monocitos humanos¹⁵⁶. Esta producción de PGE₂ por macrófagos genera un ambiente más favorable para el establecimiento de la infección por T. cruzi¹⁵⁵. La inhibición de PGE₂ también demostró una reducción de lesiones cardiacas durante la fase aguda en una infección experimental¹⁵⁷

Las infecciones con Leishmania donovani afectan principalmente órganos viscerales, principalmente hígado y bazo, en donde se ha observado una alta expresión de prostaglandina sintasas. Infecciones de una línea celular de macrófagos de ratón con L- donovani y tratamiento con aspirina y PGE₂ demostró que la PGE₂ compromete la acción de defensa de los macrófagos favoreciendo el establecimiento de la infección¹⁵⁸.

Con relación a la hipótesis central de este trabajo, planteamos que la TbGST1 es responsable de la producción de PGE₂ y si bien, en las condiciones ensayadas, ésta no presenta un rol destacado como factor de virulencia que se haya traducido en supervivencia disminuida o en fenotipos clínicos notorios de los animales infectados, esta proteína parece regular o estar asociada a procesos de proliferación y colonización tisular en las etapas tempranas de la infección. En este trabajo no se logró obtener la proteína de forma recombinante para realizar una caracterización bioquímica de la misma y determinar su cinética enzimática. Quizás la TbGST1 sea capaz de catalizar la producción de PGE₂ a concentraciones muy bajas. Al no lograr obtener un KO para TbGST1 y en vista de que la producción de PGE₂ se mantiene en las líneas transgénicas ARNi, no es posible responder preguntas acerca de su esencialidad o fenotipo en ausencia de la misma.

La producción de prostaglandinas por parte de estos parásitos y el estudio de éstas en el contexto de la infección resultan extremadamente complejas y su estudio debe abarcarse desde múltiples disciplinas. Esperamos que los resultados de este trabajo despierten interés en el estudio detallado del perfil de PGs que producen estas PG sintasas, especialmente la caracterización de isómeros y su rol en regular la permeabilidad del tejido endotelial que probablemente afecte la migración tisular de este patógeno. También resta evaluar el rol de esta proteína en el metabolismo de fármacos y/u oxidantes, tarea que será más sencilla, gracias a las herramientas desarrolladas en este trabajo.

6. Bibliografía

- 1. Vickerman, K. DEVELOPMENTAL CYCLES AND BIOLOGY OF PATHOGENIC TRYPANOSOMES. British Medical Bulletin **41**, (1985).
- 2. Balmer, O., Beadell, J. S., Gibson, W. & Caccone, A. Phylogeography and Taxonomy of Trypanosoma brucei. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e961 (2011).
- 3. Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. & Lukeš, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology* **22**, 168–174 (2006).
- 4. Maslov, D. A., Votýpka, J., Yurchenko, V. & Lukeš, J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: All that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology* **29**, 43–52 (2013).
- 5. Stevens, J., Noyes, H., Dover, G., Parasitology, W. G.- & 1999, U. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, Trypanosoma brucei and T. cruzi. *academia.edu*
- 6. Chagas, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1**, 159–218 (1909).
- 7. Pawlowski, J. Protist Evolution and Phylogeny. in *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd, 2014). doi:10.1002/9780470015902.a0001935.pub2
- 8. CDC Neglected Tropical Diseases Diseases. Available at: https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html. (Accessed: 15th December 2020)
- 9. Lidani, K. C. F. *et al.* Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *Journal of Physical Oceanography* **49**, 166 (2019).
- 10. Chagas disease | DNDi. Available at: https://dndi.org/diseases/chagas/. (Accessed: 15th December 2020)
- 11. Walter Ledermann, D. Aldo castellani and the expeditions of the Royal Society to the black sleep's country. *Rev. Chil. Infectol.* **28**, 276–281 (2011).
- 12. Symptoms, transmission, and current treatments for sleeping sickness | DNDi. Available at: https://dndi.org/diseases/sleeping-sickness/facts/. (Accessed: 15th December 2020)
- 13. Kristensson, K., Nygård, M., Bertini, G. & Bentivoglio, M. African trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Progress in Neurobiology* **91**, 152–171 (2010).
- 14. Vanhamme, L. *et al.* Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* **422**, 83–87 (2003).
- 15. Vanhamme, L. & Pays, E. The trypanosome lytic factor of human serum and the molecular basis of sleeping sickness. *International Journal for Parasitology* **34**, 887–898 (2004).
- 16. Ponte-Sucre, A. An overview of trypanosoma brucei infections: An intense host-parasite interaction. *Frontiers in Microbiology* **7**, (2016).
- 17. Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V. & Priotto, G. Human African trypanosomiasis. *Lancet* **390**,

2397–2409 (2017).

- 18. Goodhead, I. *et al.* Whole-genome sequencing of Trypanosoma brucei reveals introgression between subspecies that is associated with virulence. *MBio* **4**, (2013).
- 19. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). Available at: https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness). (Accessed: 7th November 2019)
- 20. Berriman, M. *et al.* The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. *Science (80-.).* **309**, 416–422 (2005).
- 21. Engstler, M. *et al.* Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in Trypanosoma brucei. *J. Cell Sci.* **117**, 1105–1115 (2004).
- 22. Natesan, S. K. A., Black, A., Matthews, K. R., Mottram, J. C. & Field, M. C. Trypanosoma brucei brucei: Endocytic recycling is important for mouse infectivity. *Exp. Parasitol.* **127**, 777–783 (2011).
- 23. MacGregor, P., Szöo'R, B., Savill, N. J. & Matthews, K. R. Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: An elegant balancing act. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 431–438 (2012).
- 24. Mony, B. M. *et al.* Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in Trypanosoma brucei. *Nature* **505**, 681–685 (2014).
- 25. Rojas, F. *et al.* Oligopeptide Signaling through TbGPR89 Drives Trypanosome Quorum Sensing. *Cell* **176**, 306-317.e16 (2019).
- 26. tryp_culture_commentary. Available at: http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2_culture_commentary.html. (Accessed: 8th September 2020)
- 27. Maudlin, I. African trypanosomiasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **100**, 679–701 (2006).
- 28. Tyler, K. M., Matthews, K. R. & Gull, K. The bloodstream differentiation-division of Trypanosoma brucei studied using mitochondrial markers. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **264**, 1481–1490 (1997).
- 29. Kohl, L. & Bastin, P. The flagellum of trypanosomes. *International Review of Cytology* **244**, 227–285 (2005).
- 30. Helfert, S., Estévez, A. M., Bakker, B., Michels, P. & Clayton, C. Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in Trypanosoma brucei. *Biochem. J.* **357**, 117–125 (2001).
- 31. Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R. & Michels, P. A. M. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biology and Disease* **2**, 1–30 (2003).
- 32. Priest, J. W. & Hajduk, S. L. Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in Trypanosoma brucei. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 179–191 (1994).
- 33. Vertommen, D. *et al.* Differential expression of glycosomal and mitochondrial proteins in the two major life-cycle stages of Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**, 189–201 (2008).
- 34. Docampo, R. & Moreno, S. N. J. Acidocalcisomes. *Cell Calcium* **50**, 113–119 (2011).

