



Estudio de la enzima lanosterol 14-α-demetilasa como blanco de acción de compuestos organometálicos diseñados contra *Trypanosoma cruzi*

Antonela Bosch

Licenciatura en Bioquímica

Tutora: M. Sc. Florencia Mosquillo

Co-tutora: Dra. Leticia Pérez

Laboratorio de Interacciones Moleculares

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

Agosto 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Leti y Flo por darme la oportunidad para llevar a cabo este proyecto. A Flo por su constancia y paciencia. A Leti por su dedicación y entusiasmo constante. Agradezco las largas jornadas en el laboratorio que me enriquecieron en conocimiento, experiencia e impulsaron mi crecimiento tanto personal como profesional.

A todos los integrantes del LIM que hicieron más ameno el camino e incluyéndome desde el primer momento.

A mis compañeras/os y amigas de Facultad, por todo el apoyo recibido. Por las horas de estudio preparando materias y por el pasaje de apuntes sin fin. Por los laboratorios compartidos y vivencias que guardaré con cariño. Por su buena energía y tolerancia. Por los consejos y recomendaciones que siempre me brindaron. Principalmente a Euge, Yeny, Lu, Maru, Flo, Vale, Gianni, Sele y Melu.

A mis amigas de la vida que me han estado apoyando siempre. Por todas esas juntadas de estudio fracasadas y por todo el tiempo compartido.

A mi familia, los de sangre y de corazón. Por estar pendientes de mí y alegrarme los días por videollamadas cuando la distancia se hacía sentir.

En especial a Sofía, Candela, Eleanne, Santiago, Titina, Martin, Mirian, Jorge, Nancy y Eduardo.

A mis abuelos paternos que ya no se encuentran físicamente pero han dejado una huella en mí.

Por último y no menos importante, a mi madre que siempre con amor y dulzura ha estado brindándome lo mejor. Me ha escuchado y acompañado durante mis horas de estudio. Le dedico este trabajo a ella, que nunca me permitió bajar los brazos y festejó cada uno de mis logros como suyo.

¡Gracias a todos por haber formado parte de este camino!

ÍNDICE

Resumen	5
Abreviaturas	7
Introducción y antecedentes	9
Características de la enfermedad de Chagas	9
Epidemiología	10
Generalidades de <i>T. cruzi</i>	12
Biología molecular de <i>T. cruzi</i>	15
Ciclo de vida	16
Tratamiento actual	19
Lanosterol 14-α-demetilasa	23
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Materiales y métodos	26
Soluciones y tampones	26
Medios de cultivo	26
Cepas	26
Vector de clonado pTREX-GFP	27
Diseño de cebadores para amplificar la enzima lanosterol 14- α -demetilasa	28
Extracción y purificación de ADN genómico	30
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
Electroforesis en geles de agarosa	31
Purificación del ADN a partir de los geles de agarosa	32
Cuantificación de ADN	32
Digestión del vector pTREX-GFP y tratamiento con fosfatasa alcalina	33
Digestión de producto de PCR	34
Ligación	34
Preparación de células quimiocompetentes	35
Transformación por choque térmico	35
Preparaciones de ADN plasmídico	35
Verificación por ensayos de restricción	37
Preparación del vector control pTREX-c-Myc-GFP	37

Verificación por PCR en colonia	38
Secuenciación	39
Transfección de parásitos	40
Microscopía de fluorescencia	40
Resultados y discusión	42
Amplificación del gen que codifica para la lanosterol 14-α-demetilasa de <i>T. cruzi</i> por PCR y clonado en vector pTREX-GFP	42
Generación del vector control pTREX-c-Myc-GFP	44
Análisis de la secuencia de los plásmidos recombinantes obtenidos	46
Transfección de parásitos	47
Conclusiones	49
Perspectivas	49
Referencias bibliográficas	50

Resumen

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una afección causada por el parásito Trypanosoma cruzi (T. cruzi). Se transmite al hospedero mamífero a través de insectos triatominos hematófagos que funcionan como vectores. El ciclo de vida de este parásito es complejo, consta de varias etapas infectivas y no infectivas que se desarrollan tanto en el vector como en el hospedero. La Organización Mundial de la Salud clasificó a esta enfermedad dentro de las enfermedades tropicales descuidadas mundialmente (NTD). Si bien es una enfermedad endémica en América Latina (principalmente en las regiones empobrecidas y rurales), afecta a un gran porcentaje de la población mundial, con 12000 muertes por año debido a las intensas corrientes migratorias de las últimas décadas. Pese a la importancia en cuanto a mortalidad y morbilidad generadas, no se cuenta con una farmacoterapia adecuada. El tratamiento disponible se basa en dos medicamentos nitroaromáticos disponibles hace más de 50 años: Nifurtimox (Nfx) y Benznidazol (Bz). Ambos fármacos se consideran eficaces en las diferentes etapas de la enfermedad, sin embargo el tratamiento generalmente se suspende por la alta toxicidad, efectos secundarios que conlleva, y la resistencia que se ha visto desarrollada en los parásitos.

Frente a la situación actual, surge la necesidad de diseñar nuevos compuestos efectivos y seguros contra esta enfermedad. El grupo de Química Inorgánica de Facultad de Química ha sintetizado dos compuestos organometálicos basados en platino (Pt) y paladio (Pd), Pt-dppf-mpo y Pd-dppf-mpo como agentes anti-*T. cruzi.* Ambos compuestos resultaron muy prometedores por su actividad antiproliferativa contra *T. cruzi*, presentando valores de IC₅₀ del orden micromolar y submicromolar y altos índices de selectividad. Mediante análisis ómicos se evidenció que la vía del ergosterol estaba afectada en los parásitos tratados con el compuesto de Pd, dado que se observó una disminución de los transcriptos que codifican para proteínas que participan en 13 de los 20 pasos de la vía. Las etapas finales de la vía implican la conversión de escualeno a ergosterol. Mientras que en mamíferos el escualeno, luego de sufrir ciertas reacciones enzimáticas da lugar al lanosterol y finalmente se transforma en colesterol, en tripanosomátidos el lanosterol sigue una ruta diferente. Este es el motivo por el que la vía del ergosterol es de gran importancia para la

5

intervención quimioterapéutica contra el parásito, dado a que constituye un atractivo blanco molecular para combatir enfermedades protozoarias porque no se encuentra presente en el hospedero.

Con el fin de verificar la participación de esta vía en el mecanismo de acción se propuso realizar genómica funcional, en este trabajo se amplificó el gen que codifica para la enzima lanosterol $14-\alpha$ -demetilasa y se clonó en un vector de expresión para *T. cruzi* en fase con la proteína verde fluorescente (GFP). Dicha construcción fue usada para generar parásitos que sobreexpresan la enzima de interés mediante transfección y selección de epimastigotas. Estos parásitos constituyen una valiosa herramienta para determinar la contribución de la lanosterol $14-\alpha$ -demetilasa en la respuesta a los nuevos compuestos organometálicos.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Bz	Benznidazol
BrEt	Bromuro de etidio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DTU	Unidades de Tipificación Discreta
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
g	Aceleración de la gravedad terrestre
GFP	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
°C	Grado Celsius
HEPES	(Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico)
LAN	Lanosterol 14-α-demetilasa
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
μL	Microlitro
μm	Micrometro
mm	Milímetro
μΜ	Micromolar
mМ	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
NaOH	Hidróxido de sodio
Nfx	Nifurtimox
PBS	Tampón salino de fosfato
Pd	Paladio
pb	Pares de bases
Pt	Platino
ON	Durante la noche (Overnight)

PCR	Reacción en	cadena	de la	polimerasa

- RNasa A Ribonucleasa A
- rpm Revoluciones por minuto
- SDS Dodecil sulfato sódico
- SFB Suero fetal bovino
- SNP Polimorfismo de nucleótido simple
- TAE Tris-acetato-EDTA
- V/cm Voltio por cm (campo eléctrico)

Introducción y antecedentes

Características de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, fue descubierta por el doctor e investigador brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas en 1909, quien además describió al agente etiológico y a su insecto vector (WHO 2022). Es una afección causada al hospedero mamífero por el parásito protozoario flagelado del orden Kinetoplastidia llamado *Trypanosoma cruzi,* cuyo vector es el insecto triatomino hematófago conocido como vinchuca (WHO 2022).

La enfermedad se presenta en tres fases: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda se caracteriza por una corta duración entre 4 a 8 semanas. Los parásitos circulan en sangre y son atenuados en su replicación a través de la respuesta inmune pero no es suficiente para eliminar la infección (Bern 2015). Los signos más visibles dependiendo del sitio de inoculación son nódulos inflamatorios (chagoma) o edema palpebral unilateral (signo de Romaña) generado por los parásitos presentes en el depósito de heces del insecto infectado (Hemmige, Tanowitz et al. 2012, Bern 2015). Generalmente, menos del 50% de las personas infectadas tienen estas lesiones cutáneas ya que son infectados por otras vías de transmisión (WHO 2022). Esta fase se caracteriza en la mayoría de los casos por síntomas que no son específicos de la enfermedad, generando que los pacientes que se encuentran infectados no reciban la atención adecuada. Los signos leves que pueden presentar son: fiebre, dolor de cabeza, disnea, mialgia, y puede ser mortales en el caso de pacientes inmunodeprimidos y niños.

Luego de esta fase inicial de corta duración, los pacientes pasan a una fase indeterminada asintomática que puede durar toda la vida o derivar en una fase crónica en la cual el parásito persiste intracelularmente en células del músculo digestivo y esquelético, y en los cardiomiocitos, donde pueden generar alteraciones trastornos digestivas como megaesófago o megacolon, arritmias cardíacas y en algunos casos insuficiencia cardíaca progresiva llevando a la muerte del paciente (WHO 2022).

9

Epidemiología

Esta enfermedad se encuentra clasificada por la Organización Mundial de la Salud como una de las enfermedades tropicales desatendidas (Neglected Tropical Diseases, NTD) porque no han recibido la atención necesaria por parte de las instituciones sanitarias y los gobiernos. Es endémica en 21 países, sobre todo en las regiones empobrecidas y rurales de América Latina (PAHO 2022). Se estima que hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por esta enfermedad. Actualmente 70 millones de personas viven en zonas expuestas a la enfermedad y en promedio cada año se registran 30000 nuevos casos, de los cuales se notifican aproximadamente 12000 muertes por complicaciones durante la fase aguda y/o en la fase crónica (Figura 1) (PAHO 2022).



Figura 1. Mapa representativo de la distribución de la enfermedad de Chagas a nivel mundial. Tomado de (WHO 2021).