- 35. Bruno Manta. Análisis funcional de glutarredoxinas monotiólicas de tripanosoma. (Universidad de la República, Uruguay, 2013).
- 36. Berriman, M. *et al.* The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. *Science (80-.).* **309**, 416–422 (2005).
- 37. Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871–1875 (2001).
- 38. Dennis, E. A. & Norris, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* **15**, 511–523 (2015).
- 39. Kühn, H. & Borngräber, S. Eicosanoids and related compounds: in *Eicosanoids and Related Compounds in Plants and Animals* 3–24 (Princeton University Press, 2018). doi:10.2307/j.ctv3hh45c.6
- 40. Zhou, L. & Nilsson, Å. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *Journal of Lipid Research* **42**, 1521–1542 (2001).
- 41. Smyth, E. M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y. & FitzGerald, G. A. Prostanoids in health and disease. *Journal of Lipid Research* **50**, (2009).
- 42. Eberhart, C. E. & Dubois, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **109**, 285–301 (1995).
- 43. Aoki, T. & Narumiya, S. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences* **33**, 304–311 (2012).
- 44. Shimizu, N. & Nakamura, T. Prostaglandins as hormones. *Dig. Dis. Sci.* **30**, 109S-113S (1985).
- 45. Ricciotti, E. & Fitzgerald, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 986–1000 (2011).
- 46. DuBois, R. N. *et al.* Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* **12**, 1063–1073 (1998).
- 47. and, W. S.-H. of eicosanoids: prostaglandins & 2017, undefined. Localization of enzymes responsible for prostaglandin formation. *books.google.com*
- 48. Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S. & Sugimoto, Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin e receptors. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids* **1851**, 414–421 (2015).
- 49. Hirata, T. & Narumiya, S. Prostanoids as Regulators of Innate and Adaptive Immunity. in *Advances in Immunology* **116**, 143–174 (Academic Press Inc., 2012).
- 50. Dennis, E. A. & Norris, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* **15**, 511–523 (2015).
- 51. Samuelsson, B., Morgenstern, R. & Jakobsson, P. J. Membrane prostaglandin E synthase-1: A novel therapeutic target. *Pharmacological Reviews* **59**, 207–224 (2007).
- 52. Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M. & Kudo, I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 32775–32782 (2000).

- 53. Nakatani, Y. *et al.* Knockout mice lacking cPGES/p23, a constitutively expressed PGE2 synthetic enzyme, are peri-natally lethal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 387–392 (2007).
- 54. Jakobsson, P. J., Thorén, S., Morgenstern, R. & Samuelsson, B. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7220–7225 (1999).
- 55. Smith, W. L., Urade, Y. & Jakobsson, P. J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chemical Reviews* **111**, 5821–5865 (2011).
- 56. Jania, L. A. *et al.* Microsomal prostaglandin E synthase-2 is not essential for in vivo prostaglandin E2 biosynthesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **88**, 73–81 (2009).
- 57. Park, J. Y., Pillinger, M. H. & Abramson, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol.* **119**, 229–240 (2006).
- 58. Beckage, N. E. Host-parasite hormonal relationships: A common theme? *Experimental Parasitology* **72**, 332–338 (1991).
- 59. Lawrence, P. O. Hormonal effects on insects and other endoparasites in vitro. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* **27**, 487–496 (1991).
- 60. Behnke, J. M., Barnard, C. J. & Wakelin, D. Understanding chronic nematode infections: Evolutionary considerations, current hypotheses and the way forward. *International Journal for Parasitology* **22**, 861–907 (1992).
- 61. Kubata, B. K., Duszenko, M., Martin, K. S. & Urade, Y. Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends Parasitol.* **23**, 325–331 (2007).
- 62. Daugschies, A. Eicosanoids in Parasites and Parasitic Infections. **46**, (2000).
- 63. Noverr, M. C., Erb-Downward, J. R. & Huffnagle, G. B. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 517–533 (2003).
- 64. Kubata, B. K. *et al.* Enzymatic formation of prostaglandin D2, E2, and F2α in the parasitic protozoan Trypanosoma brucei. *Int. Congr. Ser.* **1233**, 461–466 (2002).
- 65. Kubata, B. K. *et al.* Identification of a novel prostaglandin F(2α) synthase in Trypanosoma brucei. *J. Exp. Med.* **192**, 1327–1337 (2000).
- 66. Kubata, B. K. *et al.* A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by Trypanosoma cruzi. *J. Exp. Med.* **196**, 1241–1251 (2002).
- Kabututu, Z. *et al.* Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11endoperoxide prostaglandin H 2 reductase in Leishmania. *International Journal for Parasitology* 33, 221–228 (2003).
- 68. Díaz-Viraqué, F. *et al.* Old Yellow Enzyme from Trypanosoma cruzi exhibits in vivo Prostaglandin F2α synthase activity and has a key role in parasite infection and drug susceptibility. *Front. Immunol.* **9**, 7 (2018).
- 69. Machado, F. S., Mukherjee, S., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B. & Ashton, A. W. Bioactive lipids in trypanosoma cruzi infection. in *Advances in Parasitology* **76**, 1–31 (Academic Press, 2011).
- 70. Kumar, R. & Nylén, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. Frontiers in Immunology 3,

(2012).

- 71. Figarella, K. *et al.* Prostaglandin D2 induces programmed cell death in Trypanosoma brucei bloodstream form. *Cell Death Differ.* **12**, 335–346 (2005).
- 72. MANSFIELD, J. M. & PAULNOCK, D. M. Regulation of innate and acquired immunity in African trypanosomiasis. *Parasite Immunol.* **27**, 361–371 (2005).
- 73. Huang, Z. L., Urade, Y. & Hayaishi, O. Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness. *Current Opinion in Pharmacology* **7**, 33–38 (2007).
- 74. Mizoguchi, A. *et al.* Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11674–11679 (2001).
- 75. Scammell, T. E. *et al.* An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience* **107**, 653–663 (2001).
- 76. Scammell, T. *et al.* Activation of ventrolateral preoptic neurons by the somnogen prostaglandin D2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7754–7759 (1998).
- 77. Oishi, Y., Huang, Z. L., Fredholm, B. B., Urade, Y. & Hayaishi, O. Adenosine in the tuberomammillary nucleus inhibits the histaminergic system via A1 receptors and promotes non-rapid eye movement sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19992–19997 (2008).
- 78. Kristensson, K., Nygård, M., Bertini, G. & Bentivoglio, M. African trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Progress in Neurobiology* **91**, 152–171 (2010).
- 79. Opperdoes, F. R. & Van Roy, J. The phospholipases of Trypanosoma brucei bloodstream forms and cultured procyclics. *Mol. Biochem. Parasitol.* **5**, 309–319 (1982).
- Bertello, L. E., Alves, M. J. M., Colli, W. & De Lederkremer, R. M. Evidence for phospholipases from Trypanosoma cruzi active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide. *Biochem. J.* 345, 77–84 (2000).
- 81. Yamashita, A., Sugiura, T. & Waku, K. Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *Journal of Biochemistry* **122**, 1–16 (1997).
- 82. Eintracht, J., Maathai, R., Mellors, A. & Ruben, L. Calcium entry in Trypanosoma brucei is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid. *Biochem. J.* **336**, 659–666 (1998).
- 83. Ridgley, E. L. & Ruben, L. Phospholipase from Trypanosoma brucei releases arachidonic acid by sequential sn-1, sn-2 deacylation of phospholipids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **114**, 29–40 (2001).
- 84. Catisti, R., Uyemura, S. A., Docampo, R. & Vercesi, A. E. Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **105**, 261–271 (2000).
- 85. Belaunzarán, M. L., Lammel, E. M. & De Isola, E. L. D. Phospholipases A in trypanosomatids. *Enzyme Research* **2011**, (2011).
- 86. Marks, F. Arachidonic Acid and Companions: An Abundant Source of Biological Signals. in *Prostaglandins, Leukotrienes, and Other Eicosanoids: From Biogenesis to Clinical Application* 1–46

(wiley, 2007). doi:10.1002/9783527613625.ch1

- 87. Morrow, J. D. & Roberts, L. J. The isoprostanes: Current knowledge and directions for future research. *Biochemical Pharmacology* **51**, 1–9 (1996).
- 88. Jez, J. M. & Penning, T. M. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: An update. in *Chemico-Biological Interactions* **130–132**, 499–525 (Chem Biol Interact, 2001).
- Kilunga, K. B. *et al.* Structural and mutational analysis of Trypanosoma brucei prostaglandin H 2 reductase provides insight into the catalytic mechanism of aldo-ketoreductases. *J. Biol. Chem.* 280, 26371–26382 (2005).
- Kilunga, K. B. *et al.* Structural and mutational analysis of Trypanosoma brucei prostaglandin H 2 reductase provides insight into the catalytic mechanism of aldo-ketoreductases. *J. Biol. Chem.* 280, 26371–26382 (2005).
- 91. Komoto, J., Yamada, T., Watanabe, K. & Takusagawa, F. Crystal Structure of Human Prostaglandin F Synthase (AKR1C3). *Biochemistry* **43**, 2188–2198 (2004).
- 92. Suzuki, T. *et al.* cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of liver-type prostaglandin F synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 241–248 (1999).
- 93. Uchiyama, N. *et al.* Antichagasic activity of komaroviquinone is due to generation of reactive oxygen species catalyzed by Trypanosoma cruzi old yellow enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 5123–5126 (2005).
- 94. Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T. & Cerami, A. Trypanothione: A novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science (80-.).* **227**, 1485–1487 (1985).
- 95. Hayes, J. D., Flanagan, J. U. & Jowsey, I. R. GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51–88 (2005).
- 96. Ströher, E. & Millar, A. H. The biological roles of glutaredoxins. *Biochemical Journal* **446**, 333–348 (2012).
- 97. Takusagawa, F. Microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES2) is a glutathionedependent heme protein, and dithiothreitol dissociates the bound heme to produce active prostaglandin E2 synthase in vitro. J. Biol. Chem. **288**, 10166–10175 (2013).
- 98. Yamada, T., Komoto, J., Watanabe, K., Ohmiya, Y. & Takusagawa, F. Crystal structure and possible catalytic mechanism of microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2). *J. Mol. Biol.* **348**, 1163–1176 (2005).
- 99. Bresell, A. *et al.* Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* **272**, 1688–1703 (2005).
- 100. Archer, S. K., Inchaustegui, D., Queiroz, R. & Clayton, C. The Cell Cycle Regulated Transcriptome of Trypanosoma brucei. *PLoS One* **6**, e18425 (2011).
- 101. Fadda, A. *et al.* Transcriptome-wide analysis of trypanosome mRNA decay reveals complex degradation kinetics and suggests a role for co-transcriptional degradation in determining mRNA levels. *Mol. Microbiol.* **94**, 307–326 (2014).

- 102. Gunasekera, K., Wüthrich, D., Braga-Lagache, S., Heller, M. & Ochsenreiter, T. Proteome remodelling during development from blood to insect-form Trypanosoma brucei quantified by SILAC and mass spectrometry. *BMC Genomics* **13**, (2012).
- 103. Butter, F. *et al.* Comparative proteomics of two life cycle stages of stable isotope-labeled trypanosoma brucei reveals novel components of the parasite's host adaptation machinery. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 172–179 (2013).
- 104. Urbaniak, M. D., Guther, M. L. S. & Ferguson, M. A. J. Comparative SILAC Proteomic Analysis of Trypanosoma brucei Bloodstream and Procyclic Lifecycle Stages. *PLoS One* **7**, e36619 (2012).
- 105. Dejung, M. *et al.* Quantitative Proteomics Uncovers Novel Factors Involved in Developmental Differentiation of Trypanosoma brucei. *PLOS Pathog.* **12**, e1005439 (2016).
- 106. Alsford, S. *et al.* High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res.* **21**, 915–924 (2011).
- 107. Zardo, S. Caracterización De Una Glutatión S-Transferasa En Tripanosomas Africanos. (Universidad ORT, 2016).
- 108. Gadelha, C. *et al.* Architecture of a host-parasite interface: Complex targeting mechanisms revealed through proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 1911–1926 (2015).
- 109. Shimogawa, M. M. *et al.* Cell surface proteomics provides insight into stage-specific remodeling of the host-parasite interface in trypanosoma brucei. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 1977–1988 (2015).
- 110. Oberholzer, M. *et al.* Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious Trypanosoma brucei. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, 1–14 (2011).
- 111. Acestor, N., Panigrahi, A. K., Ogata, Y., Anupama, A. & Stuart, K. D. Protein composition of Trypanosoma brucei mitochondrial membranes. *Proteomics* **9**, 5497–5508 (2009).
- 112. Huang, G. *et al.* Proteomic Analysis of the Acidocalcisome, an Organelle Conserved from Bacteria to Human Cells. *PLoS Pathog.* **10**, e1004555 (2014).
- 113. Branchini, B. R. *et al.* Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications. *Anal. Biochem.* **396**, 290–297 (2010).
- 114. Benítez, D., Dibello, E., Bonilla, M. & Comini, M. A. A simple, robust, and affordable bioluminescent assay for drug discovery against infective African trypanosomes. *Drug Dev. Res.* (2020). doi:10.1002/ddr.21634
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2172–2175 (1989).
- 116. Studier, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234 (2005).
- 117. Alibu, V. P., Storm, L., Haile, S., Clayton, C. & Horn, D. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* **139**, 75–82 (2005).