El mecanismo de transmisión principal es el vectorial, específicamente por heces u orina de triatominos que se encuentren infectados con el parásito. Generalmente, pican en zonas expuestas de la piel y defecan u orinan cerca de la herida generada. La forma clásica de infección se da a través de mucosas o cuando una persona se frota insistentemente la herida generada por el insecto al alimentarse de sangre, generando la entrada de parásitos presentes en las heces. En menor grado se encuentran la transmisión vertical de madre a hijo, por transfusión de sangre, por trasplante de órganos, por transmisión oral, por consumo de alimentos contaminados y transmisión accidental en el lugar de trabajo (WHO 2022). Los casos más frecuentes se dan en zonas rurales, dado que el vector intermediario habita principalmente en estas áreas. Sin embargo, en el último tiempo se ha observado la aparición de nuevos casos en las zonas urbanas por la amplia expansión geográfica de la población. Las olas migratorias han llevado incluso a la expansión de esta enfermedad hacia otros continentes (WHO 2022). Dada esta situación, la enfermedad de Chagas se ha convertido en un problema de salud pública incluso en países donde no hay transmisión vectorial del parásito, pero existen otras vías de transmisión, como las transfusiones de sangre y trasplantes de órganos.

Para combatir esta enfermedad, las autoridades se han enfocado en la erradicación de la transmisión vectorial en zonas endémicas, el control de la transmisión por las restantes vías y el aseguramiento de que aquellas personas infectadas tengan acceso a la salud. La erradicación como tal en las Américas no se ha logrado en la mayoría de los países ya que se encuentran presentes en las grietas de las paredes y techos de pajas de las viviendas rústicas rurales y porque el gran reservorio de este parásito siguen siendo los animales silvestres (Bern 2015, WHO 2022). Algunos de los métodos propuestos y llevados a cabo, son por ejemplo: la fumigación de los domicilios rurales con insecticidas que tenga acción residual, mejoramiento de las viviendas (cambio de materiales de paredes y techo), fomentar la adecuada limpieza, el guardado de alimentos y la educación (WHO 2022). Actualmente, Uruguay es el primer país de América Latina que erradicó la transmisión vectorial por *Triatoma infestans* desde 2014, y logró controlar la transmisión vectorial y sanguínea desde 1997 (OPS 2022).

Los triatominos causantes de la enfermedad pertenecen a una familia hemiptera, definidos por ser hematófagos y por presentar adaptaciones morfológicas asociadas a la búsqueda de huéspedes y a la supervivencia. Existen 145 especies formalmente descritas; potencialmente todas poseen la capacidad infectiva pero principalmente tres especies son los vectores más competentes: *Triatoma infestans, Panstrongylus megistus y Rhodinus prolixus* (De Souza 2002, Crocco 2010). Su

11

diferencia radica en su ciclo de vida variable y hábitat (Crocco 2010, Gourbière 2011). La enfermedad cubre un amplio rango de transmisión que comprende humanos, animales domésticos y silvestres (De Souza 2002).

Generalidades de T. cruzi

El protozoario *Trypanosoma cruzi* pertenece al dominio Eukarya, reino Protista, subreino Excavata, filo Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastidiae, familia Trypanosomatidae, género Trypanosoma, subgénero Schizotrypanuma. Es un organismo unicelular y parásito obligado, que se reproduce por fisión binaria. La especie se caracteriza por tener un número variable de cepas que difieren en morfología, expresión génica, parasitemia, patogenicidad, sensibilidad a drogas y virulencia (Teixeira, de Paiva et al. 2012).

Actualmente, se reconocen siete linajes genéticos distintos o unidades de tipificación discretas (DTU) (Vela, Coral-Almeida et al. 2021). Formalmente definidas como Tcl a TcVI y TcBat en las especies de *T. cruzi*, clasificadas según su genotipo. Sus diferencias no solo hacen referencia al genotipo sino también contemplan la ubicación geográfica y el nicho ecológico (Vela, Coral-Almeida et al. 2021). La Tcl, posee una alta diversidad genética y se encuentra más ampliamente distribuida adaptándose a distintos ecosistemas. Sin embargo, TcII posee baja diversidad genética y es característico de las zonas domesticadas cercanas a la Amazonía. TcIII y TcIV son más atípicos de encontrar, predominando en las selvas con la capacidad de infectar a humanos. La TcV y la TcVI, son las resultantes de la hibridación entre cepas de TcII y TcII o TcIV. Principalmente en América Central se encuentra la TcVI mientras que en América del Sur se puede encontrar tanto TcVI o TcV. Tcbat, es la última DTU diferenciada hasta el momento. Se aisló la cepa a partir de murciélagos y se considera como una DTU independiente de *T. cruzi* aunque se encuentra más relacionada con TcI que con las restantes DTU (Vela, Coral-Almeida et al. 2021).



Figura 2. Diagrama de las estructuras y organelos presentes en el estadio epimastigota de *T. cruzi.* Adaptado de (De Souza 2008).

T. cruzi posee un núcleo pequeño de aproximadamente 2,5 µm de largo (Figura 2). Tiene una organización estructural compleja similar al resto de los eucariotas. Está dispuesto en el centro de la célula y según el estadio en que se encuentre el parásito, puede ser redondeado o alargado. Contiene una membrana nuclear provista de poros, que presenta continuidad con el retículo endoplasmático. Durante el proceso de división celular, la membrana nuclear se encuentra intacta solo observando irregularidades en su plegado. Más excéntricamente se encuentra el nucleolo en amastigotas y epimastigotas, donde se dispersa o reaparece en las distintas etapas de la división celular. Mientras que en tripomastigotas no se encuentran presentes. Generalmente la cromatina se acumula hacia la periferia o en la región central. Sin embargo, los cromosomas no se logran observar porque la cromatina no se condensa en ninguna etapa del ciclo celular (De Souza 2002).

Los tripanosomátidos se caracterizan por tener solo una mitocondria que ocupa gran parte del citoplasma. Se encuentra ubicada cerca del cuerpo basal, a partir de una compleja red de fibrillas de ADN en la matriz mitocondrial que da origen al kinetoplasto. La mitocondria contiene un tipo especial de ADN, conocido como K-ADN. El K-ADN, es un ADN circular formado por maxicírculos y minicírculos dispuestos de forma paralela al eje longitudinal del flagelo. Se ha demostrado que

13

este ADN sólo puede representar el 25% total del ADN del protozoario (De Souza 2002, De Souza 2009).

El flagelo emerge de una invaginación de la membrana ondulante, llamada bolsillo flagelar. En la base de éste se encuentra el cuerpo basal. El flagelo posee una longitud variable de acuerdo al estadio en que se encuentre. En amastigotas por ejemplo, se observa que es muy corto. Tiene una estructura conservada, formada por nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central (De Souza 2009). El bolsillo flagelar es una región especializada debido a la ausencia de microtúbulos subpeliculares, contiene una membrana de composición distinta a la que recubre el resto del protozoario y tiene una gran actividad endocítica y exocítica (De Souza 2002).

El aparato de Golgi se observa en la región anterior del cuerpo, junto al bolsillo flagelar y al kinetoplasto. El aparato de Golgi junto al retículo endoplasmático, forman un sistema complejo, donde se lleva a cabo la glicosilación de proteínas y la exportación de las mismas como de lípidos. Estas funciones son similares a otras células, sin embargo las vesículas provenientes de la vía endocítica son fusionadas a las vesículas liberadas por el Golgi dando origen al reservosoma. Este organelo desaparece gradualmente en el pasaje de epimastigota a tripomastigota (De Souza 2002, De Souza 2008).

Mediante la utilización del microscopio electrónico de transmisión, se visualizan otras estructuras, como los microtúbulos subpeliculares, el glicosoma, la vacuola contráctil y el acidocalcisoma. Los microtúbulos subpeliculares se encuentran presentes en todo el cuerpo del tripanosomátido, salvo en la región cercana al bolsillo flagelar. Están formados por una asociación de filamentos de 25 nm y 7 nm, que se encuentran dispuestos de forma paralela al axonema (De Souza 2009). El glicosoma es una estructura esférica que posee una matriz homogénea cubierta por membrana. Es el sitio donde ocurre la mayor parte de la vía glucolítica y no posee catalasa (De Souza 2009). La vacuola contráctil es característica en protozoarios, se encuentra formada por túbulos unidos a una vacuola central cercana al bolsillo flagelar. Contiene acuaporinas también presentes en los acidocalcisoma es un reservorio de metabolitos como cuerpos pigmentarios, cationes orgánicos e inorgánicos y gránulos de

14

polifosfato (Docampo 2022). Además, participa en la autofagia, almacenamiento de energía, osmoregulación, homeostasis del pH citosólico y patogénesis. Se encuentra rodeado por una membrana y su contenido es electrón-denso. Dichos metabolitos son acidificados por la bomba de protones y utilizados en canales, bombas y transportadores en determinadas situaciones durante el ciclo de vida del parásito (Docampo 2022).

Biología molecular de T. cruzi

Recientemente estudios demostraron que al comparar dos cepas de T. cruzi el número de cromosomas varía de 43 a 40 cromosomas (Wang, Peng et al. 2021). Cabe destacar, que las cepas comparadas son líneas ancestrales representantes de las 6 DTU va definidas (Wang, Peng et al. 2021). Estos protozoarios no poseen secuencias intergénicas abundantes y los genes se encuentran formados por secuencias dispuestas en tándem incluyendo algunas secuencias reguladoras (Kramer 2012, Kramer 2021). Los policistrones se encuentran compuestos por 10 a 100 genes que no se encuentran relacionados funcionalmente entre sí (Kramer 2012, Clayton 2019). Los tripanosomátidos no poseen la capacidad de realizar empalme alternativo debido a la naturaleza policistrónica del transcrito (Kramer 2012). Sin embargo, han desarrollado la capacidad de realizar el procesamiento de los ARNm mediante un proceso de trans-splicing que implica la inclusión de secuencias líder en 5' y la poliadenilación en el extremo 3' (Kramer 2012, Clayton 2019). Se ha considerado que la regulación de expresión génica ocurre a nivel post-transcripcional ante la evidencia de que no contienen todos los factores de transcripción específicos pero la tasa de transcripción se mantiene constante (Kramer 2012, De Souza and Barrias 2020). Un ejemplo claro es la falta de elementos regulatorios al inicio de la transcripción como el promotor de la ARN Pol II y la divergencia que presentan los factores de transcripción (Clayton 2019). Esto genera una baja expresión de los genes, teniendo que recurrir a otras estrategias como el aumento del total de copias de los distintos genes en el genoma y la utilización de promotores fuertes que permiten obtener niveles adecuados de ARNm (Clayton 2019).

Ciclo de vida

Los tripanosomátidos tienen un ciclo de vida complejo alternando distintos estadios entre el insecto vector y el hospedero mamífero (De Souza 2009). El ciclo de vida consta de diferentes formas infecciosas y no infecciosas, replicativas y no replicativas que se desarrollan tanto en el vector como en el hospedero. Se los puede clasificar en los distintos estadios por su morfología y la posición relativa del kinetoplasto con respecto al núcleo. Este parásito presenta al menos cuatro estadios claramente diferenciados: tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos y los epimastigotas. En el vector se desarrollan los tripomastigotas sanguíneos y amastigotas y en el hospedero se encuentran los tripomastigotas sanguíneos y amastigotas (Figura 3).





Figura 3. Representación esquemática de las diferentes formas del ciclo de vida de *T. cruzi*: tripomastigotas (A), epimastigotas (B), y amastigotas (C). Las imágenes fueron creadas a partir de micrografías de microscopía óptica y microscopía de transmisión. Imágenes tomadas de (Teixeira, Benchimol et al. 2012).

Los epimastigotas son la forma proliferativa pero no infectiva del parásito. Son organismos fusiformes con aproximadamente 20-40 µm de largo y 2 µm de ancho. El kinetoplasto se encuentra anterior al núcleo (ubicado en la zona central). Posee un flagelo que forma una membrana ondulante corta que emerge del cuerpo basal (De Souza 2002).

Los tripomastigotas metacíclicos no tienen capacidad replicativa, pero pueden colonizar e infectar a nuevos hospederos. Son fusiformes, con un tamaño de 25 µm de largo y 2 µm de diámetro. El núcleo ocupa gran parte del citoplasma y se ubica en la zona posterior del parásito. El kinetoplasto es de gran tamaño y se encuentra ubicado en la región subterminal (posterior al núcleo) junto a la membrana ondulante que recubre el parásito que luego dará lugar al flagelo libre (De Souza 2002).

Si bien los tripomastigotas metacíclicos y los sanguíneos son casi indistinguibles morfológicamente, existen diferencias a nivel de su biología molecular que permiten su diferenciación, como por ejemplo la expresión de diferentes proteínas de superficie (Minning, Weatherly et al. 2009).

Los amastigotas representan la forma intracelular del parásito y se caracterizan por su forma redondeada con 1,5-5 µm de diámetro aproximadamente. Tienen un núcleo protuberante y un kinetoplasto ubicado en la zona posterior al núcleo, del que da origen a un pequeño flagelo interno, llamado axonema (De Souza 2002).

El ciclo comienza cuando el vector hematófago ingiere sangre infectada de un vertebrado con tripomastigotas sanguíneos circulantes (Figura 4). En la luz del intestino, los tripomastigotas sanguíneos se diferencian a epimastigotas y luego en la ampolla rectal se da una nueva diferenciación donde los epimastigotas por estrés debido a la falta de nutrientes pasan a tripomastigotas metacíclicos. Este estadio es no proliferativo pero muy infectivo. Por lo tanto, cuando son eliminados por las heces del vector pueden infectar a un nuevo huésped, ingresando por heridas o mucosas. Ya en el hospedero, los tripomastigotas metacíclicos son ingeridos mediante endocitosis o fagocitosis por macrófagos, células epiteliales o fibroblastos. Son internalizados en una vacuola parasitófora que por la acción del medio y del propio parásito promueven la diferenciación en amastigotas. Los amastigotas se replican activamente dentro de la célula hasta que se diferencian en tripomastigotas flagelados que rompen la célula y son liberados al torrente sanguíneo. Estos tripomastigotas sanguíneos pueden infectar nuevas células, diseminarse por tejidos y órganos o cerrar el ciclo al ser ingeridos por un nuevo insecto vector al alimentarse de sangre del mamífero infectado.



Figura 4. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi.* El vector ingiere sangre con tripomastigotas de un vertebrado infectado. Los parásitos se diferencian a epimastigotas y se replican en la zona media del intestino. Luego, migran a la zona posterior donde se pasan al estadio tripomastigota metacíclico en la ampolla rectal para ser luego excretados junto con las heces. Los tripomastigotas metacíclicos infectan nuevas células al ingresar al mamífero por la herida de una picadura o por las mucosas. Una vez dentro de las células, se transforman en amastigotas y se replican. Luego de alcanzar un número crítico, se diferencian nuevamente a tripomastigotas sanguíneos que rompen la célula y se liberan los parásitos al torrente sanguíneo. Extraída de (Bern 2015).

Tratamiento actual

El tratamiento vigente para combatir la enfermedad de Chagas se basa en el uso de dos agentes quimioterapéuticos que fueron autorizados hace más de 5 décadas: Benznidazol (Figura 5.1) y Nifurtimox (Figura 5.2) (Osorio 2019, Pérez 2020). El Benznidazol (2-nitro-N- [fenilmetil]-1H-imidazol-1-acetamida) es un derivado de nitroimidazol. Este medicamento fue propuesto como tratamiento de primera línea

de la enfermedad de Chagas en cualquiera de las dos fases aguda y crónica (Kratz, Garcia Bournissen et al. 2018). El benznidazol una vez administrado es activado por la enzima nitrorreductasa I del parásito, generando la liberación de moléculas como el dialdehído glioxal, que se une a las bases de guanosina en los ácidos nucleicos (ADN y ARN), provocando su bloqueo y haciendo que el parásito sea susceptible al daño oxidativo generado en todas las etapas del proceso, promoviendo de esta forma la eliminación de los parásitos del hospedero mamífero (Pérez 2020). El nifurtimox (3metil-N-'[(5-nitro-2-furanil)-metileno] -4-morfolinamina 1,1 dióxido) es un derivado de nitrofurano. Los parásitos mueren debido al daño causado por los radicales nitroaniónicos generados por la acción de nitroreductasas en presencia de oxígeno a partir del nifurtimox, bloqueando la síntesis de ADN y agilizando su degradación (Pérez 2020). La administración de ambos medicamentos en la fase aguda produce mejoras sintomáticas y elimina la parasitemia, mientras que en la etapa crónica puede presentar efectos secundarios graves asociados como el desarrollo de miocardiopatías y patologías gastrointestinales que conducen a la suspensión del tratamiento (Kratz, Garcia Bournissen et al. 2018, Osorio 2019). Por lo tanto estos medicamentos tienen una efectividad variable y limitada, influenciada por la fase de la infección, duración del tratamiento, la edad de los pacientes y el área geográfica (Kratz, Garcia Bournissen et al. 2018, Osorio 2019, Pérez 2020).



Figura 5. Estructura química representativa de los fármacos Benznidazol (1) y Nifurtimox (2). Adaptado de (Castro 2015).

Ante esta situación, se requieren nuevos fármacos que brinden seguridad y eficacia a bajo costo para combatir la enfermedad (Osorio 2019). Se ha propuesto el uso de complejos metálicos quienes podrían actuar como agentes antiproliferativos a

través de variables mecanismos de acción en conjunto con su acción farmacológica del complejo metal y ligando (Mosquillo, Smircich et al. 2020).

El grupo del laboratorio de Interacciones Moleculares, ha estudiado el efecto biológico que causan nuevos compuestos de platino (Pt) y paladio (Pd) sintetizados como agentes anti-tripanosomátidos por el grupo de Química Inorgánica de la Facultad de Química. Ambos compuestos presentan un ión central de Pt (II) o Pd (II), dispuestos en un trapezoide casi plano cis-coordinación unido a 1,1'-bis (difenilfosfino) ferroceno (dppf) y a piridina-2-tiolato-1-óxido (mpo). Estos ligandos bidentados al actuar en conjunto, le otorgan a dichos compuestos la actividad anti-tripanosomátida por el mpo y la mejora de la permeabilidad de las membranas del dppf (Figura 6) (Rodriguez Arce, Mosquillo et al. 2015). El ferroceno es un compuesto organometálico con la capacidad de ceder electrones y muy utilizado como precursor en los complejos organometálicos, brindando efectos antiproliferativos y aumento de lipofilia (Manosroi, Rueanto et al. 2010).



M = Pt(II) or Pd(II)

Figura 6. Estructura química de los compuestos Pt-dppf-mpo y Pd-dppf-mpo. Extraído de (Mosquillo, Smircich et al. 2020).

Ambos compuestos resultaron muy prometedores como agentes anti *T. cruzi* presentando bajos valores de IC₅₀: 0,060 ± 0,003 µM para Pt-dppf-mpo y 0,300 ± 0,030 µM para Pd-dppf-mpo. De acuerdo a los valores de IC₅₀ reportados para células de mamíferos, se determinó un alto índice de selectividad (SI): 85 para el compuesto de Pt y 83 para el compuesto de Pd (Mosquillo, Bilbao et al. 2018a, Mosquillo, Bilbao et al. 2018b). Particularmente, ambos compuestos ofrecen capacidad tripanocida a una dosis de 10x IC₅₀ luego de sólo 4 horas de incubación, se observó además que

el compuesto de Pd posee un efecto tripanocida incluso a una dosis 5x IC₅₀ mientras que a concentraciones menores se comporta como agente tripanostático al igual que el compuesto de Pt. Con esas altas concentraciones (10x IC₅₀) se observó una incorporación de los compuestos de entre 16 y 19% en los parásitos y una asociación preferencial con el ADN (Mosquillo, Bilbao et al. 2018a, Mosquillo, Bilbao et al. 2018b). Los análisis morfológicos demostraron la disminución del cuerpo celular en parásitos luego de 6 horas de incubación y los análisis de citometría de flujo demostraron la inducción de necrosis luego de 24 horas de tratamiento a altas concentraciones (Mosquillo, Bilbao et al. 2018a, Mosquillo, Bilbao et al. 2018b). Ambos compuestos afectan el proceso de infección y la persistencia de la misma en monocapas de células de mamíferos. En primer lugar, se demostró que disminuyen de forma significativa el número de células infectadas por tripomastigotas celulares cuando estos son incubados apenas 30 minutos con el compuesto, y se observó un menor número de amastigotas intracelulares al tratar las células infectadas con el compuesto de Pt o de Pd (Mosquillo, Bilbao et al. 2018a, Mosquillo, Bilbao et al. 2018b). Para dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos, se realizó un abordaje a gran escala empleando herramientas ómicas para el análisis transcriptómico y proteómico de parásitos tratados con los compuestos de manera comparativa con parásitos sin tratar con el fin de identificar los ARNm y las proteínas que se vieron modificadas por acción de los compuestos (Mosquillo, Smircich et al. 2020). Estos análisis permitieron identificar posibles blancos moleculares y revelaron que el tratamiento con los compuestos afecta vías biológicas que habían sido previamente validadas como vías esenciales para la sobrevida del parásito. Se encontró una alteración en los niveles de enzimas involucradas en la resistencia al estrés oxidativo, en la síntesis de gliconjugados de superficie y en la vía de biosíntesis del ergosterol donde se vió que el ARN que codifica para 13 de las 20 enzimas involucradas se encuentra disminuido como consecuencia del tratamiento con el compuesto de Pd (Figura 7) (Mosquillo, Smircich et al. 2020). En este contexto, se observó una disminución significativa de las siguientes enzimas: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintetasa, 3-hidroxi-3metilglutaril CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, mevalonato-difosfato descarboxilasa, farnesil pirofosfato sintasa, isopentenil-difosfato Δ -isomerasa, escualeno sintasa, escualeno monooxigenasa, lanosterol 14- α demetilasa, C-14 esterol reductasa, C-15 esterol desaturasa y proteína esteroide

22

deshidrogenasa dependiente de NAD(P) (Mosquillo, Smircich et al. 2020).