- 118. Bachmaier, S. Evolutionary repurposing of cAMP and PKA signaling pathways in kinetoplastids.
- 119. Comini, M. A., Krauth-Siegel, R. L. & Flohé, L. Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *Biochem. J.* **402**, 43–49 (2007).
- 120. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, 676–682 (2012).
- 121. Roldán, A., Comini, M. A., Crispo, M. & Krauth-Siegel, R. L. Lipoamide dehydrogenase is essential for both bloodstream and procyclic Trypanosoma brucei. *Mol. Microbiol.* **81**, 623–639 (2011).
- 122. Correa, A. & Oppezzo, P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in E. coli: Advantages of high-throughput screening. *Biotechnology Journal* **6**, 715–730 (2011).
- 123. Correa, A. *et al.* Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
- 124. Sousa, R. & Mukherjee, S. T7 RNA Polymerase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **73**, 1–41 (2003).
- 125. Studier, F. W. Stable expression clones and auto-induction for protein production in E. Coli. *Methods Mol. Biol.* **1091**, 17–32 (2014).
- 126. Kapust, R. B. & Waugh, D. S. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused . *Protein Sci.* **8**, 1668–1674 (1999).
- 127. An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. Griffiths.
- 128. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
- 129. Han, H. RNA interference to knock down gene expression. in *Methods in Molecular Biology* **1706**, 293–302 (Humana Press Inc., 2018).
- 130. Comini, M. A. *et al.* Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes. *J. Biol. Chem.* **283**, 27785–27798 (2008).
- 131. Brun, R. & Kaminsky, R. Animal Models of Acute (first-stage) Sleeping Sickness. in *Handbook of Animal Models of Infection* 789–793 (Elsevier, 1999). doi:10.1016/b978-012775390-4/50234-7
- 132. Gichuki, C. & Brun, R. Animal Models of CNS (second-stage) Sleeping Sickness. in *Handbook of Animal Models of Infection* 795–800 (Elsevier, 1999). doi:10.1016/b978-012775390-4/50235-9
- 133. Clayton, C. E. *et al.* Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of Trypanosoma brucei. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3036–3047 (1990).
- 134. Dean, S. *et al.* A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *Open Biol.* **5**, (2015).
- 135. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, 676–682 (2012).
- 136. Opperdoes, F. R. *et al.* Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate Trypanosoma brucei. *J. Cell Biol.* **98**,

1178–1184 (1984).

- 137. ESPECTROMETRIA DE MASAS LC-MS TRIPLE CUADRUPOLO. Servicios Técnicos de Investigación. Available at: https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-genomica-yproteomica/espectrometria-de-masas-lc-ms-triple-cuadrupolo.html. (Accessed: 2nd November 2020)
- 138. Currier, R. B. *et al.* An essential thioredoxin-type protein of Trypanosoma brucei acts as redox-regulated mitochondrial chaperone. *PLoS Pathog.* **15**, e1008065 (2019).
- 139. Manta, B. *et al.* Iron-sulfur cluster binding by mitochondrial monothiol glutaredoxin-1 of Trypanosoma brucei: Molecular basis of iron-sulfur cluster coordination and relevance for parasite infectivity. *Antioxidants and Redox Signaling* **19**, 665–682 (2013).
- 140. Bonilla, M., Krull, E., Irigoín, F., Salinas, G. & Comini, M. A. Selenoproteins of African trypanosomes are dispensable for parasite survival in a mammalian host. *Mol. Biochem. Parasitol.* **206**, 13–19 (2016).
- 141. Ebersoll, S. *et al.* A glutaredoxin in the mitochondrial intermembrane space has stage-specific functions in the thermo-tolerance and proliferation of African trypanosomes. *Redox Biol.* **15**, 532–547 (2018).
- 142. Trindade, S. *et al.* Trypanosoma brucei Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host Microbe* **19**, 837–848 (2016).
- 143. Carvalho, T. *et al.* Trypanosoma brucei triggers a marked immune response in male reproductive organs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, (2018).
- 144. Biteau, N. *et al.* Trypanosoma brucei gambiense Infections in Mice Lead to Tropism to the Reproductive Organs, and Horizontal and Vertical Transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
- 145. Claes, F. *et al.* Bioluminescent Imaging of Trypanosoma brucei Shows Preferential Testis Dissemination Which May Hamper Drug Efficacy in Sleeping Sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e486 (2009).
- 146. McLatchie, A. P. *et al.* Highly Sensitive In Vivo Imaging of Trypanosoma brucei Expressing 'Red-Shifted' Luciferase. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2571 (2013).
- 147. Rivas, F. *et al.* New Pd-Fe ferrocenyl antiparasitic compounds with bioactive 8-hydroxyquinoline ligands: a comparative study with their Pt-Fe analogues. *Dalt. Trans.* **50**, 1651–1665 (2021).
- 148. Niborski, L. L. *et al.* Recombinant antibody against Trypanosoma cruzi from patients with chronic Chagas heart disease recognizes mammalian nervous system. *EBioMedicine* **63**, 103206 (2021).
- 149. Barnwell, E. M. *et al.* Developmental regulation and extracellular release of a VSG expressionsite-associated gene product from Trypanosoma bruceibloodstream forms. *J. Cell Sci.* **123**, 3401– 3411 (2010).
- 150. Figueiredo, L. M., Cross, G. A. M. & Janzen, C. J. Epigenetic regulation in African trypanosomes: A new kid on the block. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 504–513 (2009).
- 151. Alfranca, A., Iñiguez, M. A., Fresno, M. & Redondo, J. M. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: Role in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* **70**, 446–456 (2006).