Figura 7. Biosíntesis del ergosterol simplificada en *T. cruzi.* A la derecha se encuentran los nombres de las enzimas con su ID asociado. Los valores seguidos corresponden a la disminución en la expresión del transcripto que codifica para dicho enzima, obtenido luego del tratamiento con Pd-dppf-mpo. En gris claro representan las enzimas que se vieron significativamente disminuidas. (§) Gen perteneciente al haplotipo esmeraldo y gen perteneciente al no-esmeraldo (†). Extraída de (Mosquillo, Smircich et al. 2020).

Lanosterol 14-α-demetilasa

Los esteroles son lípidos que se encuentran presentes en todas las células eucariotas. Son esenciales para el almacenamiento de energía, las funciones metabólicas, la organización y función de las membranas celulares. Sin embargo, su síntesis y su composición varían de acuerdo al grupo taxonómico (Osorio 2019). Mientras que en el ser humano la composición de la membrana es en base a colesterol, en los hongos, levaduras y tripanosomátidos su principal componente es

el ergosterol (Urbina 2009, Osorio 2019). Dado esta característica que comparte con los hongos se ha propuesto el uso de antifúngicos como ketoconazol, itraconazol o terbinafina para el tratamiento de T. cruzi pero los efectos obtenidos fueron supresores y no curativos (Urbina 2009). El ergosterol se sintetiza de forma endógena y no es posible reemplazarlo por otros esteroles, por lo que una vez que se inhibe su síntesis el parásito muere (Urbina 2009). La biosíntesis del ergosterol se divide en dos etapas: la vía isoprenoide y la vía esteroidea. La vía isoprenoide comprende desde el acetil-CoA al difosfato de farnesilo y la vía de esteroles desde el difosfato de farnesilo al esterol (Osorio 2019). La primera etapa ha sido estudiada como posible blanco de acción. Sin embargo, la inhibición de esta vía por estatinas y bifosfonatos se dejó de lado porque afecta no solo al parásito sino también al hospedero mamífero (Osorio 2019). La segunda etapa es esencial para el parásito y no se encuentra presente en el hospedero. Por este motivo esta vía es de gran importancia para la intervención quimioterapéutica contra el parásito dado a que constituye un atractivo blanco molecular para combatir enfermedades protozoarias y fúngicas. La enzima lanosterol 14- α -demetilasa (también referenciada en la bibliografía como CYP51), cataliza la eliminación del grupo metilo en la posición 14 del lanosterol para producir zimosterol (Buckner and Urbina 2012). En estudios mencionados anteriormente, se observó específicamente que mediante el tratamiento de los parásitos con Pd-dppfmpo la enzima lanosterol 14-α-demetilasa disminuyó los niveles de ARNm más dos veces y no se observaron productos proteicos en el análisis proteómico (Mosquillo, Smircich et al. 2020). Es por esto que consideramos de gran interés el estudio de esta enzima como posible blanco de acción de los compuestos organometálicos diseñados. Esta enzima es esencial para la sobrevida del parásito, no está presente en el hospedero mamífero y su expresión se encuentra afectada tanto a nivel de ARNm como de proteína en respuesta al tratamiento con los compuestos. En esta tesina proponemos clonar el gen que codifica para la lanosterol 14-α-demetilasa en un vector de expresión específico para T. cruzi y obtener parásitos transfectantes que sobreexpresen esta proteína. Se generará entonces una herramienta que permitirá analizar si esta enzima está involucrada en el mecanismo de acción de los compuestos Pt-dppf-mpo y Pd-dppf-mpo.

24

Objetivo general

Clonar en un vector de expresión de *T. cruzi* la enzima lanosterol 14-αdemetilasa para obtener parásitos que sobreexpresen esta proteína para una posterior evaluación de potenciales compuestos antichagásicos en epimastigotas.

Objetivos específicos

I) Amplificar por PCR la secuencia codificante de la enzima lanosterol 14-α-demetilasa de *T. cruzi.*

II) Clonar la secuencia codificante en vector de expresión pTREX-GFP, generar el vector control y transformar bacterias *E. coli.*

III) Verificar y analizar las construcciones plasmídicas mediante secuenciación.

IV) Transfectar epimastigotas de *T. cruzi* con la construcción pTREX-c-Myc-LAN-GFP y el vector control pTREX-c-Myc-GFP.

Materiales y métodos

Soluciones y tampones

Solución de mezcla lítica para minipreparaciones de ADN plasmídico: 1% SDS; 0,2 N NaOH.

Solución de acetato de sodio: NaAc 3 M, pH 4.8.

Tampón de carga para ADN: azul de bromofenol 0,25%; xylene cyanol 0,25%; glicerol 30%.

Tampón TAE 10X: Tris-HCl 0,4 M, pH 7,2; EDTA 50 mM, pH 8,0; ácido acético hasta pH 7,2.

Tampón TAE 1X: Tris-HCI 0.04 M, EDTA 1mM, pH 8,0.

Tampón SET: 20% sacarosa; 50 mM Tris-HCl; 6,5 mM EDTA; pH 7,6

Tampón de electroporación: 0,09 M tampón fosfato de sodio a pH 7,2; KCI 0.005 M; 0,01 M MgCl2; 0.02 M HEPES; 0,024 M Succinato de sodio; filtrar la solución por 0,22 μ m.

Medios de cultivo

Para el crecimiento de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) compuesto por: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L. Para la obtención de medios sólidos se agregó agar 1,5%. La esterilización fue llevada a cabo en el autoclave durante 20 minutos a 121°C. Como agente de selección se utilizó el antibiótico ampicilina (0,1 mg/mL).

Cepas

La cepa de bacterias *E. coli* utilizadas para la transformación fue Top 10 (genotipo es F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG). Su uso es debido a la enorme cantidad de características que favorecen la transformación de manera eficiente. El hsdR permite que el ADN no metilado se transforme a partir de amplificaciones de PCR y el mcrA permite una transformación eficiente de ADN metilado a partir de preparaciones genómicas. El lacZ Δ M15 es útil para la detección de color azul/blanco de clones recombinantes. El endA1 permite obtener preparaciones de ADN más

limpias y con mejores resultados en aplicaciones posteriores debido a la eliminación de la digestión no específica por la endonucleasa I. Por su parte, el recA1 reduce la incidencia de recombinación no específica en el ADN clonado.

Vector de clonado pTREX-GFP

El vector empleado para el clonado fue el pTREX-n (Vazquez and Levin 1999). Este vector fue construido específicamente para el clonado efectivo en *T. cruzi* y tiene la capacidad de mantenerse de forma episomal. La secuencia HX1 es una secuencia intergénica que aumenta la expresión de los genes clonados. Por este motivo, se agregaron 220 pb de HX1 seguidas al promotor ribosómico (Vazquez and Levin 1999). A su vez posee el gen de resistencia a ampicilina, el neo *cassette* de resistencia al antibiótico G-418 y la secuencia intergénica del gen de la GAPDH, que facilita el procesamiento del ARN mensajero. A esta construcción se le agregó un sitio de clonación múltiple (Vazquez and Levin 1999) y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 8). Esta proteína es extraída de una medusa Aequorea que emite bioluminiscencia. Es utilizado como etiqueta para ser más fácilmente detectable en sistemas *in vivo* (Verkhusha 2003).



Figura 8. Imagen representativa del vector de expresión pTREX-GFP y sus elementos característicos. Promotor T7; HX1: regulador de la expresión; Sitio multiclonado (45 pb); GFP: proteína verde fluorescente; GAPDH IG: secuencia intergénica de la enzima glucolítica GAPDH; neomicina: agente seleccionador en eucariotas; ampicilina: agente seleccionador en procariotas. Se muestran los cebadores empleados para verificación por PCR de productos insertados: pTREX_FW y pTREX_REV.

Diseño de cebadores para amplificar la enzima lanosterol 14- α demetilasa

Para el diseño de cebadores se partió de la secuencia de interés (Gene ID: TcCLB.506297.260) extraída de TriTypDB (<u>https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/</u>) y se utilizó el software Oligoperfect de Fischer Design Thermo (https://www.thermofisher.com/uy/en/home/life-science/oligonucleotides-primersprobes-genes/custom-dna-oligos/oligo-design-tools/oligoperfect.html). Las propiedades fisicoquímicas de los cebadores se analizaron con la herramienta OligoAnalyzer de IDT (https://www.idtdna.com/pages). En la Tabla 1 se detalla las secuencias diseñadas y sus respectivas Tm.

Tabla 1. Cebadores para el clonado de pTREX-c-Myc-LAN-GFP. Representación de colores: Bases extras (rosado), Xbal (marrón), c-Myc (verde), LAN (celeste) y HindIII (naranja).

Nombre	Secuencias (5' a 3')	Tamaño total /bases hibridadas (pb)	Tm de bases hibridadas (°C)
pTREX_c- Myc_Fw_LAN_Xbal	TCTCTCTCTAGAATGGAGCAGAA GCTGATTTCAGAGGAGGACCTGA TGTTCATTGAAGCCATTGTATTGG G	71/26	56,2
pTREX_Rev_LAN_H indIII	TCTCTCAAGCTTCCGAGGGCAAT TTCTTCTTGC	33/21	56,9

Se tomaron las primeras 26 bases de la secuencia y las 21 últimas, teniendo en cuenta la Tm de los cebadores. Se agregaron en los extremos 5' de ambos cebadores, los sitios de restricción compatibles para el posterior clonado en el vector de expresión pTREX-nGFP: Xbal en el cebador director y HindIII en el cebador reverso. La enzima Xbal reconoce la secuencia 5'T↓CTAGA3' y la enzima HindIII reconoce 5'A↓AGCTT3'. En el vector, la enzima queda fusionada y en fase con la proteína GFP en su extremo C-terminal por la eliminación del codón stop en el cebador reverso y por el agregado de una base extra. En el cebador directo se agregó la secuencia de c-Myc de 33 pb que permitirá localizar la proteína con anticuerpos específicos anti-cMyc comerciales. Fueron añadidas además 6 bases extras en los extremos 5' de cada cebador para facilitar la acción directa de las enzimas de restricción (Figura 9).



Figura 9. Esquema representativo de la unión de los cebadores directo y reverso al ADN genómico para la amplificación del gen de interés. En el cebador directo el color verde representa la secuencia c-Myc, en marrón el sitio Xbal adicionado y en rosado las bases extras. En el cebador reverso el color naranja corresponde al sitio HindIII adicionado y en rosado las bases extras.

Extracción y purificación de ADN genómico

El ADN genómico usado como molde en las PCR se extrajo y purificó mediante la utilización del kit Monarca (New England BioLabs), teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante. Se centrifugaron los parásitos a 4000 g durante 1 minuto y se resuspendió con pipeta en 100 µL de PBS frío. Seguidamente, se agregó 1 µL de proteinasa K y 3 µL de RNasa A al pellet y se agitó brevemente para asegurarnos el contacto eficaz con las enzimas. Luego, se agregó 500 µL de tampón de lisis celular, se agitó inmediatamente y se incubó a 56°C a 1400 rpm durante 5 minutos en un agitador térmico. Una vez lisadas las células, se le agregó 400 µL de tampón de unión a la muestra y se mezcló utilizando el vórtex mediante pequeños pulsos (5 a 10 segundos). Se transfirió la muestra a una columna de purificación de ADNg, preinsertada en un tubo de recogida y se centrifugó primeramente a 1000 g durante 3 minutos para que el ADNg se una y por último, se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto para limpiar la membrana. La columna se transfirió a un nuevo eppendorf y se agregó 500 µL tampón de lavado. Se homogeneizó por inversión y se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto; este paso se repitió una vez más. Se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga y se añadió 100 µL de tampón de elución precalentado a 60°C durante 1 minuto. Finalmente, se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto y se recogió el ADNg purificado.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La puesta a punto de la PCR consistió en probar distintas concentraciones de cebadores, temperaturas de hibridación, tiempos y número de ciclos hasta lograr la optimización de la reacción. Debido a los intentos sin éxito de amplificar la región de interés, se utilizó la enzima Kapa HiFi HotStart (*KAPA Biosystems*). Esta polimerasa forma parte de la familia B, se destaca por tener una mayor afinidad por el ADN sin necesidad de proteínas accesorias o dominios de ADN, dando como resultado una alta procesividad que se visualiza en un aumento en el rendimiento, la velocidad y la sensibilidad comparadas a las enzimas B salvajes. A su vez, posee la capacidad de corregir pruebas mediante la actividad exonucleasa (3' \rightarrow 5'). Es de alta fidelidad, con un tasa de error 100 veces menor que las polimerasas de uso cotidiano.

La secuencia del gen Lanosterol 14-α-demetilasa se amplificó utilizando el cebador directo pTREX_c-Myc_Fw_LAN_Xbal y cebador reverso

pTREX_Rev_LAN_HindIII, para ser clonado en PTREX-GFP. Las condiciones de la reacción y ciclado se detallan en las Tablas 2 y 3.

Reactivos	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Tampón con enzima	2x	1x	12,5
Cebador directo	10 µM	0,2 µM	0,5
Cebador reverso	10 µM	0,2 µM	0,5
ADN genómico	40 ng/μL	20 ng/µL	0,5
Agua	-	-	c.s.p 25 µL

Tabla 2. Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para realizar PCR.

Tabla 3. Protocolo de ciclado adaptado y optimizado para amplificar por PCR la secuencia

 LAN con los sitios de restricción Xbal y HindIII.

Etapa	Temperatura (°C) Tiempo		Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	1
Desnaturalización	98	20 segundos	
Hibridación	59-65	15 segundos	30
Extensión	72	45 segundos	
Extensión final	72	1 minuto	1

Electroforesis en geles de agarosa

Esta técnica fue utilizada para visualizar la migración diferencial de ADN genómico, productos de PCR, ADN plasmídico y productos de restricción. La concentración de agarosa utilizada fue de 1% o 2% según el tamaño de ADN a separar, y el tampón utilizado para la preparación del gel como para la migración electroforética fue TAE 1X. Las muestras se corrieron a intensidad de corriente constante de 8 V/cm de gel. Los marcadores de peso molecular (Figura 10) utilizados fueron GeneRuler 1Kb DNA Ladder (A) o 100 pb (B), según corresponda (*Thermo Scientific*). La visualización de los productos de ADN obtenidos fue realizada mediante la tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta MacroVue 2011 LKB y el programa Carestream MI SE (Carestream Health, Inc.).

A)



Figura 10. En la Imagen A se encuentra el Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder que tiene un rango de cuantificación aproximada entre 250 a 10000 pb. Fue utilizado para la electroforesis de agarosa 1%. En la imagen B, se visualiza el marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder que tiene un rango cuantificación aproximada entre 100 a 3000 pb y fue utilizado en el gel de agarosa al 2%.

Purificación del ADN a partir de los geles de agarosa

Una vez realizada la electroforesis de los productos de PCR para su visualización, se procedió a recortar las bandas de interés y se purificó el ADN utilizando el kit comercial de Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo research). Brevemente, se agregaron 3 volúmenes de un tampón que favorece la correcta disolución de la agarosa y se incubó a 45°C durante 20 minutos. Luego, se pasó la muestra por una columna, se centrifugó y se lavó dos veces con el tampón de lavado. Finalmente, se eluyó la muestra en 10 µL de tampón de elución.

Cuantificación de ADN

Para cuantificar el ADN obtenido se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop Lite (*Thermo Scientific*). Este equipo posee la capacidad de obtener una medida precisa

para la cuantificación de ADN y proteína, midiendo la absorbancia a 260 nm a partir de microvolúmenes. Simultáneamente brinda el cociente de la absorbancia a 260 nm y 280 nm, considerando que la muestra se encuentra con una pureza aceptable cuando dicho cociente es igual o supera al 1,8 para la cuantificación de ADN.

Digestión del vector pTREX-GFP y tratamiento con fosfatasa alcalina

Para clonar la secuencia codificante del gen de interés en el vector se realizó una doble digestión con enzimas de restricción Xbal y HindIII dejando extremos compatibles para insertar nuestro gen de interés digerido con las mismas enzimas. Para la doble digestión, se empleó la herramienta DoubleDigest de *Thermo Scientific (https://www.thermofisher.com/uy/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html), la cual recomienda las mejores opciones* de tampón de reacción y las proporciones adecuadas de las enzimas. Se incubó a 37°C durante toda la noche y se programó una incubación al final de la digestión de 20 minutos a 80°C para asegurar la inactivación de las enzimas, según las recomendaciones del comerciante. Las condiciones de incubación son detalladas en la siguiente Tabla 4.

Reactivos	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> Tango	10x	1x	5
Enzima Xbal	1 U/µL	0,2 U	0,2
Enzima HindIII	1 U/µL	0,4 U	0,4
Vector	250 ng/µL	-	6
Agua	-	-	c.s.p 50 µL

Tabla 4.	Concentrac	ciones y v	volúmenes	de	reactivos	utilizados	para	la	doble	digestión	del
vector p1	FREX-GFP (con Xbal	y HindIII.								

Antes de realizar la ligación se trató al vector con fosfatasa alcalina (*Thermo Scientific*). Esta enzima actúa desfosforilando el extremo 5' del vector linealizado y así evita su recircularización. Se incubó el vector linealizado con la fosfatasa alcalina a 37°C durante 10 minutos y luego a 75°C durante 5 minutos para asegurar la inactivación de la misma.

Digestión de producto de PCR

Para la digestión del producto amplificado se empleó la misma metodología aplicada para el vector. Las condiciones de incubación son detalladas en la Tabla 5.

Reactivos	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer Tango	10X	1 X	5
Enzima Xbal	1 U/µL	0,2	0,2
Enzima HindIII	1 U/µL	0,4	0,4
ADN inserto	29,9 ng/µL	-	9
Agua	-	-	c.s.p 50 µL

Tabla 5. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados para la doble digestión del amplicón con Xbal y HindIII.

Ligación

La formación del enlace fosfodiéster entre el extremo 5' del fosfato y el extremo 3' del hidroxilo entre el producto de PCR y vector pTREX-GFP, fue catalizado por la enzima T4 ADN ligasa (*Thermo Scientific*). Primero se procedió a agregar el tampón de reacción y agua, y luego el ADN vector y el producto de PCR. En último lugar se agregó la enzima para evitar que ocurran errores en la formación de los nuevos enlaces fosfodiéster. Para realizar efectivamente este proceso, se siguió las instrucciones propuestas por el comerciante para extremos cohesivos. Se calculó una relación inserto:vector 5:1 utilizando la siguiente ecuación:

ng de inserto =
$$\frac{(ng \ del \ vector) \ x \ (tamaño \ de \ pb \ del \ inserto) \ x (relación \ molar \ Inserto: \ vector)}{(tamaño \ del \ vector \ en \ pb)}$$

La reacción es detallada en la siguiente Tabla 6:

Reactivos Concentración stock		Concentración final	Volumen(µL)			
Tampón	10X	1 X	2			
ADN vector	256,2 ng/µL	-	1			
ADN inserto	29,9 ng/µL	95, 68 ng/μL	3,2			
T4 ADN ligasa	5 U/µL	1 U	0,2			
Agua	-	-	c.s.p 50 µL			

Tabla 6.	Concentraciones	y volúmenes o	de reactivos	utilizados para	la reacción	de ligación.
		,				

La ligación se incubó a 22°C durante 1 hora y para aumentar su eficiencia se dejó 10 minutos a 65°C; favoreciendo la inactivación de la enzima. Los productos obtenidos fueron utilizados inmediatamente para transformar células quimiocompetentes.