- 152. Fukuhara, S. *et al.* Cyclic AMP Potentiates Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Cell-Cell Contact To Enhance Endothelial Barrier Function through an Epac-Rap1 Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 136–146 (2005).
- 153. Farmer, P. J. *et al.* Permeability of endothelial monolayers to albumin is increased by bradykinin and inhibited by prostaglandins. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, (2001).
- 154. Gomez, I., Foudi, N., Longrois, D. & Norel, X. The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **89**, 55–63 (2013).
- 155. Lovo-Martins, M. I. *et al.* Extracellular vesicles shed By Trypanosoma cruzi potentiate infection and Elicit Lipid body formation and PGE2 production in murine macrophages. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
- 156. Carvalho de Freitas, R. *et al.* Trypanosoma cruzi: Inhibition of infection of human monocytes by aspirin. *Exp. Parasitol.* **182**, 26–33 (2017).
- 157. Abdalla, G. K. *et al.* Trypanosoma cruzi: The role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp. Parasitol.* **118**, 514–521 (2008).
- 158. Saini, S. *et al.* Parasitic load determination by differential expressions of 5-lipoxygenase and PGE2 synthases in visceral leishmaniasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **147**, (2020).

7. <u>Anexo</u>

7.1 Cassetes para generación de líneas "KO"

BLA - UTRs GST1

Tcatttcaagcaggaagggcgaaggaccaaaagattagacaaaaaatacaaataaaggggtagggagagacacaacagttatggccaag cctttgtctcaagaagaatccaccctcattgaaagagcaacggctacaatcaacagcatccccatctctgaagactacagcgtcgccagcgcag ctctctctagcgacggccgcatcttcactggtgtcaatgtatatcattttactggggggaccttgtgcagaactcgtggtgctgggcactgctgctgct gcggcagctggcaacctgacttgtatcgtcgcgatcggaaatgagaacaggggcatcttgagccctgcggacggtgccgacaggtgcttctc gatctgcatcctgggatcaaagccatagtgaaggacagtgatggacagccgacggcagttgggattcgtgaattgctgccctctggttatgtg gggagggctaacagattgatccttaactaccgatccgtgtcttctcttttccccatccttctcccggtgcatagcaccgcaagt

PAC - UTRs GST1

7.2 Primers para amplificación por PCR

Nombre	Secuencia
Primer Fo UTR	5' TCA TTT CAA GCA GGA AGG GCG AAG GAC C 3'
Primer Re UTR	5' ACG TTG CGG TGG TGC TTA TGC ACC 3'
Primer Fo ORF	5'GCCGTCCATGCGTTATGGCTCC 3'
Primer Re ORF	5' ACTTGTTCCGTCCTTTACAGCCACG 3'

7.3 Análisis por espectrometría de masa de CelD-TbGST1(-)TMD

Nombre: Mariana Bonilla – Bruno Manta

Fecha: 08/07/2015

Objetivo del análisis:

• Identificación de proteínas por mapeo peptídico.

El objetivo es confirmar la identidad de la proteína recombinante, una fusión N-terminal de CelD a TbGST1 (sin su extremo N-ter), que según SDS-PAGE tendría tamaño menor (mayor o igual a 60k Da) al esperado (93 kDa). Cabe la posibilidad de que la proteína se haya clivado o esté truncada. También podría haber pasado que, por error, la proteína fuera una fusión con MBP y no a CelD (del lado N-terminal) a la TbGST1 (sin su N-terminal). A continuación se incluyen las secuencias de ambas proteínas de fusión. En itálicas se señala la secuencias de CelD y MBP y subrayada la secuencia de GST1(-)TMD:

GST1(-)TMD+CelD: (MW: 72 kDa)

MRGSHHHHHHGSSGLIETKVSAAKITENYQFDSRIRLNSIGFIPNHSKKATIAANCSTFYVVKEDGTIVYTGTATSMFDNDTKETVYIADFSSVNEEGT YYLAVPGVGKSVNFKIAMNVYEDAFKTAMLGMYLLRCGTSVSATYNGIHYSHGPCHTNDAYLDYINGQHTKKDSTKGWHDAGDYNKYVVNAGIT VGSMFLAWEHFKDQLEPVALEIPEKNNSIPDFLDELKYEIDWILTMQYPDGSGRVAHKVSTRNFGGFIMPENEHDERFFVPWSSAATADFVAMTA MAARIFRPYDPQYAEKCINAAKVSYEFLKNNPANVFANQSGFSTGEYATVSDADDRLWAAAEMWETLGDEEYLRDFENRAAQFSKKIEADFDWD NVANLGMFTYLLSERPGKNPALVQSIKDSLLSTADSIVRTSQNHGYGRTLGTTYYWGCNGTVVRQTMILQVANKISPNNDYVNAALDAISHVFGRN YYNRSYVTGLGINPPMNPHDRRSGADGIWEPWPGYLVGGGWPGPKDWVDIQDSYQTNEIAINWNAALIYALAGFVNYNSAGSGSENLYFQGSL SHITDPKKCPPILLYRYSTCPFCATTKSFLDYNKIRYECVEVEPMFKKEISMSAYKKVPQLKFCVRGDDGPFLVDSEVIVSTVAKHVGMGKQLEDPEVK KWREWARGPMVRLLTLEFNSSLLNSWGSYSYIDNIETIPYKNKIFLKLVGAPVMYLVAQYVTKPRLLKSGDLLPTDDPKVKLHNEIDRFVKEGLLDGK KKFHGGSKPDLADLDTHGVLQSVRGHRLYNEIIEATTIKPWLERMDEAVGNEKYIPK*

GST1(-)TMD+MBP: (MW: 93 kDa)

MRGSHHHHHHGSSGMKTEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEIT PDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDI KDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPN KELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNG SGSENLYFQGSLSHITDPKKCPPILLYRYSTCPFCATTKSFLDYNKIRYECVEVEPMFKKEISMSAYKKVPQLKFCVRGDDGPFLVDSEVIVSTVAKHVG MGKQLEDPEVKKWREWARGPMVRLLTLEFNSSLLNSWGSYSYIDNIETIPYKNKIFLKLVGAPVMYLVAQYVTKPRLLKSGDLLPTDDPKVKLHNEI DRFVKEGLLDGKKKFHGGSKPDLADLDTHGVLQSVRGHRLYNEIIEATTIKPWLERMDEAVGNEKYIPK*

En suma general del análisis:

Utilizando datos de ms y ms/ms, se identificaron las siguientes proteínas:

Rotulo de la muestra	Masa mol. en el gel (kDa.)	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa.)	Link al resultado (Nro. pág.)
GST1(-)TMD +CelD	92.7	GST1(-)TMD+CelD	Aprox 66.7	96

Muestra:	GST1(-)TMD+CelD
Placa:	Mayo 2015
Posición :	C24

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

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



Search title	-
Database	: Uniproteina 2013-01-24 (5889 sequences; 1981713 residues)
Timestamp	: 8 Jul 2015 at 15:03:03 GMT
Protein hits	: BrunoManta GST1NterCelD

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 19 indicate identity or extensive homology (p<0.05). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As Peptide Summary ~ Help Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits AUTO Standard scoring 🔘 MudPIT scoring 💿 Ions score or expect cut-off 0 Show sub-sets 0 Show pop-ups 💿 Suppress pop-ups 🔘 Sort unassigned Decreasing Score 💌 Require bold red 🔲 Select None Search Selected Error tolerant Archive Report Select All BrunoManta GST1NterCelD Mass: 92755 Score: 187 Matches: 3(3) Sequences: 3(3) emPAI: 0.20 1. Check to include this hit in error tolerant search or archive report Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Unique Peptide Query ¥ 1219.4658 1218.4585 1218.5050 -0.0464 0 17 0.019 1 ប R.YSTCPFCATTK.S + 2 Dehydro (C) 32 ✓ 1867.8495 1866.8422 1866.9047 -0.0624 0 70 2.2e-007 1 U R.SYVTGLGINPPMNPHDR.R 85 118 2383.0847 2382.0774 2382.1433 -0.0659 0 130 2.4e-013 R.SGADGIWEPWPGYLVGGGWPGPK.D 1 u. Protein View Match to: BrunoManta GST1NterCelD Score: 430 Expect: 5.9e-040 Nominal mass (Mr): 92755; Calculated pI value: 6.03 NCBI BLAST search of BrunoManta GST1NterCelD against nr Unformatted sequence string for pasting into other applications Variable modifications: Dehydro (C),Oxidation (M) Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Sequence Coverage: 60% Matched peptides shown in Bold Red 1 MRGSHHHHHH GSSGLIETKV SAAKITENYQ FDSRIRLNSI GFIPNHSKKA 51 TIAANCSTFY VVKEDGTIVY TGTATSMFDN DTKETVYIAD FSSVNEEGTY 101 YLAVPGVGKS VNFKLAMNVY EDAFKTAMLG MYLLRCGTSV SATYNGIHYS 151 HGPCHTNDAY LDYINGQHTK KDSTKGWHDA GDYNKYVVNA GITVGSMFLA 201 WEHFKDQLEP VALEIPEKNN SIPDFLDELK YEIDWILTNQ YPDGSGRVAH 251 KVSTRNEGGE IMPENEHDER FEVPWSSAAT ADEVAMTAMA ARIERPYDPQ 301 YAEKCINAAK VSYEFLKNNP ANVFANQSGF STGEYATVSD ADDRLWAAAE 351 MMETLGDEEY LRDFENRAAQ FSKKLEADFD WONVANLGMF TYLLSERPGK 401 NPALVOSIKO SLLSTADSIV RTSONHGYGR TLGTTYYWGC NGTVVROTMI 451 LQVANKISPN NDYVNAALDA ISHVFGRNYY NRSYVTGLGI NPPMNPHDRR 501 SGADGIWEPW PGYLVGGGWP GPKDWVDIQD SYQTNEIAIN WNAALIYALA 551 GFVNYNSAGS GSENLYFQGS LSHITDPKKC PPILLYRYST CPFCATTKSF 601 LDYNKIRYEC VEVEPMFKKE ISMSAYKKVP QLKFCVRGDD GPFLVDSEVI 651 VSTVAKHVGM GKQLEDPEVK KUREWARGPM VRLLTLEFNS SLLNSWGSYS 701 YIDNIETIPY KNKIFLKLVG APVMYLVAQY VTKPRLLKSG DLLPTDDPKV 751 KLHNEIDRFV KEGLLDGKKK FHGGSKPDLA DLDTHGVLQS VRGHRLYNEI 801 IEATTIKPUL ERMDEAVGNE KYIPK

Conclusión:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
 - "GST1(-)TMD+CelD"
 - La comparación de la fragmentación teórica de la señal=1509 (correspondiente al carboxilo terminal) con su fragmentación experimental no arroja semejanza por lo que se deduce que esta parte de la secuencia no está presente.

7.4 Análisis por espectrometría de masas de IMAC TbGST1(-)TMD y Trx-TbGST1(-)TMD

Nombre: Bruno Manta

Fecha: 26-5-15

Objetivo del análisis:

Identificación de proteínas por mapeo peptídico.

En suma general del análisis:

Utilizando datos de ms y ms/ms, se identificaron las siguientes proteínas:

Rotulo de la muestra	Masa mol. en el gel (kDa.)	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa.)	Link al resultado (Nro. pág.)
Imac1	31.7	Imac1_Bruno		2
Imac2	46.3	Imac2_Bruno		5

Muestra:	Imac1
Placa:	Mayo 2015
Posición:	E4

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente) 4700 Reflector Spec #1 MC=>BC[BP = 2090.0, 13016]