Preparación de células quimiocompetentes

Para realizar este experimento, se creció una colonia única de la cepa TOP 10 de *E. coli* en 50 mL del medio LB líquido durante 12 horas a 37°C con agitación a 220 rpm. Luego, se inocularon 4 mL del cultivo preparado anteriormente en 400 mL del medio LB y se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,375 a 600 nm. Sucesivamente, se alicuotó en tubos de 50 mL que fueron dejados en hielo durante 10 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 1600 g durante 7 minutos. El sobrenadante fue descartado y las bacterias fueron resuspendidas en 10 mL de solución de CaCl₂ y se dejaron en hielo por 30 minutos. Nuevamente, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, y se resuspendieron esta vez en 2 mL de solución de CaCl₂ frío con 15% de glicerol. Finalmente, las bacterias se alicuotaron en 100 μL, congelándose rápidamente a -80°C hasta su uso.

Transformación por choque térmico

Para transformar las células competentes se sacaron 100 μ L de células a -80°C y se dejaron descongelar en hielo durante 30 minutos. Luego, se segregó el ADN plasmídico en una proporción de 10 μ L de ADN por cada 100 μ L de células. Se dejaron en hielo por 20 minutos y seguidamente se les dió un shock térmico de 90 segundos a 42°C. Inmediatamente se le agregó 4 volúmenes de medio LB para favorecer la rápida recuperación de las células. Finalmente, se dejaron a 37°C durante una hora con agitación fuerte y se plaquearon 100 μ L en agar LB-ampicilina.

Preparaciones de ADN plasmídico

Para aislar ADN plasmídico de minipreparaciones, se dejaron crecer hasta fase estacionaria en 4 mL de LB células conteniendo dicho plásmido y se le agregó 4 µL de ampicilina para seleccionar. Se transfirió cada cultivo a tubos eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 5000 g durante 30 segundos. El pellet obtenido fue resuspendido con la pipeta en 1 mL de tampón SET para lavarlo, se centrifugó las células en las

mismas condiciones durante 1 minuto y se volvió a resuspender en 350 μ L del mismo tampón. Seguidamente se le agregó RNasa A volviéndose a mezclar con la pipeta. Luego, se le agregó 350 μ L de la mezcla lítica y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Para neutralizar el efecto de la base, se agregó una solución de acetato de sodio (NaAc) 3 M a pH 4,8 y se mezcló por inversión. Se colocó durante 30 minutos en hielo para que el SDS y el ADN cromosómico precipiten y posteriormente, se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante fue conservado porque contenía el plásmido de interés. A éste, se le agregó 1 volumen de isopropanol, agitándose por inversión para que precipite el ADN plasmídico. Se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se volvió a centrifugar 12000 g a 4°C durante 20 minutos y se volvió a centrifugar 12000 g a 4°C durante 5 minutos. El pellet se lavó con 200 μ L de EtOH al 70% y se centrifugó durante 5 minutos. Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 40 μ L de agua.

Para aislar ADN plasmídico de midipreparaciones, fue utilizado el kit PureLink[™] HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen). Para equilibrar la columna, se le agregó 10 mL de tampón de equilibrio. La muestra a purificar fue centrifugada a 4000 g durante 10 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en un tampón de resuspensión con ARNasa A hasta obtener una solución homogénea. Se le agregó 4 mL de tampón de lisis, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se le adicionó 4 mL de tampón de precipitación, se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó el lisado a 12000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de preparada la muestra, se la colocó en la columna dejando que drene por flujo de la gravedad. Seguidamente, se le añadió 10 mL de tampón de lavado a la columna, se descartó lo recolectado y se volvió a repetir el lavado. Para eluir, se colocó un tubo de centrífuga estéril de 15 mL debajo de la columna y se le agregó 5 mL de tampón de elución. Al tubo recolectado, se le agregaron 3,5 mL de isopropanol, se homogeneizó y se centrifugó a 12000 g durante 30 minutos a 4°C. Se lavó el sedimento con 3 mL de etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 12000 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, al sedimento obtenido se lo dejó secar al aire durante 10 minutos y se lo resuspendió en 100 µL de agua ultrapura y se guardó el ADN plasmídico purificado a -20°C.

Verificación por ensayos de restricción

Para verificar la presencia del inserto de interés en el plásmido purificado, se procedió a realizar una doble digestión con las enzimas de restricción: Xbal y HindIII. Para ello se agregó de 7,4 μ L de agua destilada, 2 μ L de *buffer* Tango 10X, 0,2 μ L de Xbal, 0,4 μ L de HindIII y 10 μ L de la Miniprep, para lograr un volumen total de 20 μ L. Se programó para incubar a 37°C durante toda la noche (16 horas) y en los últimos 20 minutos de incubación se modificó la temperatura a 80°C para asegurar la correcta inactivación de las enzimas de restricción. Una vez realizada la digestión se visualizó el resultado mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, en donde se agregaron las digestiones, las minipreparaciones correspondientes sin digerir y el marcador de peso molecular.

Preparación del vector control pTREX-c-Myc-GFP

En paralelo a la amplificación y transformación de LAN-c-Myc-pTREX, se realizó un vector de expresión pTREX-GFP control que contuviera la secuencia c-Myc utilizando como estrategia la hibridación de oligonucleótidos solapantes. Para ello, se sintetizaron oligonucleótidos con los mismos sitios de restricción del vector: Xbal (pTREX_Fw_c-Myc) y HindIII (pTREX_Rev_c-Myc). Se quitó el codón stop para que c-Myc quedará fusionado a GFP y a su vez se agregó una base extra a los cebadores para que quedara en fase con la misma.



Figura 11. Alineamiento de oligonucleótidos conteniendo la secuencia c-Myc y sitios de restricción Xbal y HindIII.

Se realizó el alineamiento utilizando 20 μ L de cada oligonucleótido. Para poner a punto las concentraciones del alineamiento en la ligación, se probaron dos concentraciones: 100 μ M y 10 μ M de cada oligonucleótido. Las condiciones de incubación se detallan en la Tabla 7. Brevemente, se inició con una desnaturalización inicial y se comenzó a descender la temperatura a un grado por minuto hasta alcanzar la Tm determinada para los oligonucleótidos. Luego de una incubación durante 30 minutos, se continuó con el descenso de la temperatura hasta alcanzar la temperatura ambiente (25°C).

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	1
Desnaturalización	95 (-1)	1 minuto	17
Hibridación	Tm = 78	30 minutos	1
	78 (-1)	1 minuto	53

Tabla 7. Protocolo para el solapamiento de los oligonucleótidos pTREX_Fw_c-Myc y pTREX_Rev_c-Myc.

Para la ligación se utilizó: 0,25 μ L de los oligonucleótidos hibridados a cada una de las concentraciones ensayadas, con 0,5 μ L del ADN vector, 2 μ L del tampón, 0,2 μ L de ADN 4 ligasa y se agregó agua libre de nucleasas hasta obtener 20 μ L de reacción. Posteriormente, se transformaron bacterias competentes con las mezclas de ligación y las colonias positivas fueron verificadas por PCR.

Verificación por PCR en colonia

Este método permitió comprobar que las colonias transformadas contienen el plásmido de interés. Para esto, se estriaron 12 colonias separadas en una nueva placa LB-agar con antibiótico ON. Una colonia representativa de cada estriado se transfirió a un tubo con 100 µL de agua estéril y se hirvió a 100°C por 5 minutos y se centrifugaron a 16000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se utilizó 10 µL del sobrenadante como molde para la PCR, empleando los cebadores pTREX_FW y pTREX_REV que hibridan sobre el vector, flanqueando el sitio de clonado (Figura 8). En la Tabla 8 se muestra las secuencias de los cebadores utilizados y sus respectivas Tm. Para esta PCR se utilizó la enzima Dream Taq (Thermo Scientific) debido a su buen rendimiento y menor costo. Las condiciones de reacción y de ciclado de PCR se detallan en las siguientes Tablas 9 y 10.

Nombre	Secuencias (5'a 3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)
pTREX_FW	ATATGCAGCGGATTCACTAAGA	22	58,4
pTREX_REV	TGCCCATTAACATCACCATCTA	22	58,4

Tabla 8. Cebadores diseñados para la verificación en colonia con pTREX_FW y pTREX_REV.

Tabla 9. Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para realizar PCR.

Reactivos	Concentración stock	Concentración final	Volumen (μL)
Tampón	10 X	1 X	2
dNTPS	2 mM	0,04 mM	0,4
Dream Taq	5 U/µL	0,5 U/µL	0,1
Cebador directo	10 µM	0,15 µM	0,3
Cebador reverso	10µM	0,15 µM	0,3
ADN	-	-	10
Agua	-	-	c.s.p 20 µL

Tabla 10. Protocolo de ciclado	adaptado para la	amplificación del	producto de 1443 pb.
--------------------------------	------------------	-------------------	----------------------

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1 minuto	1
Desnaturalización	95	30 segundos	
Hibridación	55,5	30 segundos	35
Extensión	72	1 minuto	
Extensión Final	72	5 minutos	1

Secuenciación

Las construcciones realizadas se verificaron mediante secuenciación de Sanger. La secuenciación del ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de Macrogen, Corea; siguiendo las instrucciones determinadas por el Servicio. Se secuenció automáticamente en ambas direcciones los vectores pTREX-c-Myc-LAN-GFP y pTREX-c-Myc-GFP. Para el primero se utilizaron tres cebadores: pTREX_FW_SEQ y pTREX_REV_SEQ que hibridan contra el vector pTREX, y pTREX_c-Myc_INT_LAN que hibrida con la secuencia clonada de LAN. Por su parte, para secuenciar el plásmido se utilizaron los mismos cebadores pTREX_FW_SEQ y

pTREX_REV_SEQ. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa BioEdit. La información respectiva a los cebadores se especifica en la Tabla 11.

Tabla 11. Cebadores diseñados para la secuenciación de pTREX-c-Myc-LAN-GFP y pTREXc-Myc-GFP.