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente: 805.4848, 842.5100, 849.4400, 870.5378, 871.5401, 886.4203, 896.4505, 919.4399, 921.5298, 928.4332, 941.5405, 957.4818, 974.5285, 992.4135, 1042.5911, 1045.5186, 1050.5332, 1064.6066, 1102.6210, 1148.6125, 1150.6129, 1157.5582, 1166.6140, 1174.6810, 1178.6300, 1198.6008, 1217.6771, 1219.4912, 1238.5211, 1241.4861, 1407.7483, 1455.7159, 1495.7594, 1552.1688, 1552.6752, 1553.1716, 1619.6600, 1623.8485, 1735.8660, 1751.9303, 1894.8137, 1947.9551 ions(213.2578, 217.2291, 218.2590, 245.2511, 270.2411, 274.2937, 275.2086, 288.2737, 302.2736, 316.2834, 317.3552, 332.2643, 345.2670, 358.3843, 387.3899, 389.3707, 413.3292, 415.4270, 417.3785, 418.3965, 429.3915, 431.3784, 442.3607, 457.4486, 505.4789, 530.4688, 543.4852, 544.4707, 561.4870, 571.4423, 572.5120, 589.4802, 604.5722, 629.5442, 643.5685, 659.5504, 674.5668, 684.5489, 686.4756, 688.5355, 702.5524, 717.6916, 742.6376, 744.6381, 756.6959, 773.6454, 783.6055, 788.6774, 801.6284, 816.7838, 831.6108, 887.7438, 912.7030, 916.6873, 940.8502, 944.7465, 945.8248, 967.6382, 985.7813, 996.7498, 1003.7471, 1006.7980, 1014.7456, 1032.8726, 1057.8129, 1114.7610, 1129.8207, 1132.7666, 1147.8972, 1156.9031, 1172.8956, 1203.8734, 1213.7882, 1231.8173, 1245.8699, 1246.9529, 1326.9148, 1328.7917, 1344.9009, 1360.0415, 1384.9559, 1425.9335, 1443.9640, 1521.9849, 1523.9983, 1530.9690, 1604.1333, 1614.0308, 1631.9723, 1660.3479, 1661.1401, 1713.0337, 1731.1559, 1732.0437, 1776.1552, 1790.2255, 1802.1129, 1809.1923), 2005.0914, 2022.0820, 2089.0959 ions(175.2109, 215.2414, 216.2180, 242.2860, 243.2496, 244.2105, 249.2753, 256.2566, 274.2583, 277.2834, 278.2508, 284.2578, 304.2950, 314.3165, 356.3630, 357.3249, 385.3091, 391.3638, 397.3636, 400.3676, 403.3408, 407.3324, 412.4021, 417.3972, 470.4102, 475.4083, 492.4319, 498.4312, 503.4115, 520.4301, 525.4761, 526.4401, 586.5110, 588.5118, 599.5300, 603.5395, 605.5256, 616.4796, 633.5300, 654.5736, 670.5460, 672.6205, 683.5606, 698.6625, 700.6280, 704.6210, 746.6299, 762.6199, 786.6909, 794.6931, 811.6740, 828.7501, 833.6741, 875.6902, 924.6092, 924.8497, 929.7452, 941.8748, 946.7324, 951.8435, 1024.9010, 1025.8619, 1029.7874, 1042.9259, 1047.8282, 1112.8595, 1125.9509, 1126.9318, 1130.8517, 1143.9755, 1170.9735, 1196.9717, 1197.9386, 1213.1627, 1215.0161, 1243.8640, 1269.2014, 1326.0580, 1327.0187, 1344.0496, 1354.0016, 1412.3044, 1440.1157, 1457.1322, 1467.1174, 1487.1123, 1525.2664, 1553.1779, 1570.2076, 1574.0952, 1645.2153, 1655.1946, 1673.2354, 1681.2367, 1699.2400, 1753.5017, 1779.2621, 1786.2692, 1796.2800, 1813.2943, 1915.3104, 1919.4990, 1933.2845, 1976.2449, 2044.9497, 2046.6893), 2122.0688, 2132.0820, 2212.0596, 2349.1616, 2521.2532, 3103.3999 ions(282.1364, 412.4070, 556.4396, 665.4636, 693.3338, 693.5978, 693.7836, 694.4863, 830.7626, 967.5142, 967.8820, 1024.5935, 1024.9014, 1111.9318, 1169.0305, 1384.6884, 1385.2230, 1386.1176, 1402.1725, 1499.2966, 1501.1372, 1585.3669, 1606.4283, 1612.4216, 1720.6052, 1721.4396, 1775.5215, 1894.5695, 1922.5076, 1936.6492, 1993.6343, 2031.6401, 2032.5179, 2050.6235, 2080.7158, 2107.6824, 2137.6997, 2168.7253, 2169.6221, 2274.8000, 2307.7400, 2308.6174, 2377.7065, 2395.7107, 2411.8567, 2414.7039, 2531.8455, 2533.7241, 2548.9326, 2550.8225, 2644.8503, 2685.9502, 2746.8479, 2763.9741, 2765.8755, 2823.0005, 2842.9658,

2846.7493, 2860.9600, 2863.8669, 2867.7585, 2959.9683, 2960.8679, 2961.7612, 2975.8857, 2977.7788, 2978.6621),

```
Search Parameters
```

Type of search	:	Sequence Query
Enzyme	:	Trypsin
Variable modifications	:	Oxidation (M)
Mass values	:	Monoisotopic
Protein Mass	:	Unrestricted
Peptide Mass Tolerance	:	± 0.05 Da
Fragment Mass Tolerance	::	± 0.4 Da
Max Missed Cleavages	:	1
Instrument type	:	MALDI-TOF-TOF
Number of queries	:	51

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

(www.matrixscience.com)



Mascot Score Histogram

Ions score is -10°Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 15 indicate identity or extensive homology (p=0.05). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein View

Match to: Bruno_IMAC1 Score: 413 Expect: 2.9e-038

Nominal mass (M_{π}) : 31689; Calculated pI value: 8.88 NCBI BLAST search of <u>Bruno_IMAC1</u> against nr Unformatted <u>sequence</u> string for pasting into other applications



Matched peptides shown in Bold Red

1	MRGSHHHHHH	GSGSENLYFO	GSLSHITDPK	KCPPILLYRY	STCPFCATTK
51	SFLDYNKIRY	ECVEVEPMFK	KEISMSAYKK	VPQLKFCVRG	DDGPFLVDSE
101	VIVSTVAKHV	GMGKQLEDPE	VKKWREWARG	PMVRLLTLEF	NSSLLNSWGS
151	YSYIDNIETI	PYKNKIFLKL	VGAPVMYLVA	QYVTKPRLLK	SGDLLPTDDP
201	KVKLHNEIDR	FVKEGLLDGK	KKFHGGSKPD	LADLDTHGVL	QSVRGHRLYN
251	EIIEATTIKP	WLERMDEAVG	NEKYIPK		

Link "peptide summary report": http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150527/F009114.dat

Link "protein summary report":

http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=..%2Fdata%2F20150527%2FF009114.dat &REPTYPE=protein&_sigthreshold=0.05&REPORT=10&_server_mudpit_switch=0.0000 00001&_ignoreionsscorebelow=0&_showsubsets=0&_showpopups=TRUE&_sortunassigne d=scoredown&_requireboldred=0

Link "protein view": http://ubypa8/mascot/cgi/protein_view.pl?file=../data/20150527/F009114.dat&hit=1

Conclusión:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
 - "Imac1_Bruno" del Manta.

Muestra:	Imac2		
Placa:	Mayo 2015		
Posición:	E5		

Espectro de masas obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente) 4700 Reflector Spec #1 MC=>BC=>MC[BP = 2090.1, 13192]



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

804.2770, 837.5008, 842.5141, 871.5412, 879.3886, 886.4185, 895.4236, 896.4539, 918.4394, 919.4442, 941.5416, 957.4869, 974.5367, 992.4258, 1001.6245 ions(171.2095, 175.1807, 181.1921, 199.2169, 211.2355, 215.2493, 216.2283, 227.2674, 268.2675, 284.3063, 294.2924, 296.2183, 312.3066, 329.3262, 348.3635, 351.3085, 369.3312, 395.3006, 397.4014, 407.3738, 425.3868, 431.3566, 438.3773, 442.4194, 454.4111, 464.3973, 482.4076, 510.4756, 520.4545, 538.4653, 544.4314, 550.4479, 567.4787, 570.3772, 577.4799, 579.3359, 595.4813, 629.4678, 633.5250, 636.5057, 680.5600, 683.3850, 685.5143, 690.5330, 692.3895, 708.5444, 734.5552, 742.5228, 754.4765, 813.5880, 815.4034, 827.5839, 830.4054, 831.5890, 837.5775, 839.3461, 855.5809, 871.6376), 1023.6246, 1027.5911, 1042.5933, 1045.5603, 1050.5341, 1064.6135, 1102.6300, 1113.5619, 1150.6152, 1157.5612, 1166.6232, 1174.6881, 1178.6344, 1198.6093, 1217.6858, 1219.4950, 1233.6047, 1267.6528, 1289.6591, 1444.6332, 1449.5933, 1495.7723, 1619.6819, 1623.8710, 1731.8646, 1734.7169, 1750.7036, 1751.9484, 1767.9474, 1799.9197, 1805.8734, 1821.8705, 1894.8409, 1947.9763, 1964.9557, 2005.1125, 2021.1117, 2089.1143 ions(175.2055, 215.2346, 216.1992, 242.2880, 243.2439, 244.2084, 249.2713, 256.2529, 277.2751, 278.2427, 284.2594, 304.2771, 314.2997, 339.2932, 356.3595, 357.3144, 385.2976, 391.3605, 397.3565, 400.3666, 407.3220, 412.3978, 417.3993, 470.4204, 475.4016, 492.4178, 495.4657, 498.3975, 503.3877, 520.4233, 525.4842, 526.4326, 588.4938, 599.4785, 603.5516, 605.5193, 616.5291, 633.5049, 654.5530, 672.5953, 682.6039, 683.5652, 698.6633, 700.6202, 720.5678, 729.6193, 746.6337, 762.6278, 786.7490, 811.6662, 828.7232, 833.6335, 858.6639, 875.6967, 924.6232, 924.8117, 941.8480, 946.7283, 1024.8451, 1029.8738, 1042.9066, 1047.8519, 1112.8542, 1114.6609,

1125.9921, 1126.9006, 1130.8632, 1143.9617, 1170.9589, 1196.9082, 1197.9401, 1214.9961, 1270.2441, 1326.9797, 1344.0371, 1354.0157, 1412.3318, 1413.1626, 1440.0765, 1457.1125, 1469.1433, 1487.0935, 1526.2010, 1553.2493, 1570.1964, 1681.2727, 1683.1099, 1699.2300, 1779.2140, 1796.2590, 1813.2760, 1915.3037, 1933.2887, 1976.2023, 2044.9528, 2045.8160), 2105.1086, 2121.0967, 2211.0925, 2284.1731, 2322.1687, 2349.1868, 2403.0938, 2477.2783, 3010.4609 ions(225.1355, 244.2890, 277.2303, 467.6034, 555.4487, 645.6325, 710.5104, 710.7079, 754.7276, 797.4943, 797.7432, 811.8008, 910.9378, 939.8748, 997.9293, 1036.9548, 1054.6505, 1055.0389, 1086.9624, 1182.6519, 1183.1523, 1250.1755, 1329.4585, 1330.2410, 1477.3297, 1493.3654, 1606.4191, 1703.4744, 1720.2754, 1720.5471, 1722.4515, 1894.4705, 1993.6323, 2081.5925, 2137.6438, 2208.7197, 2210.6138, 2263.6772, 2321.7642, 2323.5105, 2438.7769, 2439.6145, 2506.8381, 2551.8442, 2621.8926, 2652.8733, 2736.0017, 2750.0493, 2751.9272, 2753.6941, 2767.8879, 2770.7942, 2882.8496, 2883.7017) Search Parameters

Type of search	:	Sequence Query
Enzyme	:	Trypsin
Variable modifications	:	Oxidation (M)
Mass values	:	Monoisotopic
Protein Mass	:	Unrestricted
Peptide Mass Tolerance	:	± 0.05 Da
Fragment Mass Tolerance	::	± 0.4 Da
Max Missed Cleavages	:	1
Instrument type	:	MALDI-TOF-TOF
Number of queries	:	62

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

(www.matrixscience.com)



Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 15 indicate identity or extensive homology (p=0.05). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein View

Match to: Bruno_IMAC2 Score: 378 Expect: 9.3e-035

Nominal mass (M_z) : 43759; Calculated pI value: 7.62 NCBI BLAST search of <u>Bruno_IMAC2</u> against nr Unformatted <u>sequence string</u> for pasting into other applications

Variable modifications: Oxidation (M) Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Sequence Coverage: 578

Matched peptides shown in Bold Red

1	MRGSHHHHHH	GSSGMSDKII	HLTDDSFDTD	VLKADGAILV	DFWAEWCGPC
51	KMIAPILDEI	ADEYQGKLTV	AKLNIDONPG	TAPKYGIRGI	PTLLLFKNGE
101	VAATKVGALS	KGQLKEFLDA	NLAGSGSENL	YFQGSLSHIT	DPKKCPPILL
151	YRYSTCPFCA	TTKSFLDYNK	IRYECVEVEP	MFKKEISMSA	YKKVPQLKFC
201	VRGDDGPFLV	DSEVIVSTVA	KHVGMGKOLE	DPEVKKWREW	ARGPMVRLLT
251	LEFNSSLLNS	WGSYSYIDNI	ETIPYKNKIF	LKLVGAPVMY	LVAQYVTKPR
301	LLKSGDLLPT	DDPKVKLHNE	IDRFVKEGLL	DGKKKFHGGS	KPDLADLDTH
351	GVLQSVRGHR	LYNEIIEATT	IKPWLERMDE	AVGNEKYIPK	

Link "peptide summary report": http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150527/F009116.dat

Link "protein summary report":

http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=..%2Fdata%2F20150527%2FF009116.dat &REPTYPE=protein&_sigthreshold=0.05&REPORT=10&_server_mudpit_switch=0.0000 00001&_ignoreionsscorebelow=0&_showsubsets=0&_showpopups=TRUE&_sortunassigne d=scoredown&_requireboldred=0

Link "protein view": http://ubypa8/mascot/cgi/protein_view.pl?file=../data/20150527/F009116.dat&hit=1

Conclusión:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
 - "Imac2_Bruno" del Manta