Nombre	Secuencias (5'a 3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)
pTREX_FW_SEQ	CCAACTTCTTTTATGATGTCT	21	53,5
pTREX_c- Myc_INT_LAN	GGAGTTGACCATTGCGAAGT	20	58,4
pTREX_REV_SEQ	CAACAAGAATTGGGACAAC	19	53,0

Transfección de parásitos

Para la transfección de los parásitos, se purificaron los plásmidos de un cultivo bacteriano de 100 mL con el *kit PureLink*™ *HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen)* y se resuspendió el ADN plasmídico en 100 µL de tampón de electroporación (Danner 2011). Luego, se lavaron las epimastigotas que se encontraban en fase exponencial de crecimiento (2x10⁷ parásitos/mL) con PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en el tampón de electroporación a una concentración final de 2,5x10⁸ parásitos/mL. Se tomaron 80 µL de parásitos (2x10⁷) y se mezclaron con 20 µL de ADN plasmídico de concentración 1,5 µg/µL (30 ug totales). Dicha mezcla fue colocada en cubetas de electroporación de 2 mm y se dio un pulso en el programa X-014 en un Nucleofector. Luego de la electroporación se pasaron los parásitos a 2 mL de medio BHI suplementado con 10% SFB a 28°C para su recuperación y posterior selección mediante agregado de G418 en concentración 250 µg/mL

Microscopía de fluorescencia

El equipo utilizado para observar las transfecciones fue el generador de imágenes de células fluorescentes ZOE. Utiliza una pantalla táctil para controlar el campo claro, posee tres canales de fluorescencia y la cámara digital integrada. A su vez, cuenta con un protector de luz impidiendo que el entorno afecte la toma de imágenes de fluorescencia. También permiten capturar y almacenar imágenes, como también crear superposiciones de multicolores (Bio-Rad Laboratories, INC). Para la realización de los preparados se utilizaron 10 μ L de los parásitos transfectados (LAN y control) con 10 μ L de la solución fijadora PFA al 8%. Se realizaron ambos preparados en paralelo utilizando 2 μ L de DAPI a una concentración final de 0.1 μ g/mL. Se colocaron 10 μ L de las muestras preparadas anteriormente en los portaobjetos. Por último, se agregó medio de montaje para recubrir y conservar la muestra. Finalizando con la colocación del cubreobjetos a 45° para evitar la formación de burbujas.

Resultados y discusión

Amplificación del gen que codifica para la lanosterol 14-αdemetilasa de *T. cruzi* por PCR y clonado en vector pTREX-GFP

La amplificación por PCR del gen que codifica para la enzima lanosterol 14- α demetilasa se puso a punto utilizándose como molde ADN genómico de *T. cruzi*, ya que el genoma de este parásito se caracteriza por la ausencia de intrones en los genes codificantes para proteínas (Kramer 2021). Para realizar la PCR se ensayaron diferentes concentraciones de los cebadores disminuyendo de 0,3 µM a 0,2 µM para evitar la formación de dímeros y/o estructuras secundarias. Se realizó una PCR en gradiente entre 59°C a 65°C para determinar la temperatura óptima de amplificación y se emplearon distintas polimerasas, obteniéndose resultados positivos con la Kapa HiFi HotStart (Figura 12).



Figura 12. Visualización de los resultados en un gel de agarosa 1% de la reacción de PCR de la lanosterol 14-α-demetilasa para el vector de expresión pTREX. La PCR fue realizada en gradiente en el rango de 59°C a 65°C. Se utilizó BrEt como marcador. LAN pTREX: reacciones de PCR realizadas a distintas temperaturas. C-: control negativo (sin ADN).

Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa y se observaron bandas de aproximadamente 1500 pb correspondientes al tamaño esperado para el gen de interés usando temperaturas de hibridación en el rango de 59°C a 63°C. Se cortaron las bandas en el transiluminador, se purificaron del gel de agarosa con el kit de Zymogen y se cuantificó, obteniendo un valor de 29,9 ng/µL.

El vector pTREX fue digerido con las enzimas Xbal y HindIII y el producto de digestión se corrió en un gel de agarosa 1% (Figura 13). Para evaluar el funcionamiento de ambas enzimas por separado, se cortó el vector con la enzima Xbal y con HindIII, además de la doble digestión. En la figura se observa en el carril 1 al vector de expresión sin digerir evidenciando las 3 formas presentes: superenrollado, lineal y circular. En el carril 2 se observa al vector digerido con la enzima Xbal, coincidiendo con la conformación lineal del plásmido control. En el carril 3 se digirió el vector con la enzima HindIII, observándose el mismo patrón. En el carril 4 se observa el resultado de la doble digestión utilizando ambas enzimas, la cual escinde sólo 9 pb, por lo que no se aprecia diferencia de tamaño del vector en el gel.





El vector pTREX linealizado, fue purificado a partir del gel y desfosforilado con la fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. En paralelo, se trató al producto de PCR con las mismas enzimas de restricción para asegurar un clonado en fase. Ambos productos obtenidos fueron ligados utilizando la enzima T4 ligasa y posteriormente se usaron para transformar células quimiocompetentes. Se aislaron 4 diferentes clones a partir de los cuales se extrajeron plásmidos recombinantes por el método de lisis alcalina. Se obtuvo ADN plasmídico para los cuatro clones analizados. En la Figura 14, se observa un gel de agarosa 1% en el que se corrieron simultáneamente estas minipreparaciones de ADN plasmídico sin digerir y las correspondientes digestiones con las enzimas Xbal y HindIII. El plásmido obtenido resultó de buena calidad encontrándose mayoritariamente en su conformación superenrrollada y no contaminado con ADN genómico ni con ARN. En cuanto a los productos de digestión, podemos concluir que solamente los clones 2 y 3 (LAN 2 y LAN 3) corresponden a plásmidos recombinantes pues liberaron un inserto de tamaño esperado (aprox. 1500 pb). Los clones positivos fueron enviados a secuenciar para su análisis.



Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1 - 4: Doble digestión de las minipreparaciones de ADN plasmídico con Xbal y HindIII. Carril 2 y 3: plásmido pTREX-GFP linealizado y liberación de inserto (1500 pb). Estos clones positivos, se secuenciaron. Carril 5 y 10: MPM (GeneRuler 1Kb DNA Ladder) Carril 6 - 9: minipreparaciones de ADN plasmídico sin digerir.

Generación del vector control pTREX-c-Myc-GFP

Las secuencias simple hebra solapantes codificantes para c-Myc, fueron hibridadas empleando 100 μ M de cada oligonucleótido o 10 μ M de cada uno. Estas hibridaciones que oficiaron de inserto, fueron ligadas en el vector pTREX y los

productos transformados en células quimiocompetentes, donde sólo se obtuvieron colonias con la mayor concentración empleada. Las mismas fueron utilizadas como ADN molde para reacciones de PCR en colonia. El producto de PCR esperado para el vector vacío es de 320 pb. La secuencia c-Myc posee un tamaño de 33 pb, por lo que el tamaño teórico del producto de PCR del vector de expresión conteniendo c-Myc sería de 353 pb, sin embargo, al realizar una doble digestión con enzimas de restricción en pTREX se libera un pequeño fragmento de 9 pb. Es por esto que se espera un producto de PCR de tamaño 344 pb para el vector recombinante. Para poder discriminar entre estos fragmentos de 320 pb y 344 pb se utilizó un gel de agarosa al 2 % para obtener una mayor resolución.



Figura 15. Gel de agarosa 2% de los resultados de la reacción de PCR en colonia del control pTREX-c-Myc-GFP (colonias C1-C8) y comparación con el vector de expresión pTREX-GFP vacío empleado como control (C). MPM 100 pb (Thermo Scientific). El tamaño esperado en las colonias positivas es de 344 pb. C-: control negativo (sin ADN).

En la Figura 15 se observa que los productos de amplificación obtenidos para las colonias C1 a C6 y C8 tienen un tamaño mayor al obtenido usando como molde el vector vacío (C), producto que correspondería a la banda esperada de 344 pb. El producto de amplificación de la colonia C7 tiene un tamaño mayor al esperado, esto puede ser causado probablemente por la incorporación de muchas secuencias hibridadas en *tándem*, por lo que fue descartada. De las colonias que rindieron el tamaño esperado, se aisló el plásmido para que sea verificado mediante secuenciación.

Análisis de la secuencia de los plásmidos recombinantes obtenidos

La secuenciación de las colonias positivas tanto para lanosterol 14-αdemetilasa y c-Myc, permitió verificar la identidad de la secuencia y además permitió estudiar la posible presencia de mutaciones o polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Las lecturas obtenidas fueron alineadas con las secuencias de referencia en el TriTypDB utilizando el programa BioEdit.

Estos análisis revelaron la presencia de 11 SNP que se encontraban ya reportados en la secuencia de la enzima lanosterol 14-α-demetilasa y de dos mutaciones sinónimas (Tabla 12). Sin embargo, al tratarse de mutaciones sinónimas no se espera un cambio en la actividad y funcionalidad de la enzima. La secuenciación de c-Myc en el vector control verificó que no hubo mutaciones en ninguna de las colonias analizadas, esperando la expresión normal del c-Myc fusionado a GFP.

Posición	Cambio	Frecuencia	SNP o mutación	Sinónimos o no sinónimos	Aminoácido que codifica
587	A→G	(0,67/0,33)	SNP	No sinónimo	Histidina →Arginina
639	A→C	(0,33/0,67)	SNP	Sinónimo	Valina
654	G→A	-	Mutación	Sinónimo	Leucina
702	G→A	(0,33/0,67)	SNP	Sinónimo	Alanina
733	G→A	(0,67/0,33)	SNP	No sinónimo	Valina→Isoleucina
777	C→T	(0,33/0,67)	SNP	Sinónimo	Valina
955	T→C	(0,33/0,67)	SNP	Sinónimo	Leucina
1062	C→T	(0,33/0,67)	SNP	Sinónimo	Prolina
1071	G→C	(0,67/0,33)	SNP	Sinónimo	Leucina
1110	T→C	(0,67/0,33)	SNP	Sinónimo	Glicina
1152	G→A	(0,67/0,33)	SNP	Sinónimo	Prolina
1215	T→G	(0,67/0,33)	SNP	No sinónimo	Ác. Aspártico→ Ác. Glutámico
1392	C→T	-	Mutación	Sinónimo	Prolina

Tabla 12. Análisis de mutaciones y SNPs de lanosterol 14-α-demetilasa.

Transfección de parásitos

Luego del proceso de transfección se seleccionaron los parásitos mediante el agregado de G-418 a las 24 hs y se monitoreó diariamente el estado de los cultivos por observación directa al microscopio. A las tres semanas se observó que los parásitos correspondientes a la transfección control sin plásmido (mock) habían muerto.

En el caso de pTREX-c-Myc-GFP se observó la presencia de parásitos verdes fluorescentes evidenciando la expresión del producto génico clonado (Figura 16). En comparación al control, en pTREX-c-Myc-LAN-GFP se obtuvieron algunos parásitos verdes pero no fueron representativos de la población (Figura 16). Los motivos aparentes que pueden explicar la variación observada en la expresión del producto génico clonado entre ambas poblaciones pueden ser causadas por: (I) las mutaciones sinónimas y SNPs reportadas pueden ser no neutrales por lo que podría afectar la función y/o aptitud biológica generando perturbaciones a nivel de ARNm y por lo tanto en la expresión de la proteína (Shen, Song et al. 2022), (II) la enzima podría localizarse en un compartimento subcelular que afecte la fluorescencia emitida, por ejemplo por valores pH no neutros, (III) el plegamiento de la proteína no es el correcto o (IV) el producto génico es altamente inestable (Snapp 2005). El cultivo se encuentra creciendo exponencialmente, lo que indica su resistencia al antibiótico y por lo tanto la incorporación del vector transfectado. Actualmente, se continúa trabajando con esta población para cuantificar los niveles de sobreexpresión a nivel de ARNm y proteínas, para su uso a futuro como herramienta en la validación del efecto de los nuevos compuestos organometálicos.

Para poder comparar y evaluar las diferentes transfecciones en términos específicos de fluorescencia se podría realizar citometría de flujo o una PCR en tiempo real.

47



Figura 16. Análisis de los parásitos transfectantes observados por microscopía de fluorescencia. Ambas columnas son representativas de epimastigotas control (izquierda) y epimastigotas con nuestra enzima de interés (derecha). En la primera se visualizan los mismos a campo claro. En la segunda imagen se observa la disposición de la construcción plasmídica por detección de la enzima GFP (verde); ampliamente distribuido en todo el citoplasma. En la última fila muestra la superposición de las imágenes anteriores (GFP) con las imágenes de tinción con DAPI (azul). Observando que la construcción plasmídica se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo.

En suma, en esta tesina se logró amplificar el gen de la lanosterol 14- α demetilasa. Clonarlo en vector de expresión de *T. cruzi*. Además se obtuvieron los parásitos transfectantes para futuros ensayos funcionales para verificar la participación de esta enzima en la respuesta a los compuestos Pd-dppf-mpo y Ptdppf-mpo previamente sintetizados como agentes antiproliferativos de *T. cruzi*.

Conclusiones

- Se amplificó mediante la puesta a punto de la PCR la secuencia codificante de la enzima lanosterol 14-α-demetilasa.
- Se clonó esta secuencia en el vector de expresión pTREX-GFP y se transformó en bacterias *E.coli*.
- Se verificó la secuencia y la fusión con GFP mediante la utilización de dos métodos: digestión y secuenciación.
- La secuencia lanosterol 14-α-demetilasa clonada presenta 11 SNPs y 2 mutaciones sinónimas.
- Ambos productos génicos fueron visualizados por microscopía de fluorescencia.

Perspectivas

- Cuantificar la sobreexpresión mediante qRT-PCR de los niveles de ARNm y mediante *western blot* de los niveles de proteína.
- Analizar la respuesta a compuestos Pd-dppf-mpo y Pt-dppf-mpo en parásitos sobreexpresando lanosterol 14-α-demetilasa y comparar el efecto con los parásitos transfectados con el vector control.

Referencias bibliográficas

- Bern, C. (2015). "La enfermedad de Chagas." <u>Revista de Medicina de Nueva</u> <u>Inglaterra</u> 373(5): 456-466.
- Buckner, F. S. and J. A. Urbina (2012). "Recent Developments in Sterol 14demethylase Inhibitors for Chagas Disease." <u>Int J Parasitol Drugs Drug Resist</u> 2: 236-242.
- Castro, J., Montalto, M., Díaz, M., Castro, G. (2015). "Enfermedad de Chagas: Contribuciones del Centro de Investigaciones Toxicológicas." <u>Acta bioquímica</u> <u>clínica latinoamericana</u> 49(1): 73-82.
- Clayton, C. (2019). "Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription." <u>Open Biol</u> 9(6): 190072.
- Crocco, L., López, A., Rodriguez, C., Catalá, S. (2010). Controlling Chagas disease from school: educational modules. <u>Revista de Educación de Biología</u>.
 13(2): 16-20.
- Danner, E. (2011). "Nucleofección Lonza 4D eficaz con tampones caseros económicos." Retrieved Julio 2022, from https://www.protocols.io/view/effective-lonza-4d-nucleofection-withinexpensive-j8nlk571xl5r/v1.
- De Souza, W. (2002). "Basic cell biology of Trypanosoma cruzi." <u>Curr Pharm</u> <u>Des</u> 8(4): 269-285.
- De Souza, W. (2008). "Electron microscopy of trypanosomes-a historical view." <u>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</u> 103(4): 313-325.
- De Souza, W. (2009). "Structural organization of Trypanosoma cruzi." <u>Mem Inst</u> <u>Oswaldo Cruz</u> 104 Suppl 1: 89-100.
- De Souza, W. and E. S. Barrias (2020). "May the epimastigote form of Trypanosoma cruzi be infective?" <u>Acta Trop</u> 212: 105688.
- Docampo, R. H., G. (2022). "New insights into the role of acidocalcisomes in trypanosomatids."
- Gourbière, S., Dorn, P., Tripet, F. y Dumonteil, E. (2011). "Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control." **108(3)**: 190-202.

- Hemmige, V., H. Tanowitz and A. Sethi (2012). "Trypanosoma cruzi infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations." <u>Int J Dermatol</u> 51(5): 501-508.
- Kramer, S. (2012). "Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids." <u>Mol Biochem</u> <u>Parasitol</u> 181(2): 61-72.
- Kramer, S. (2021). "Nuclear mRNA maturation and mRNA export control: from trypanosomes to opisthokonts." <u>Parasitología</u> 148(10): 1196-1218.
- Kratz, J. M., F. Garcia Bournissen, C. J. Forsyth and S. Sosa-Estani (2018).
 "Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease." <u>Expert Rev Clin Pharmacol</u> **11**(10): 943-957.
- Manosroi, J., K. Rueanto, K. Boonpisuttinant, W. Manosroi, C. Biot, H. Akazawa, T. Akihisa, W. Issarangporn and A. Manosroi (2010). "Novel ferrocenic steroidal drug derivatives and their bioactivities." <u>J Med Chem</u> 53(10): 3937-3943.
- Minning, T. A., D. B. Weatherly, J. Atwood, 3rd, R. Orlando and R. L. Tarleton (2009). "The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of Trypanosoma cruzi." <u>BMC Genomics</u> 10: 370.
- Mosquillo, M. F., L. Bilbao, F. Hernandez, I. Machado, D. Gambino, B. Garat and L. Perez-Diaz (2018a). "Effect of a new anti-T. cruzi metallic compound based on palladium." <u>Biometals</u> **31**(6): 961-974.
- Mosquillo, M. F., L. Bilbao, F. Hernandez, F. Tissot, D. Gambino, B. Garat and L. Perez-Diaz (2018b). "Trypanosoma cruzi biochemical changes and cell death induced by an organometallic platinum-based compound." <u>Chem Biol</u> <u>Drug Des</u> 92(3): 1657-1669.
- Mosquillo, M. F., P. Smircich, M. Ciganda, A. Lima, D. Gambino, B. Garat and L. Perez-Diaz (2020). "Comparative high-throughput analysis of the Trypanosoma cruzi response to organometallic compounds." <u>Metallomics</u> 12(5): 813-828.
- OPS. (2022). "Pan American Health Organization. Enfermedad de Chagas en las Américas - Hoja informativa para los trabajadores de la Salud." Retrieved Julio 2022, from

https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13 568:chagas-in-americas-health-workers-2017&Itemid=40721&Iang=es.

- Osorio, J. a. C., A. (2019). "Discovery and Genetic of Validation of Chemotherapeutic Targets for Chagas' Disease." <u>Frontiers in Cellular and</u> <u>Infection Microbiolgy</u> 8.
- PAHO. (2022). "Pan American Health Organization. Enfermedades desatendidas, tropicales y transmitidas por vectores." Retrieved Julio 2022, from https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-desatendidas-tropicalestransmitidas-por-vectores.
- Pérez, J. A., Crespillo, C., Bosch, P & Molina, I. (2020). "Trypanocidal treatment of Chagas disease." <u>Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.</u>: 1-13.
- Rodriguez Arce, E., M. F. Mosquillo, L. Perez-Diaz, G. A. Echeverria, O. E. Piro, A. Merlino, E. L. Coitino, C. Maringolo Ribeiro, C. Q. Leite, F. R. Pavan, L. Otero and D. Gambino (2015). "Aromatic amine N-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases." <u>Dalton Trans</u> 44(32): 14453-14464.
- Shen, X., S. Song, C. Li and J. Zhang (2022). "Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral." <u>Nature</u> 606(7915): 725-731.
- Snapp, E. (2005). "Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology." <u>Curr Protoc Cell Biol</u> Chapter 21: 21 24 21-21 24 13.
- Teixeira, D. E., M. Benchimol, P. H. Crepaldi and W. de Souza (2012).
 "Interactive multimedia to teach the life cycle of Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease." <u>PLoS Negl Trop Dis</u> 6(8): e1749.
- Teixeira, S. M., R. M. de Paiva, M. M. Kangussu-Marcolino and W. D. Darocha (2012). "Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases." <u>Genet Mol Biol</u> 35(1): 1-17.
- Urbina, J. A. (2009). "Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease." <u>Mem Inst Oswaldo Cruz</u> 104 Suppl 1: 311-318.
- Vazquez, M. P. and M. J. Levin (1999). "Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved Trypanosoma cruzi expression vector." <u>Gene</u> 239(2): 217-225.

- Vela, A., M. Coral-Almeida, D. Sereno, J. A. Costales, C. Barnabe and S. F. Breniere (2021). "In vitro susceptibility of Trypanosoma cruzi discrete typing units (DTUs) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis." <u>PLoS Negl Trop Dis</u> 15(3): e0009269.
- Verkhusha, V., Shavlovsky, M., Nevzglyadova, O., Gaivoronsky, A., Artemov, A., Stepanenko, O., Kuznetsova, I and Turoverov, K. (2003). "Expression of recombinant GFP-actin fusion protein in the methylotrophic yeast." <u>FEMS</u> <u>Yeast Research</u> 3(1): 105-111.
- Wang, W., D. Peng, R. P. Baptista, Y. Li, J. C. Kissinger and R. L. Tarleton (2021). "Strain-specific genome evolution in Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas disease." <u>PLoS Pathog</u> 17(1): e1009254.
- WHO (2021). World Health Organization. Poner fina a la desatención para alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible : Hoja de ruta sobre enfermedades tropicales desatendidas 2021-2030.
- WHO. (2022). "World Health Organization. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)." Retrieved Julio 2022, from https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis.