



PRODUCCIÓN DE PROTEASAS RECOMBINANTES DE TRIPOANOSOMÁTIDOS Y SU EFECTO SOBRE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

Guillermo Tramontin

**Tutor: Dra. Izabela Marques Dourado Bastos
Co-Tutor: Dr. Eduardo Osinaga**

Agosto 2014



TABLA DE CONTENIDOS

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
1 – INTRODUCCIÓN	3
1.1 – <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> Y ENFERMEDAD DE CHAGAS	3
1.2 – <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i> Y ENFERMEDAD DEL SUEÑO	7
1.3 – PROTEASAS	10
METALO-PROTEASAS.....	11
PROTEASAS DE ASPARTATO	11
PROTEASAS DE CISTEÍNA	12
PROTEASAS DE TREONINA Y GLUTAMATO	12
PROTEASAS DE SERINA	13
PROTEASAS DE PARÁSITOS.....	13
1.4 – FAMILIA DE PROLIL OLIGOPEPTIDASAS	13
PROLIL OLIGOPEPTIDASA	14
OLIGOPEPTIDASA B.....	16
1.5 – LEUCIL AMINOPEPTIDASAS	17
1.6 – CUERPOS LIPÍDICOS	17
1.7 – RESPUESTA INMUNE CONTRA PARÁSITOS	19
2 – OBJETIVO	21
2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 – METODOLOGÍA	22
ANTECEDENTES	22
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.....	23
INDUCCIÓN DEL CULTIVO BACTERIANO.....	23
LISIS DE BACTERIAS.	23
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR IMAC.....	24
ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	24
CONCENTRACIÓN DE FRACCIONES DE INTERÉS.....	25
ANÁLISIS POR SDS-PAGE.....	25
<i>WESTERN-BLOTTING</i>	25
CULTIVOS CELULARES.	26

ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS.....	26
DOSIFICACIÓN DE CITOQUINAS POR EL MÉTODO DE ELISA.....	27
4 – RESULTADOS	28
4.1 – PURIFICACIÓN POR SDS-PAGE.....	28
4.2 – ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A PARTIR DE MEDIDAS FLUORIMÉTRICAS.	33
4.3 – TINCIÓN Y RECUENTO DE CUERPOS LIPÍDICOS.	35
4.4 – CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS POR ELISA	37
5 – DISCUSIÓN	39
6 – CONCLUSIONES	45
7 – BIBLIOGRAFÍA.....	47
8 – ANEXO	51

LISTADO DE ABREVIATURAS

5- y 15-LO	5- y 15-Lipooxigenasa
AMP	Ampicilina
Asp	Aspartato
COX	Ciclooxigenasa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ER	Retículo endoplásmico
Gly	Glicina
His	Histidina
IFN-γ	Interferón γ
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LAP	Leucil aminopeptidasa
LB	Cuerpo lipídico
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LT	Linfocito T
LTC₄	Leucotrieno C ₄
MMP	Metalo-proteasa de matriz
O. N.	<i>Over night</i>

OPB	Oligopeptidasa B
POP	Prolil oligopeptidasa
Pro	Prolina
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
PGE₂	Prostaglandina E ₂

1 – INTRODUCCIÓN

1.1 – *Trypanosoma cruzi* y Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria, crónica, sistémica, transmitida por vectores insectos de la subfamilia Triatominae, pertenecientes a la familia Reduviidae, y causada por el parásito protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Actualmente, es endémica en 21 países de América Latina (desde el norte de México hasta el sur de Chile y Argentina) y se estima que más de 8 millones de personas se encuentran infectadas con el parásito (WHO, 2013, Figura 1.1.1). Cada vez son más los casos de infección registrados en el resto del mundo debido a la emigración de personas infectadas.

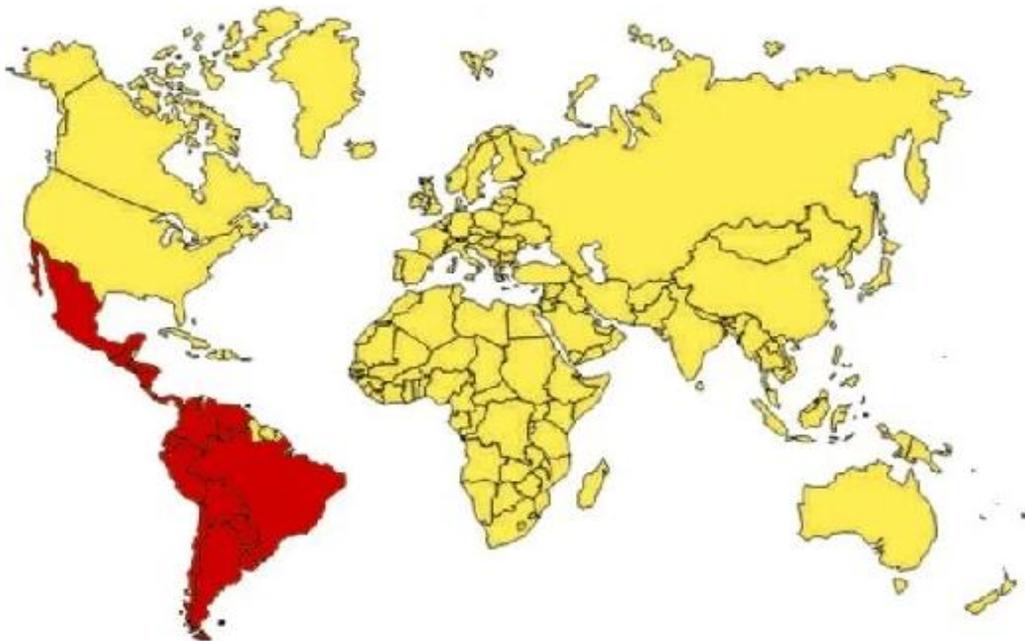


Figura 1.1.1. Países endémicos para la Enfermedad de Chagas. Obsérvese una importante y principal distribución de la enfermedad en países de América Central y América del Sur.

Las poblaciones afectadas y que se encuentran en riesgo de contraer la infección son generalmente aquellas de bajos niveles socio-económicos, con viviendas precarias en zonas rurales, las cuales están en mayor contacto con los vectores insectos ¹.

El parásito *T. cruzi* es transmitido por insectos hematófagos pertenecientes a la familia Reduviidae y a la subfamilia Triatominae, los cuales pican a los huéspedes al mismo tiempo que depositan sus heces en un sitio próximo a la herida, facilitando de esta forma el ingreso de la forma infectiva del parásito en el organismo del huésped. El ingreso de los parásitos al huésped se da cuando el individuo se rasca la herida y expone el área de la lesión de la piel a la infección por dichos parásitos. A su vez, *T. cruzi* también puede ser transmitido a través de transfusiones sanguíneas, la ingesta de alimentos contaminados o por un pasaje de la madre al hijo a través de la placenta ².

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo y atraviesa varias etapas. En el intestino posterior de los triatomíneos, *T. cruzi* se diferencia a la etapa de tripomastigota metacíclico, el cual es eliminado con las heces durante la alimentación del insecto. Una vez dentro del huésped, los parásitos infectan varios tipos celulares, principalmente macrófagos, dentro de los cuales se diferencian a la etapa de amastigota y se dividen por fisión binaria. Los macrófagos son importantes en el transporte del parásito hacia otras partes del cuerpo ³. Las formas amastigotas se diferencian a tripomastigotas, las cuales escapan de la célula produciendo la lisis celular y pudiendo infectar nuevas células o circular por el torrente sanguíneo hasta ser ingeridos por un insecto hematófago. Los tripomastigotas se diferencian a epimastigotas, los cuales se dividen y transitan el camino al intestino medio del insecto para diferenciarse y volver a iniciar el ciclo (Fig. 1.1.2) ⁴.

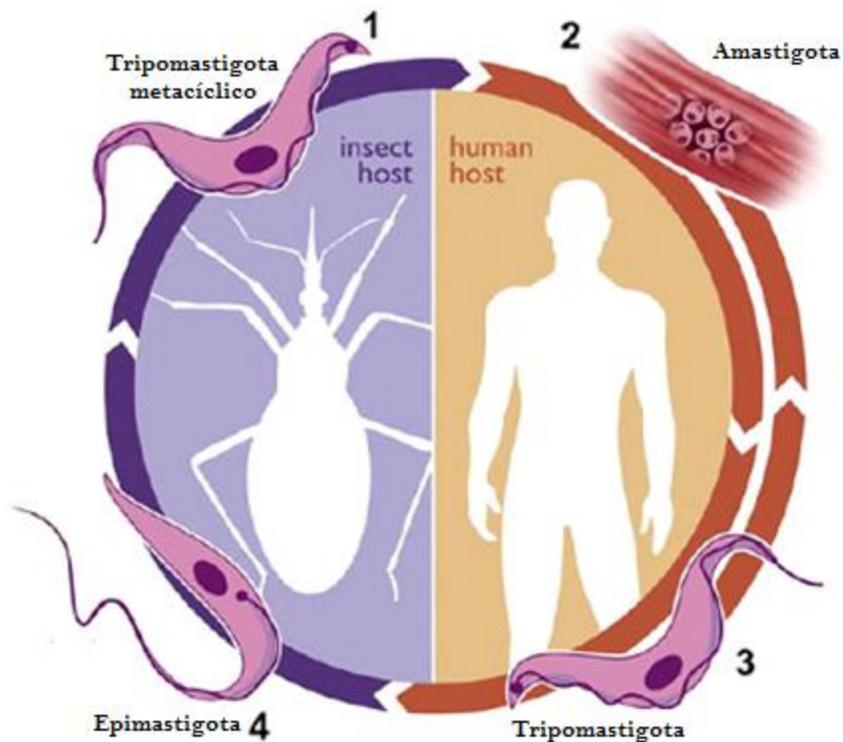


Figura 1.1.2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Se detallan las diferentes etapas en el ciclo de vida del parásito: tripomastigota metacíclico, amastigota, tripomastigota y epimastigota, según cuál sea su huésped. Modificado de Cuervo *et al*, 2009⁴.

De los individuos infectados por *T. cruzi*, sólo 15-30% desarrolla manifestaciones clínicas³. La enfermedad de Chagas se caracteriza por tener una fase aguda, generalmente asintomática, pero en la cual pueden verse signos como fiebre, náuseas, diarrea, inflamación en el sitio de infección con una consecuente hinchazón conocida como chagoma. Sin embargo, existen casos severos de esta etapa donde pueden presentarse miocarditis, meningoencefalitis, linfadenopatía y hepatoesplenomegalia. El electrocardiograma puede mostrar anomalías, incluyendo prolongaciones del intervalo atrioventricular y taquicardia sinusal. Durante la fase aguda, la cual comienza luego de 6-10 días post-infección y puede extenderse entre 1-2 meses, los parásitos pueden ser fácilmente detectados en sangre periférica⁴.

La fase aguda se caracteriza por desencadenar una fuerte respuesta inflamatoria. De manera de poder controlar la multiplicación del parásito, células del linaje monocítico son movilizadas hacia los órganos blanco, principalmente el corazón. La diferenciación de estos monocitos lleva a la aparición de macrófagos con potencial fagocítico con habilidad de procesar y presentar antígenos, producir citoquinas y proveer señales co-estimuladoras que permitan el inicio de la respuesta inmune. Una característica distintiva en estos macrófagos es la presencia en su citoplasma de un gran número de organelos conocidos como cuerpos lipídicos, de los cuales haremos referencia más adelante.

La fase crónica suele presentarse de forma indeterminada, es decir, asintomática. Esto se debe a una respuesta inmune adecuada generada frente a un bajo número de parásitos remanentes en el huésped. Por el contrario, son comunes las formas cardíaca, digestiva o nerviosa de la enfermedad que aparecen luego de 10-25 años. Los principales síntomas incluyen: dolor en el pecho, palpitaciones, mareos, arritmia, tromboembolismo, cardiomegalia, falla cardíaca y muerte súbita. Son también relevantes en algunos lugares geográficos los signos de megacolon y megaesófago chagásico produciendo constipación y disfagia, respectivamente ³.

El tratamiento de la enfermedad de Chagas se basa en el uso de dos drogas derivadas de nitroheterociclos. El nifurtimox (Lampit[®], Bayer) es un 5-nitrofurano dirigido contra tripomastigotas circulantes y es mejor tolerada por pacientes jóvenes. El benznidazole (Rochagan[®], Radanil[®], Roche) es un nitroimidazol. Ambas drogas tienen serios efectos adversos como resultado de su mecanismo de acción y ninguna es lo suficientemente eficaz contra la etapa crónica de la enfermedad ⁵.

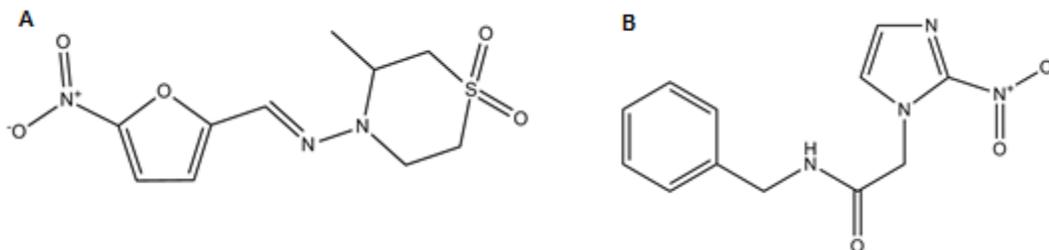


Figura 1.1.3. Fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Se muestra la estructura química de los dos fármacos utilizados para el tratamiento de la tripanosomiasis americana.

A) Nifurtimox. **B)** Benznidazole.

1.2 – *Trypanosoma brucei* y Enfermedad del Sueño

En el África sub-Sahariana, la enfermedad del sueño, también conocida como tripanosomiasis africana, es causada por el *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*). En conjunto con *T. cruzi*, son organismos eucariotas evolutivamente antiguos que cuentan con características bioquímicas y moleculares particulares.

Existen tres sub-especies de *T. brucei*, dos de las cuales causan enfermedad. El vector encargado de transmitir los parásitos es la conocida mosca Tsetse, perteneciente al género *Glossina spp.* Sin un adecuado diagnóstico ni tratamiento, la enfermedad suele ser fatal: los parásitos se multiplican en el cuerpo, atraviesan la barrera hemato-encefálica e invaden el sistema nervioso central. Al día de hoy, la sub-especie *T. brucei gambiense*, que da cuenta del 98% de los casos de la enfermedad del sueño que ocurren cada año en África, es endémica en 24 países, lo cual supone un riesgo de infección para millones de personas (WHO, 2014, Fig. 1.2.1).

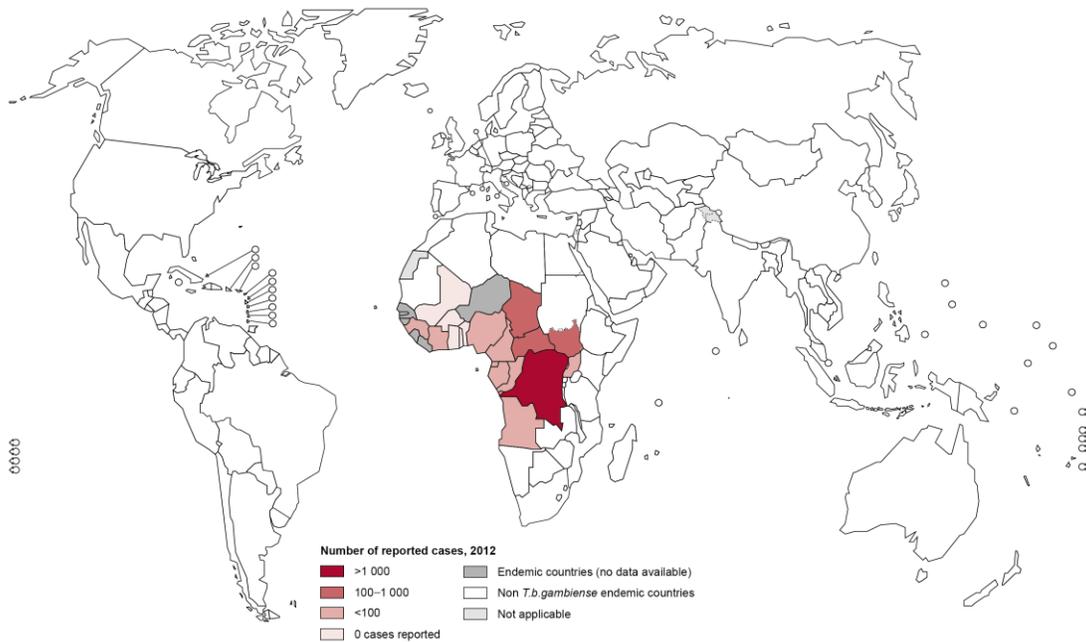


Figura 1.2.1. Distribución de la tripanosomiasis africana humana. Obsérvese los diferentes países endémicos para la sub-especie *T. brucei gambiense*. Nótese la distribución principalmente central y occidental dentro del continente africano. Modificado de WHO, 2014.

El ciclo de vida de *T. brucei* es complejo e involucra tanto a la mosca Tsetse como al huésped mamífero. El estadio tripomastigota procíclico coloniza el intestino medio del insecto para luego transformarse al estadio epimastigota en las glándulas salivales y diferenciarse en una etapa posterior al estadio de tripomastigota metacíclico. Esta forma del parásito es la que infecta al huésped mamífero. Es en el torrente sanguíneo y líquido intersticial de éste último, donde se transforma al estadio de tripomastigota largo y delgado altamente proliferativo. En última instancia, estos parásitos se diferencian al estadio de tripomastigota corto y grueso no proliferativo.

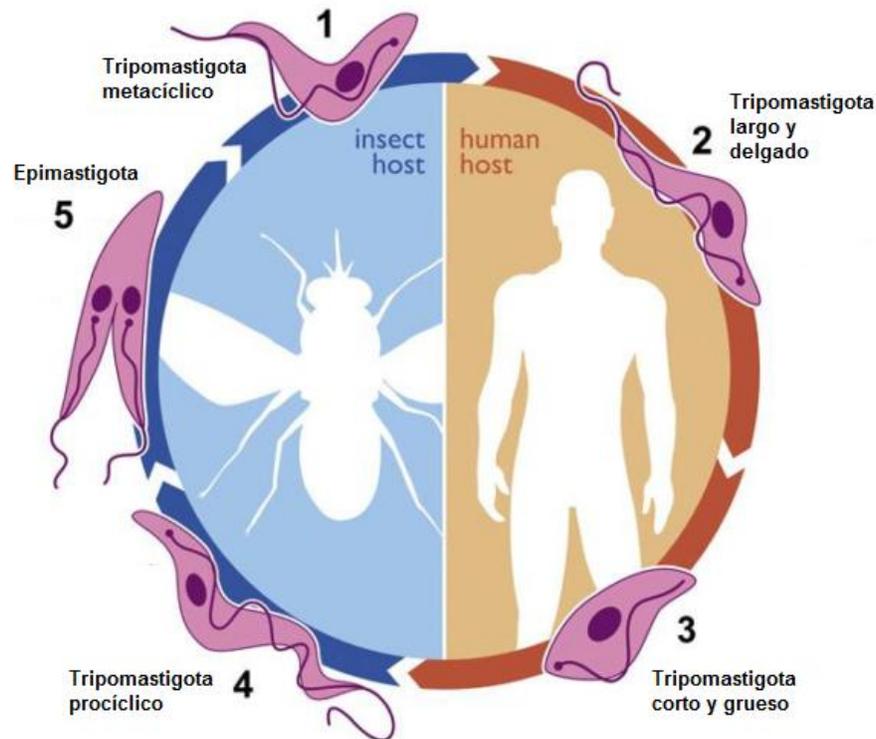


Figura 1.2.2. Ciclo de vida de *T. brucei*. Se muestran las diferentes etapas en el ciclo de vida del parásito: tripomastigota metacíclico, tripomastigota largo y delgado, tripomastigota corto y grueso, tripomastigota procíclico y epimastigota, según cuál sea su huésped. Modificado de Cuervo, *et al*, 2009⁴.

La patología puede clasificarse en estadios 1 y 2 en función de si los parásitos han logrado alcanzar el fluido cerebroespinal. Luego de su inoculación, los parásitos proliferan en el sitio de

infección, desencadenando la formación de una úlcera inflamatoria. Los parásitos se propagan hacia el ganglio linfático drenante y alcanzan el torrente sanguíneo, iniciando el estado hemolinfático de la enfermedad. En esta etapa, los parásitos pueden ser detectados en la sangre y aspirados linfáticos, a no ser en casos de infección con *T. brucei gambiense* en donde los niveles son menores al límite de detección³.

En la segunda etapa, los parásitos invaden órganos internos, incluyendo el sistema nervioso central (SNC), y el tiempo que lleva alcanzar esta etapa depende de la sub-especie en cuestión. Se caracteriza por una inmunosupresión generalizada, donde se ven involucrados el óxido nítrico y la prostaglandina E en una primera etapa, y la interleucina 10 (IL-10) posteriormente. Actualmente, se desconoce el mecanismo de entrada de los parásitos al SNC. Sin embargo, se postula que, probablemente, la puerta de entrada sea a través del plexo coroideo³.

A medida que progresa la etapa 2, los dolores de cabeza se vuelven más severos y aparecen problemas vinculados al sueño como consecuencia de una alteración de los ritmos circadianos, desencadenando una somnolencia diurna y un insomnio nocturno, de aquí el nombre de la enfermedad³.

En cuanto al tratamiento de la enfermedad, hoy en día se dispone de cuatro drogas (Fig. 1.2.3). Dos de ellas, pentamidina y suramina, son utilizadas antes de que se vea involucrado el SNC. Contra la enfermedad tardía, el fármaco utilizado es el melarsoprol. La eflornitina es solamente utilizada en el tratamiento contra la enfermedad causada por la sub-especie *T. brucei gambiense*. Todas estas drogas tienen serios efectos adversos; por ejemplo el melarsoprol es un compuesto orgánico tóxico derivado del arsénico que causa una encefalopatía reactiva en el 20% de los pacientes tratados y entre un 2-12% muere como consecuencia del tratamiento³.

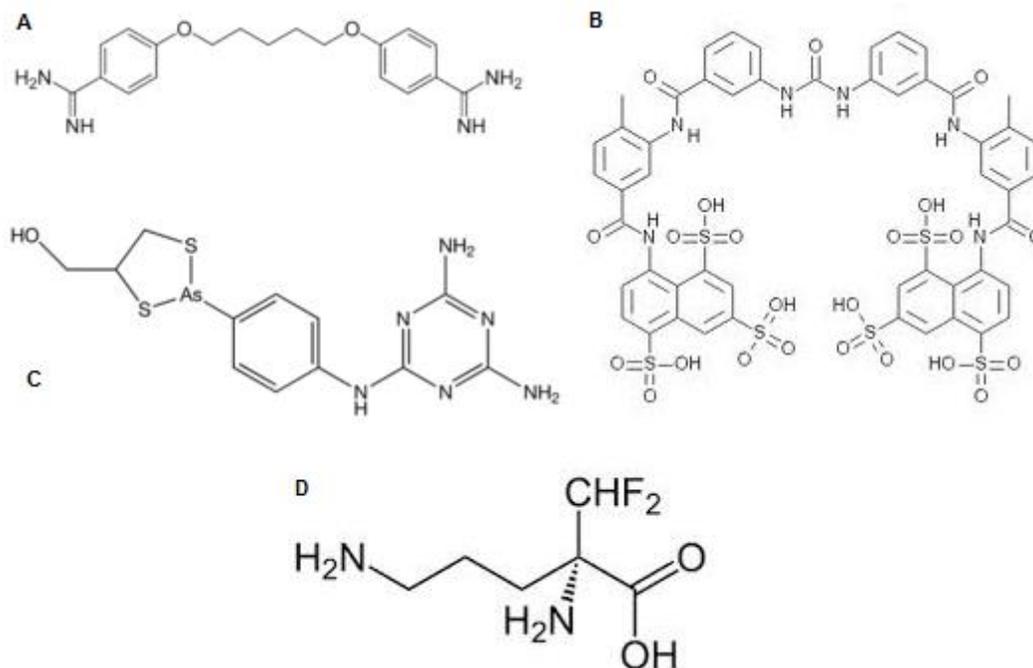


Figura 1.2.3. Fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad del sueño. Se muestran los cuatro fármacos utilizados para el tratamiento de la tripanosomiasis africana. **A)** Pentamidina. **B)** Suramina. **C)** Melarsoprol. **D)** Eflornitina.

No sólo se han observado peligrosos efectos adversos, sino que el tratamiento con estos fármacos suele generar una resistencia a dichas drogas lo que hace más difícil curar la enfermedad. Es por ello que en los últimos años se han buscado nuevos blancos moleculares para la creación de nuevas drogas más eficaces, así como nuevos abordajes terapéuticos que potencien el sistema inmune del paciente para combatir mejor la enfermedad.

1.3 – Proteasas

Las proteasas, o peptidasas, son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos de proteínas u otros fragmentos peptídicos. Pueden clasificarse teniendo en cuenta varios criterios; aquellas enzimas encargadas de fragmentar enlaces peptídicos internos son conocidas como endopeptidasas o proteinasas, mientras que aquellas enzimas que remueven residuos ubicados sobre los extremos de proteínas o péptidos se denominan exopeptidasas y pueden ser tanto aminopeptidasas como carboxipeptidasas ⁶. Con respecto a la especificidad, algunas proteasas

muestran una alta especificidad en relación a un único sustrato, mientras que otras pueden actuar sobre una gran diversidad de sustratos y tienen un tipo de actividad indiscriminada ⁷.

En su trabajo de 1986, Barrett y McDonald ⁶ presentaron un sistema de clasificación de las enzimas proteolíticas de acuerdo con el mecanismo catalítico de la proteína y su susceptibilidad frente a determinados inhibidores. Cuatro fueron las clases por ellos propuestas: proteasas de serina, cisteína, aspartato y metalo-proteasas. Más recientemente, se adicionaron dos nuevas clases: proteasas de treonina y glutamato.

Metaloproteasas

Están ampliamente distribuidas tanto en procariotas como eucariotas. Son enzimas con actividad proteolítica que requieren iones divalentes, principalmente cinc, cobalto o calcio. Estos iones suelen ubicarse en la cercanía del sitio activo y favorecen el proceso catalítico. Un importante grupo dentro de esta familia de enzimas son las metalo-proteasas de matriz, entre las cuales se encuentra la colagenasa. Un ejemplo de metalo-proteasas en tripanosomátidos es la glicoproteína de superficie gp63. En *T. cruzi*, esta enzima tiene distintos patrones de expresión según la cepa y el estadio del ciclo de vida de dicho parásito. Sin embargo, su rol en la patología aún no fue elucidado ⁸.

Proteasas de aspartato

Se caracterizan por ser enzimas formadas por un sitio activo que contiene dos residuos de ácido aspártico y que cumplen una función óptima a valores de pH ácidos. La mayor parte de aspartil-proteasas conocidas son inhibidas por pepstatina. Dentro de este grupo están incluidas: pepsina, catepsinas D y E, y renina. Presentan una preferencia por fragmentar enlaces peptídicos entre residuos de aminoácidos hidrofóbicos y actúan por un mecanismo catalítico del tipo ácido-base que involucra la coordinación de una molécula de agua entre los dos residuos de ácido aspártico altamente conservados.

Proteasas de cisteína

Son un importante grupo de proteasas que se caracterizan por conformar una tríada catalítica constituida por residuos de cisteína (Cys), histidina (His) y asparagina (Asn). El grupo tiol del residuo de Cys actúa como nucleófilo gracias a la proximidad con el residuo de His que permite la formación del tiolato. En general, estas enzimas están plegadas en dos dominios globulares de gran tamaño que rodean una hendidura donde se encuentran los aminoácidos de la tríada catalítica que constituye el sitio activo⁹. Los representantes más importantes de este grupo son las catepsinas B, C y F, calpaínas y las caspasas, entre otras.

La cruzipaína, una cisteín-proteasa de la familia de la catepsina L, es considerada la principal y más abundante proteasa de *T. cruzi*, siendo expresada en todos los estadios de vida del parásito, y posee una gran especificidad catalítica. Entre otras funciones, le confiere al parásito la capacidad de invadir tejidos y evadir los mecanismos de la respuesta inmune; es por esto que es considerada un importante blanco terapéutico¹⁰.

En *T. brucei*, podemos destacar la bruceína (catepsina L) y una catepsina B. La primera está relacionada con funciones de nutrición en el parásito¹¹ y la segunda estaría involucrada en procesos que permiten que los parásitos atraviesen la barrera hematoencefálica en procesos dependientes de Ca^{2+} ¹².

Proteasas de treonina y glutamato

Las proteasas de treonina fueron descritas como parte del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum*¹³ y, al día de hoy, son pocas las familias clasificadas dentro de este grupo de enzimas y no se conocen inhibidores específicos. El grupo hidroxilo del residuo de treonina amino-terminal del sitio activo actúa como nucleófilo para catalizar la fragmentación del enlace peptídico blanco, al actuar sobre un grupo electrófilo.

El proteasoma es un complejo proteico encargado de la remoción de proteínas ubicuitinadas en el citoplasma, que se caracteriza por presentar una enorme actividad de tipo treonin-proteasa.

Las proteasas de glutamato no fueron descritas como nuevo grupo de enzimas proteolíticas hasta 2004. Antes, formaban parte de las proteasas de aspartato, ya que su actividad catalítica se inicia con la activación de un residuo de ácido aspártico. Fujinaga *et al*, propusieron una nueva clasificación para este grupo de peptidasas bajo el nombre de eqolisinas, ya que contenían un residuo de ácido glutámico (E) y otro de glutamina (Q) en su sitio activo y a su vez presentaban un plegado característico nunca antes visto en otras enzimas proteolíticas¹⁴.

Proteasas de Serina

Son una clase de proteasas caracterizadas por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo. El grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina participa de la catálisis enzimática y de la ligación al sustrato. Participan de muchos procesos fisiológicos importantes como ser la digestión (tripsina, quimiotripsina), respuestas inmunológicas (factores del complemento), coagulación sanguínea (factores VII_a, IX_a, X_a y XII_a) y reproducción (acrosina)¹⁵.

Generalmente, no requieren cofactores. El mecanismo catalítico de esta clase de enzimas logró ser entendido gracias a la determinación de la estructura tridimensional de la primera peptidasa, la quimiotripsina¹⁶. Una de las familias de esta clase, la familia de prolil oligopeptidasas, fue la elegida como blanco de estudio en este trabajo.

Proteasas de parásitos

Varios autores han relacionado la actividad proteolítica llevada a cabo por las proteasas de parásitos con la patogenia de las enfermedades previamente mencionadas. Estas enzimas, liberadas en el plasma del huésped por secreción activa o una vez desencadenada la lisis del parásito, podrían degradar e inactivar hormonas peptídicas claves que regulan la liberación de hormonas centrales y periféricas¹⁷.

1.4 – Familia de prolil oligopeptidasas

La familia de prolil oligopeptidasas o S9, fue descrita por Rawlings en 1991¹⁸ y constituye una familia dentro de las proteasas de serina. En dicho trabajo, los investigadores encontraron que el mecanismo catalítico de estas nuevas enzimas no era igual al de las serin-endopeptidasas,

como ser la quimiotripsina o la subtilisina, sino que estas enzimas hidrolizaban oligopéptidos, proponiendo de esta forma su actual nombre.

En su sitio activo, localizado en una cavidad de la enzima, se encuentra la triada catalítica formada por Ser, Asp e His. El residuo de Ser se encuentra generalmente rodeado de aminoácidos pequeños, preferentemente Gly, de manera de evitar el impedimento estérico. Se encargan de hidrolizar los enlaces peptídicos a nivel del grupo carboxilo de residuos de prolina¹⁹. Existen excepciones, como ser aquellas prolil oligopeptidasas que fragmentan luego de residuos de Lys y Arg; por ejemplo, la Oligopeptidasa B. El paso limitante de la catálisis sería la entrada del sustrato en el sitio activo de la enzima, lo cual se ve dificultado dada la localización del mismo en el interior de la enzima.

En humanos, son importantes a nivel biológico en tanto fragmentan péptidos relevantes como ser angiotensinas I y II, bradiquinina, oxitocina y vasopresina, entre otros¹⁹. Pueden ser expresadas en diferentes localizaciones celulares, desde el citosol, la superficie celular, o el periplasma de algunas bacterias.

Los principales representantes de esta familia son: prolil oligopeptidasa propiamente dicha (POP, EC 3.4.21.26), oligopeptidasa B (OPB, EC 3.4.21.83), dipeptidil peptidasa IV (DPP IV, EC 3.4.14.5) y acilaminoacil peptidasa (ACPH, EC 3.4.19.1)²⁰.

Prolil oligopeptidasa

La enzima POP es una proteína de aproximadamente 80 kDa encargada de hidrolizar, preferentemente, péptidos pequeños, de un tamaño menor a 30 aminoácidos, sobre el lado carboxilo-terminal de residuos de prolina en una secuencia Pro-X donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La fragmentación proteolítica también puede darse luego de un residuo de alanina, sólo que a una tasa de reacción considerablemente menor.

En humanos, su función se asocia a la maduración y degradación tanto de hormonas peptídicas como de neuropéptidos y a la regulación de la presión sanguínea al participar del sistema renina-angiotensina a través del metabolismo de la bradiquinina y angiotensinas I y II, entre

otros ¹⁹. Recientemente, también se ha evaluado su función como potencial agente terapéutico de administración oral para la enfermedad celíaca, en tanto posee una habilidad única para acelerar la ruptura de gluten rico en prolina en la luz intestinal ²¹.

Fülop *et al* lograron en 1998 resolver la estructura cristalográfica de una prolil oligopeptidasa de músculo porcino. La comparación de secuencias de aminoácidos, entre la enzima porcina y la humana, muestra un 97% de identidad. Las diferencias se ubican lejos del sitio activo y son compatibles con la estructura presentada en la Figura 1.4.1 ¹⁹.

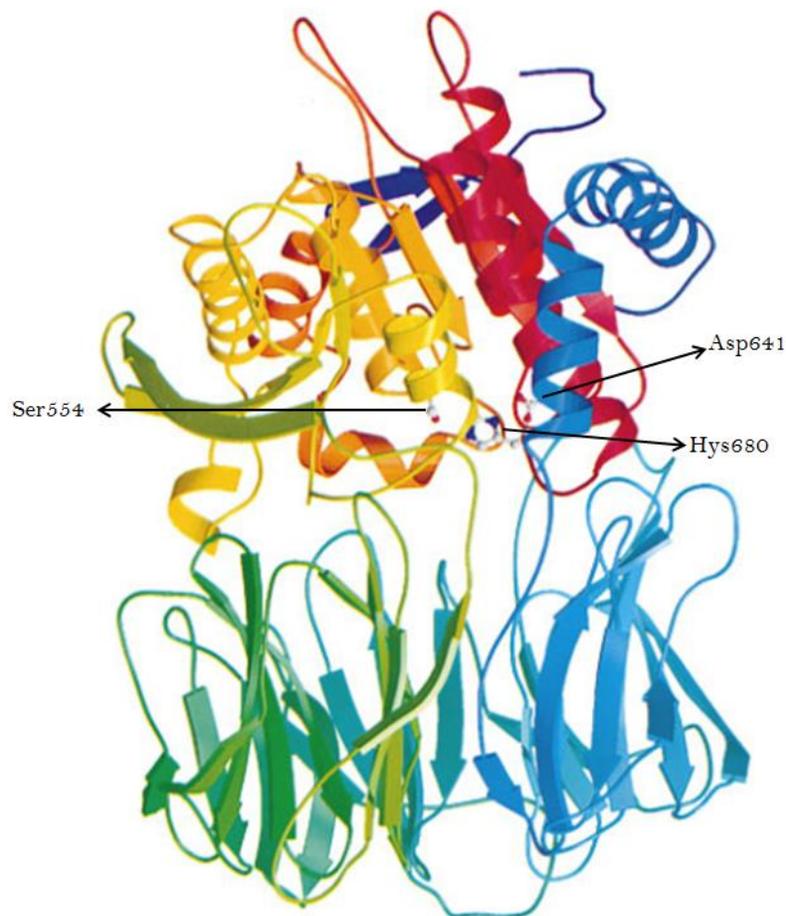


Figura 1.4.1. Representación estérica de la estructura de prolil oligopeptidasa. El diagrama de colores va del azul al rojo en relación con los extremos amino y carboxilo-terminal, respectivamente. Señalados con flechas se muestran los residuos catalíticos en una representación *ball-and-stick*: Ser554, His680, Asp641. Modificado de Fülop *et al*, 1998 ¹⁹.

Esta enzima se ha encontrado tanto en cepas de *T. cruzi* como de *T. brucei*, compartiendo un 77% de identidad, y en ambas especies se asocia con una actividad de tipo colagenasa que podría estar relacionada con la facilidad del parásito para degradar la matriz extracelular y de esta forma poder invadir las células del huésped²². En *T. cruzi*, la POP es secretada por la forma tripomastigota y, sorprendentemente, hidroliza el colágeno de tipo I y tipo IV y moléculas de fibronectina, todas proteínas ricas en prolina. El uso de inhibidores específicos para POP permitió observar que se veía inhibida la entrada de las formas tripomastigotas en diferentes tipos celulares no fagocíticos, de una manera dosis-dependiente. A su vez, se demostró que en la enzima POP de *T. brucei* tiene un tamaño aproximado de 78 kDa y puede fragmentar hormonas peptídicas humanas, como ser bradicidina, β -endorfina, neurotensina, hormona liberadora de tirotropina y hormona liberadora de gonadotropina²³.

Oligopeptidasa B

La enzima OPB, pese a estar incluida dentro de la familia de las proilil oligopeptidasas, es incapaz de fragmentar luego de residuos de prolina. El corte proteolítico lo realiza después de residuos de arginina y lisina, mostrando cierta similitud con las proteasas tipo tripsina. Se sugirió que la enzima tiene una actividad sobre péptidos menores a 30 aminoácidos de longitud. Tiene un tamaño de 80 kDa, pese a que migra como una proteína de 120 kDa en condiciones desnaturizantes en SDS-PAGE, lo que no se corresponde ni con el monómero ni con un posible dímero de la proteína²⁴.

OPB fue descrita en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, espiroquetas y protozoarios. La presencia de OPB en eucariotas fue demostrada por primera vez en *T. cruzi*²⁵. En *T. brucei*, la enzima es liberada en la circulación de animales infectados y permanece activa, pudiendo tener una participación en la patogenia de la enfermedad del sueño²⁶. El hecho de que no se la encuentre en eucariotas superiores, supone una ventaja en la búsqueda de inhibidores específicos ya que apuntaría hacia una quimioterapia segura con mínimos efectos secundarios.

En *T. cruzi*, es una de las enzimas fundamentales para el ingreso del parásito en las células del hospedero, en conjunto con la enzima cruzipaína y POPTc80. Su participación en la invasión celular ocurre por medio de la generación de un agonista que activa la fosfolipasa C de la célula hospedera, resultando en la formación de inositol trifosfato (IP₃) y, consecuentemente, la liberación de Ca²⁺ intracelular^{27,28}.

1.5 – Leucil aminopeptidasas

Las leucil aminopeptidasas (LAPs) forman un grupo de exopeptidasas capaces de catalizar la hidrólisis del enlace peptídico del lado amino-terminal de residuos de leucina, tanto en proteínas como sustratos peptídicos. En general, presentan una actividad máxima a valores de pH neutros, tienen actividades igualmente altas a diferentes valores de temperatura y necesitan de cationes divalentes para poder catalizar las reacciones²⁹.

En el caso de la LAP de *T. cruzi*, la misma pertenece a la familia M17 (M17.014, MEROPS). Son enzimas homo-hexaméricas que se ligan a dos cationes divalentes, donde cada monómero tiene un tamaño de aproximadamente 53-55 kDa y su actividad máxima se consigue a valores de pH levemente alcalinos.

En mamíferos, la enzima se ubica en el interior celular y cumple un rol en la degradación de productos más pequeños producidos por otras proteinasas en el citosol. A su vez, participa en la fragmentación de péptidos producidos por el proteasoma para la presentación de antígenos por la vía del MHC-1, dependiente del interferón γ (IFN- γ)³⁰. Recientemente, se sugirió un posible papel en mantener el estado redox de la célula³¹.

1.6 – Cuerpos lipídicos

Los cuerpos lipídicos (del inglés *Lipid Bodies*, LBs) son también conocidos como gotas lipídicas o adiposomas. Son organelos citoplasmáticos funcionalmente activos que han cobrado una importante relevancia en los últimos años ya que median muchas de las funciones celulares vinculadas al metabolismo lipídico, señalización celular y la inflamación e inmunidad. Están

formados por una monocapa de fosfolípidos, generalmente de igual composición, y contienen en su interior lípidos neutros y proteínas encargadas de llevar a cabo diferentes funciones, tanto estructurales como metabólicas. Entre las características únicas de estos organelos se encuentran la abundancia de ácidos grasos insaturados como lisofosfatidilcolina y la abundancia relativa de fosfatidilcolina con dos cadenas acílicas insaturadas. Son varios los tipos celulares que los presentan, pero principalmente pueden encontrarse en leucocitos como ser macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, pero también en células endoteliales y adipocitos³².

Tienen origen en el retículo endoplásmico (ER), y no se conoce con certeza cuál es el mecanismo por el que se forman. Existen varios modelos que explican la formación de los LBs: el primero de ellos, sugiere la formación a partir de la acumulación de lípidos entre las caras citosólica y luminal de la membrana del ER, seguida del desprendimiento de esos acúmulos hacia el citosol rodeados por una monocapa de fosfolípidos. Otro modelo propone la formación a través de la incorporación de múltiples *loops* de membrana de ER que constituirían el *core* de lípidos neutros³³.

Los leucocitos inactivos, así como el resto de las células eucariotas, tienen un nivel basal bajo de LBs que aumenta rápidamente al ser estimulados. Por ejemplo, los macrófagos presentan en promedio $2,19 \pm 0,4$ LBs por célula. Los LBs son sitio de producción de mediadores de la inflamación, como ser eicosanoides y otros derivados del ácido araquidónico en células inflamatorias. Contienen todas las enzimas necesarias para llevar estas reacciones a cabo: ciclooxigenasa (COX), prostaglandina E₂ (PGE₂) sintasa, 5- y 15-lipooxigenasa (5- y 15-LO) y leucotrieno C₄ (LTC₄) sintasa. En leucocitos activados se encuentran además citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento dentro de los LBs³³.

Existen varias técnicas que permiten visualizar los LBs. Una de ellas se basa en la tinción de las células con el colorante *Oil red*, el cual se une preferencialmente a compartimentos lipídicos gracias a sus propiedades físicas permitiendo su visualización utilizando tanto microscopía de campo claro como de fluorescencia³⁴.

1.7 – Respuesta inmune contra parásitos

A pesar de que el rol exacto del sistema inmune del huésped en la patogénesis de enfermedades como la tripanosomiasis americana no está completamente entendido, es aceptado que el sistema inmune cumple un importante rol en la defensa contra las infecciones parasitarias. Esto queda demostrado en modelos de animales deficientes, tanto en componentes humorales como celulares del sistema inmune, en los cuales la infección por *T. cruzi* resulta letal.

Sin embargo, los parásitos cuentan con múltiples mecanismos que les permiten evadir las respuestas inmunes montadas por el huésped. Entre ellos se destacan la evasión del sistema complemento^{35,36,37}, el enmascaramiento de antígenos³⁸, un rol inmunosupresor, la alteración de la producción de óxido nítrico^{39,40}, la activación de la maquinaria de muerte celular (inducción de apoptosis), y los cambios en el perfil de citoquinas secretadas⁴¹.

Los cambios observados, a nivel del perfil de citoquinas producidas por la célula huésped en un momento dado, son, generalmente, consecuencia de moléculas liberadas por los propios parásitos. Estas moléculas logran su cometido al causar trastornos en el proceso de control del crecimiento celular, ejercer una actividad quimiotáctica hacia células inflamatorias, regular la producción de diferentes citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias, entre otros.

T. cruzi se caracteriza por presentar una gran cantidad de variadas peptidasas; las cuales, luego de culminado el proyecto de secuenciación del genoma de *T. cruzi*, se estiman en más de 200 enzimas¹⁰. Pese a que la mayoría de ellas tiene un rol asociado a la entrada del parásito en las células del huésped, muchas de ellas contribuyen a la inmunosupresión característica de la fase aguda de la enfermedad de Chagas, ya sea modulando la activación de linfocitos T (LTs) como de macrófagos, controlando la expresión génica de ciertas citoquinas en macrófagos y/o células dendríticas, modulando la expresión en superficie de distintos receptores para citoquinas, entre otros.

El rol de algunas POPs en facilitar la invasión celular por parte del parásito, o el acceso del mismo al torrente sanguíneo, podría estar explicando cómo es que se desencadenan las respuestas inmunes locales, principalmente aquellas de tipo inflamatorio. En particular, se ha planteado que la actividad de POPTc80 en el huésped, la cual consiste en degradar el colágeno de tipo I para que el parásito pueda hacerse camino a través de la matriz extracelular, desencadena la liberación, por parte de las células inmunes locales, de metalo-proteasas de matriz (MMPs) que favorecen aún más la degradación y generan péptidos con capacidad quimiotáctica, aumentando el reclutamiento de leucocitos (Fig. 1.7.1)

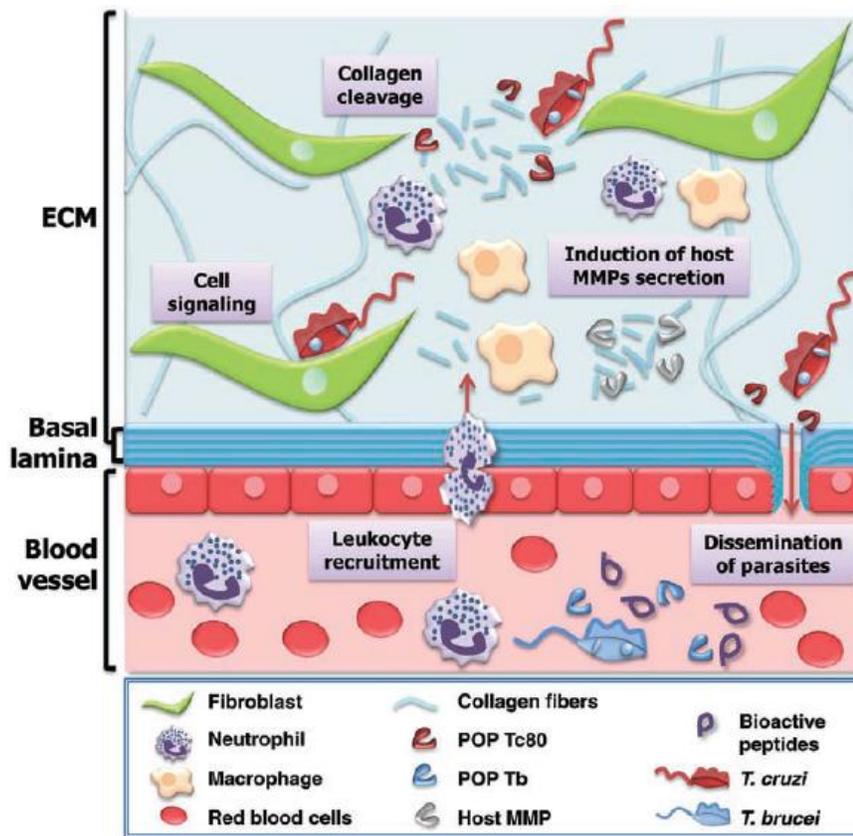


Figura 1.7.1. Posibles efectos de la enzima POP en el huésped. Se detalla el rol de la enzima proil oligopeptidasa de *T. cruzi* y *T. brucei* y su relación con células del sistema inmune. La degradación del colágeno por la enzima POPTc80 puede facilitar la migración de *T. cruzi* por la matriz extracelular. Células inmunes activadas liberan metalo-proteasas de matriz que amplifican la degradación del colágeno y, en conjunto con POPTc80, generan péptidos quimiotácticos, aumentando el reclutamiento de leucocitos. Tomado de Bastos *et al*, 2013⁴⁵.

2 – OBJETIVO

El objetivo de éste trabajo es analizar el perfil de citoquinas generadas en cultivos celulares de macrófagos por proteasas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*.

2.1 – Objetivos específicos

- Expresar y purificar las tres enzimas de interés: prolil oligopeptidasa de *T. cruzi* (POPTc80), prolil oligopeptidasa de *T. brucei* (POPTb) y leucil aminopeptidasa de *T. cruzi* (LAPTc), en cultivos bacterianos.
- Tratar macrófagos murinos de la línea J774 con cada una de las enzimas purificadas y con una oligopeptidasa B de *T. cruzi* (OPB), para evaluar el perfil de citoquinas generadas.
- Analizar el contenido de cuerpos lipídicos de los macrófagos luego del tratamiento con las enzimas de interés.

3 – METODOLOGÍA

Antecedentes

Los genes *laptc1* (GenBank, EAN87580) y *laptc2* (GenBank, EAN97960) de *T. cruzi*, de 1755 pares de bases (*bp*) y 1563 *bp*, respectivamente, se encontraban clonados en vectores de expresión pET-19b (Novagen) entre los sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. La ligación de los fragmentos de ADN al vector fue realizada con ADN T4 ligasa (Invitrogen®).

El gen *opbtc* (Tc00.1047053511557.10; www.genedb.org) se encontraba clonado en un vector de expresión pET-19b (Novagen) entre los sitios de corte para las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI*.

Los genes *poptc80* (EMBL accession no. AW325010) y *poptb* (Tb10.6k15.2520; www.genedb.org) de 2094 *bp* y 2097 *bp*, respectivamente, se encontraban clonados en vectores de expresión pET-15b (Novagen) entre los sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*.

Las bacterias competentes utilizadas para la expresión de proteínas fueron de la especie *Escherichia coli* (*E. coli*) de la cepa BL21 (DE3) (F⁻ ompT⁻ hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm). DE3 indica que las bacterias contienen un profago λ que codifica para la ARN polimerasa T7 y *lacI* que codifica para un represor⁴². Es útil para inducir la expresión en sistemas dirigidos por T7, es decir, la expresión va a darse frente al agregado de un inductor fuerte como ser IPTG. *ompT* indica que las bacterias carecen de una proteasa de membrana externa; esto reduce la degradación de las cepas heterólogas y la recuperación de proteínas recombinantes intactas es mejorada. *hsd* indica que la cepa contiene mutaciones en el sistema de metilación y restricción que le permiten reconocer el ADN foráneo. El genotipo *hsd* permite transformaciones eficientes con ADN generado por reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). *gal* indica que las células no podrán crecer en presencia de galactosa como única fuente de carbono. *dcm* indica que la cepa suprime la metilación endógena de citosina en la secuencia CCWGG. Se utiliza para propagar el ADN para el corte con ciertas enzimas de restricción (por ejemplo: *AvaI*, *BclI*).

Los mapas de los vectores que constituyeron los plásmidos de expresión en los que se clonaron las enzimas de interés se detallan en el anexo como figuras suplementarias.

Transformación de bacterias.

100 μ L de bacterias competentes de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* fueron transformadas con 2 μ L de los plásmidos correspondientes en concentraciones de 1 ng/ μ L: pET-15b+poptc, pET-15b+poptb, pET-19b+laptc1 y pET-19b+laptc2 para expresar prolil oligopeptidasa de *T. cruzi*, prolil oligopeptidasa de *T. brucei*, oligopeptidasa B de *T. cruzi* y leucil aminopeptidasas de *T. cruzi*, respectivamente, conjugadas cada una de ellas a un *tag* de histidina. Luego de 30 min en hielo fueron sometidas a un shock térmico a 42°C por 40 seg para volver a ser colocadas en hielo por 2 min. Se agregó 1 mL de medio Luria Bertani (LB) con una concentración final de ampicilina de 100 μ g/mL y se dejaron crecer las bacterias por 45 min a 37°C bajo oscilación constante de 250 rpm. Luego de un paso de centrifugación a 10000 rpm por 3 min a 4°C en un equipo CF16R11 (Hitachi Koki®), las bacterias fueron resuspendidas en 150 μ L de medio LB para proceder al plaqueo en placas de Petri conteniendo 25 mL de medio LB sólido (LB-Agar) con ampicilina en una concentración de 100 μ g/mL. Se cultivaron a 37°C *over night* (ON).

Inducción del cultivo bacteriano.

Algunas colonias fueron seleccionadas de la placa de Petri y colocadas en 5 mL medio LB con una concentración de ampicilina de 100 μ g/mL. Luego de 1 h 30 min a 37°C en un *shaker* a 250 rpm, los 5 mL fueron colocados en 100 mL de medio fresco con igual concentración de ampicilina y la absorbancia a 600 nm fue controlada hasta alcanzar un valor de 0,6 u.a. Se indujo el cultivo con una concentración final de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) de 0,5 mM y se dejó por 5 h en el shaker oscilando a 250 rpm a 18°C.

Lisis de bacterias.

La lisis de las bacterias se realizó tanto por el uso del *kit* enzimático de lisis *BugBuster® Master Mix* (Novagen) como por sonicación.

50 ml de cultivo fueron centrifugados a 3000 rpm por 10 min a 4°C. El *pellet* bacteriano fue resuspendido en 2,5 mL de *kit* e incubado por 20 min a temperatura ambiente sobre una plataforma oscilatoria. Este *kit* no sólo contiene los detergentes encargados de lisar las células, sino lisozima y nucleasas que se encargaran de degradar el ADN genómico, disminuyendo la viscosidad de la muestra. Los volúmenes reunidos fueron centrifugados a 16000 g por 20 min a 4°C y se conservó el sobrenadante en frío donde se espera encontrar la actividad enzimática.

La lisis por sonicación se llevó a cabo en un procesador ultrasónico *Vibra-Cell* VC130 (Sonics®) empleando un *buffer* de lisis (20 mM Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol), 500 mM NaCl, lisozima 0,2%) y realizando ciclos de sonicado de 2 min con pulsos de 5 seg de 10 W de potencia, e intervalos de 2 min entre ciclo y ciclo para evitar el calentamiento de las muestras y la posible degradación de las proteínas de interés contenidas en el extracto total.

Purificación de proteínas por IMAC.

1 mL de resina HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich®) fue utilizado para el armado de la columna cromatográfica. Se utilizó un *binding buffer* (5 mM Imidazol, 500 mM NaCl y 50 mM Tris) para equilibrar y lavar la columna una vez eluído todo el sobrenadante de cultivo. 2 mL de *washing buffer* (20 mM Imidazol, 500 mM NaCl y 50 mM Tris) fueron pasados por la columna, previo a la elución de las proteínas ligadas con un *elution buffer* (200 mM Imidazol, 500 mM NaCl y 50 mM Tris). Se recolectaron tanto el volumen muerto como las fracciones eluídas con un volumen final de 500 µL. La resina se conservó en una solución de etanol al 20%.

Ensayos de actividad enzimática.

Cada una de las fracciones eluidas fue sometida a un ensayo fluorimétrico de actividad enzimática utilizando un equipo SpectraMax M5 (Molecular Devices®). El sustrato elegido para registrar la actividad enzimática fue AMC (7-aminoacil-4-metilcumarina), bajo la forma del péptido sintético Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC para el caso de prolil oligopeptidasas y Leu-AMC para leucil aminopeptidasas. Los valores de longitud de onda de absorción y de emisión fueron: $\lambda_{\text{abs}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$. Utilizamos una concentración final de AMC de 20 µM en un

volumen final de *buffer* HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil] etanosulfónico) 25 mM, pH 7,5 de 100 μ L. Los datos se procesaron con el software SoftMax Pro 6.2.1.

Las reacciones se dejaron transcurrir por 10 min, registrando el valor en unidades relativas de fluorescencia (RFU) cada 1 min. En base a resultados previos, vamos a considerar una actividad óptima para el sustrato AMC en el entorno de 4×10^5 y 2×10^6 mU/min.

Concentración de fracciones de interés.

Aquellas fracciones con mayor actividad enzimática fueron concentradas utilizando el dispositivo Ultra-4 30K (Amicon® Centrifugal Filter Devices). Se colocaron 2 mL del extracto, proveniente de las 4 fracciones que presentaron mayor actividad enzimática, y 2 mL de agua destilada para obtener un volumen final de 40 μ L. Las proteínas fueron guardadas en una solución de glicerol al 50% en freezer de -20°C.

Análisis por SDS-PAGE.

El concentrado recogido a partir de las fracciones eluidas fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Gel concentrador 4%, gel separador 10%. Se utilizó el marcador de peso molecular Benchmark™ Protein Ladder (Life Technologies®) y se sembraron 5 μ L del mismo. La coloración del gel se realizó con una solución de Coomassie (0,2 g de *Coomassie Brilliant Blue* R-250 en 100 mL de solución decolorante) por 1 h y se destiñó con solución decolorante sin Coomassie (compuesta por agua destilada, etanol 95% y ácido acético glacial en una proporción 5:4:1).

Western-Blotting.

Un gel de SDS-PAGE fue realizado utilizando entramados de gel de 4% y 10% para los geles concentrador y separador, respectivamente, sembrando 2 μ g de la enzima rPOPTc80 en un volumen final de 15 μ L. La transferencia se realizó sobre una membrana de nitrocelulosa por 1 h bajo una corriente de 100 mA. La membrana fue incubada en una solución de TBS (20 mM Tris, 385 mM NaCl, 0,05% Tween 20) con 5% de leche en polvo y 0,1% de Tween20 O.N. El anticuerpo primario utilizado fue un anti-POPTc80 de conejo, generado en el laboratorio,

agregado bajo una dilución 1:100 en una solución de TBS (1% de leche, 0,1% Tween20) por 2 h. El anticuerpo secundario consistió en un anticuerpo anti IgG de conejo (Sigma) utilizado en una dilución 1:7500 en un volumen final de 5 mL de TBS por un tiempo de 1 h. Se incubó la membrana por 10 min con un *buffer* de fosfatasa alcalina y luego se la incubó en el mismo *buffer* conteniendo los sustratos nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) en cantidades de 1 µg y volúmenes finales de 33 µL y 16,5 µL, respectivamente, hasta que aparecieran las bandas.

Cultivos celulares.

Macrófagos peritoneales murinos de la línea J774 fueron cultivados a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco®).

Análisis de formación de cuerpos lipídicos.

5x10⁵ células fueron colocadas por pozo en una placa de 24 pozos y se dejaron crecer las mismas por 24, 48 y 72h en presencia de 10, 100 y 1000 ng de cada una de las enzimas purificadas. Los controles negativo y positivo fueron realizados mediante el agregado de 100 µL de PBS 1X y 1 µL de LPS 1 µg/mL, respectivamente. Los fondos de los pozos contenían láminas de vidrio sobre las cuales crecieron las células, lo que permitió hacer la tinción por el método del *Oil Red*.

Las láminas fueron fijadas con formalina al 3,7% por 10 min y lavadas tres veces con agua Mili-Q. Luego se incubaron por 2 min con poli etilenglicol (PEG) al 100%. Se retiró el exceso y se incubó por 15 min con la solución de *Oil Red* al 0,5%. Luego se retiró el *Oil Red* y se agregó PEG al 60% por 1 min. Nuevamente se realizaron tres lavados con agua Mili-Q. Las láminas fueron recubiertas por 5 seg con solución de Hematoxilina. Tres lavados finales fueron realizados previo al montaje de las láminas en portaobjetos con Entellan, para su posterior observación al microscopio óptico.

El recuento se realizó tomando 50 células para cada una de las condiciones detalladas, observándolas a un aumento de 1000X en medio oleoso y promediando los valores obtenidos.

Dosificación de citoquinas por el método de ELISA.

Ensayos de tipo ELISA fueron realizados utilizando los *kits* proporcionados (eBioscience), para cuantificar la presencia de IL-6 e IL-1 β .

50 μ L de anticuerpo de captura a una concentración de 2 μ g/mL en PBS 1X fueron incubados O.N. a 4°C. El *buffer* de lavado consistió en PBS 1X 0,05% Tween20 y se realizó con volúmenes de 200 μ L. La solución de bloqueo fue PBS 1X BSA 1% y se colocaron 100 μ L por 1 h a temperatura ambiente. La curva de calibración se hizo con citoquinas recombinantes a partir de una concentración de 600 pg/mL con diluciones al medio en un volumen final de 50 μ L. Se sembraron 50 μ L de sobrenadante por pozo y se dejó O.N. a 4°C.

Al otro día se realizaron tres lavados y se sembraron 50 μ L de anticuerpo de detección a una concentración de 50 ng/mL para proceder a incubar por 1 h a temperatura ambiente. Se colocaron 50 μ L de streptavidina por 30 min a temperatura ambiente y luego de lavar tres veces se colocaron 50 μ L del sustrato peróxido de hidrógeno/tetrametilbencidina (TMB) por 30 min en oscuridad. Se cortó la reacción con 25 μ L de HCl 4N y se leyó a la densidad óptica a 450nm en un lector de placas.

4 – RESULTADOS

4.1 – Purificación por SDS-PAGE.

A partir de los extractos totales bacterianos (ETs), obtenidos tal y como se describió en la sección Metodología, se procedió a la purificación de las enzimas rPOPTb, rPOPTc80, rLAPTC1 y rLAPTC2.

Tal como se observa en la Fig. 4.1.1A, para el caso de las enzimas rPOPTb y rPOPTc80 de *T. brucei* y *T. cruzi*, respectivamente, se partió de un extracto de proteínas totales a partir del lisado bacteriano y se purificó la enzima producida por tecnología recombinante al pasar el sobrenadante del cultivo bacteriano por una columna cromatográfica de afinidad utilizando una resina HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich®). El primer carril muestra la cantidad y variedad de proteínas propias de un ET. Los carriles 2-6 de la Fig. 4.1.1A muestran que, tal como era de esperar, hubo poca cantidad de proteínas en las distintas fracciones que iban eluyendo de la columna luego de aplicados los *binding* y *washing buffer*. Luego de la elución con el *elution buffer* conteniendo imidazol a una concentración 200 mM, se observa en el carril 7 una banda mayoritaria correspondiente a la enzima rPOPTb, con un tamaño aproximado de 80 kDa, similar al esperado de 78 kDa.

En el caso de la enzima rPOPTc80, podemos observar en el carril 9 de la Fig. 4.1.1A el ET de partida y en los siguientes carriles las fracciones de elución. Sin embargo, la misma no queda pura, por lo que tendremos que considerar esto en futuros experimentos. La banda mayoritaria, de un tamaño aproximado de 80 kDa, coincide con el tamaño esperado para la enzima de *T. cruzi*.

La Fig. 4.1.1B corresponde a la enzima rLAPTC2 purificada a partir de un sobrenadante obtenido por medio de la lisis bacteriana utilizando pulsos de sonicado. El enriquecimiento en una proteína mayoritaria comienza a notarse a partir del carril 5, correspondiente al lavado previo a la elución utilizando *washing buffer*. La concentración de imidazol de este *buffer* es considerablemente menor a la del *elution buffer* (20 mM contra 200 mM, respectivamente).

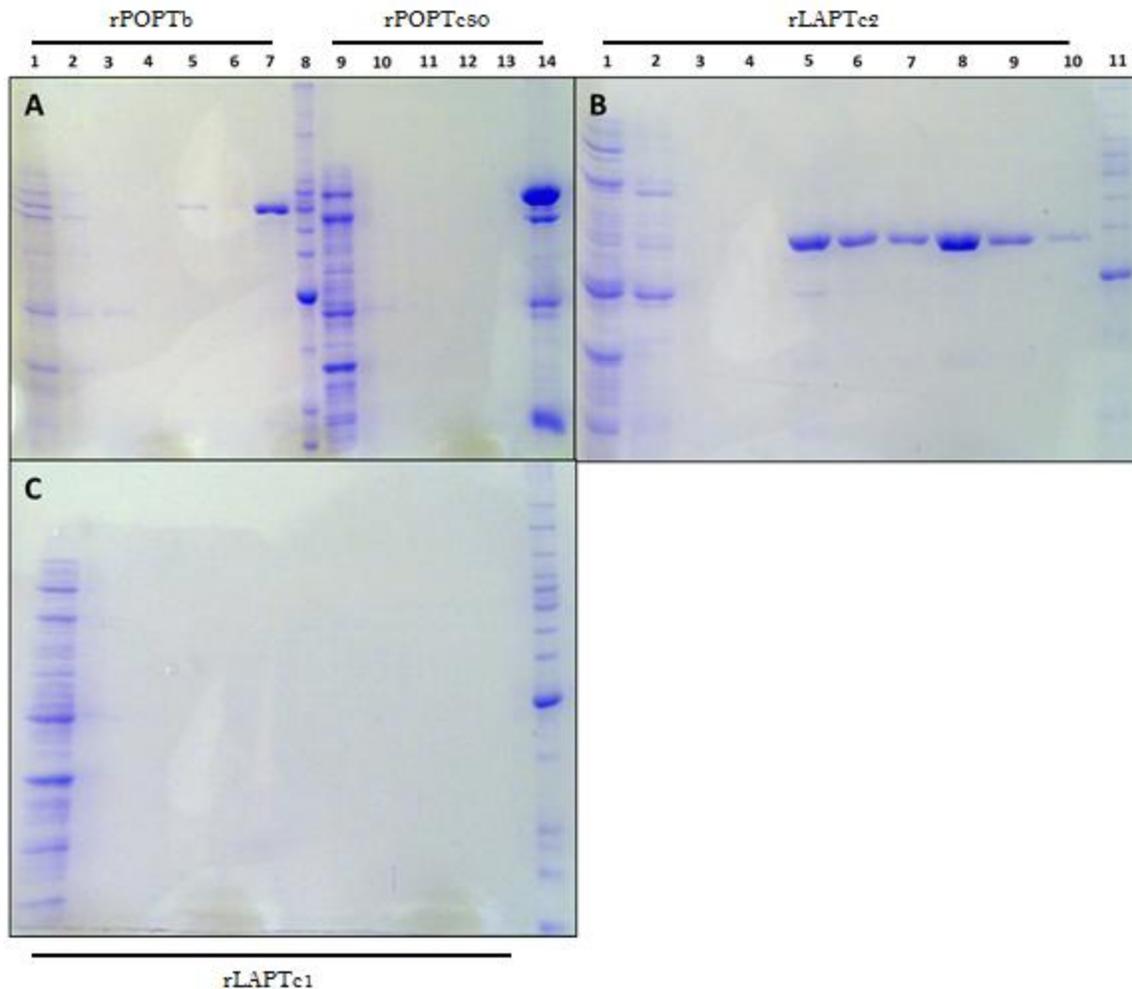


Figura 4.1.1. Niveles de expresión de proteínas de interés evaluados por SDS-PAGE. Diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de cada una de las proteínas de interés fueron sembrados en un volumen final de 15 μ L en un gel de SDS-PAGE al 10% de acrilamida. **A)** 1- ET rPOPTb; 2-, 3- y 4- *binding* rPOPTb; 5- *washing* rPOPTb; 6- y 7- *elution* rPOPTb; 8- marcador de peso molecular Benchmark™ Protein Ladder (Life Technologies®); 9- ET rPOPTc80; 10-, 11- y 12- *binding* rPOPTc80; 13- y 14- *elution* rPOPTc80. **B)** 1- ET rLAPtc2; 2-, 3- y 4- *binding* rLAPtc2; 5- *washing* rLAPtc2; 6- V_0 rLAPtc2; 7-, 8-, 9- y 10- *elution* rLAPtc2; 11- marcador de peso molecular Benchmark™ Protein Ladder (Life Technologies®). **C)** 1- ET rLAPtc1; 2-, 3- y 4- *binding* rLAPtc1; 5- *washing* rLAPtc1; 6- V_0 rLAPtc1; 7-, 8-, 9- y 10- *elution* rLAPtc1; 11- marcador de peso molecular Benchmark™ Protein Ladder (Life Technologies®).

Para el caso de la enzima rLAPtc1, claramente no podemos notar presencia de ninguna proteína en ninguna de las fracciones cromatográficas (Fig. 4.1.1C). Las colonias bacterianas recogidas en un medio selectivo indicaban la incorporación del plásmido.

Con el objetivo de comparar los tamaños de cada una de las enzimas recombinantes purificadas, se corrió un gel con las fracciones obtenidas de mayor pureza (Fig. 4.1.2).

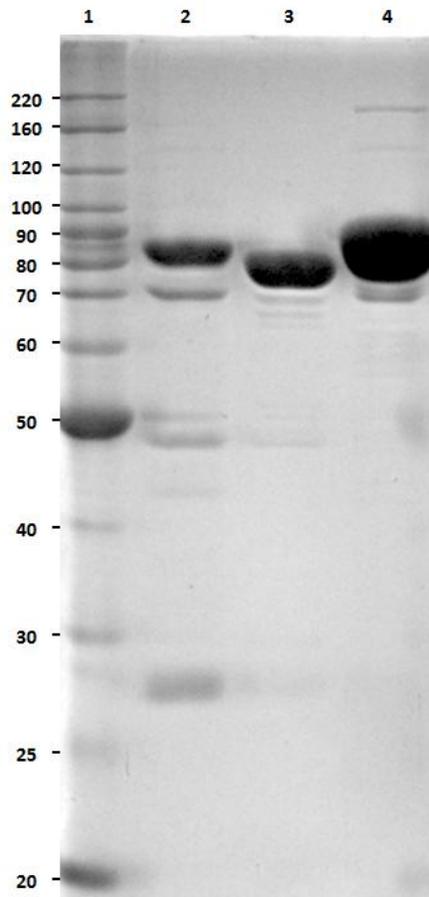


Figura 4.1.2. Análisis electroforético de las proteínas purificadas. Las enzimas recombinantes purificadas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 10% y resueltas por SDS-PAGE. 1- Marcador de peso molecular Benchmark™ Protein Ladder (Life Technologies®); 2- rPOPTc80; 3- rPOPTb; 4- rOPB.

A partir de la Fig. 4.1.2 se pueden estimar los pesos moleculares de cada una de las enzimas recombinantes. En el carril 2 se puede observar la banda correspondiente a la enzima rPOPTc80, con un peso molecular (PM) aparente de 80-90 kDa. En el carril 3 se observa la banda para rPOPTb, cuyo PM aparente coincidiría con el esperado de 70-80 kDa. En el carril 4 se sembró una enzima recombinante purificada, que no fue expresada en el contexto de este trabajo, sino que fue cedida por otro estudiante del laboratorio, pero con la cual se trabajó de

aquí en adelante: rOPB, cuyo tamaño está levemente por encima del valor real de 80 kDa, lo que podría explicarse por un exceso de proteína que genera una banda demasiado gruesa para poder estimar el PM aparente de una manera más precisa.

El gel mostrado en la Fig. 4.1.2 también se utilizó para estimar las concentraciones de nuestras proteínas de interés en las muestras. Para ello se comparó el grosor e intensidad de las bandas con aquellas obtenidas en un gel con distintas cantidades de la proteína BSA (Sero-albúmina bovina, Fig. 4.1.3)

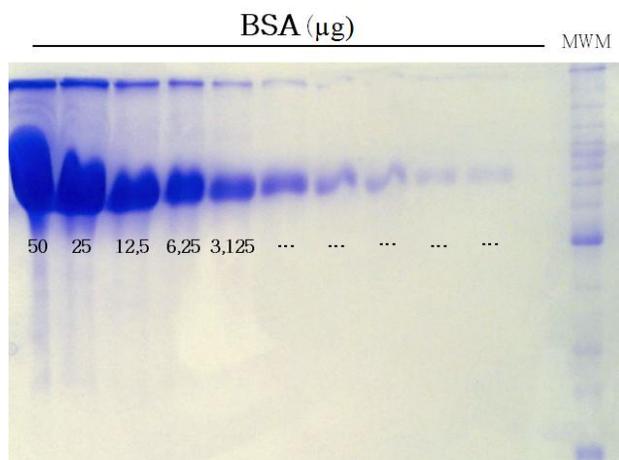


Figura 4.1.3. Gel estándar de BSA. Se muestra un gel de poliacrilamida al 12% en donde fueron sembradas diferentes cantidades de la proteína BSA, a partir de un stock de 10 mg/mL y con volúmenes de siembra de 10 µL, para poder comparar con las bandas mostradas en la Fig. 4.1.2 y estimar las concentraciones de las proteínas de interés. Se incluyen los valores para la cantidad de BSA sembrada, en µg, y en el último carril el marcador de peso molecular (MWM) Benchmark™ Protein Ladder (Life Technologies®).

A partir de estos resultados se estimaron las concentraciones de las enzimas purificadas:

[rPOPTc80] = 1 mg/mL

[rPOPTb] = 1 mg/mL

[rOPB] = 6 mg/mL

Como se puede apreciar tanto en la Fig. 4.1.1A como en la Fig. 4.1.2, los carriles correspondientes a la enzima rPOPTc80 muestran varias bandas minoritarias, de menores pesos moleculares, además de la banda mayoritaria correspondiente a la enzima purificada. De manera de determinar si se trataban de bandas correspondientes a la misma enzima degradada, y para evaluar si, en efecto, la banda mayoritaria era la enzima rPOPTc80, se realizó un *western blot*. En la Fig. 4.1.4 se muestra el fragmento de membrana con una única banda correspondiente a la enzima de interés.



Figura 4.1.4. Análisis de rPOPTc80 por *western blot*. Se muestra la membrana donde fueron transferidas las bandas correspondientes a la muestra de rPOPTc80 purificada del gel mostrado en la Fig. 4.1.2. Nótese una única banda reconocida por el anticuerpo de conejo específico para POPTc80, colocado en una dilución 1:100, que se corresponde con la banda mayoritaria mostrada en el mencionado gel. A la derecha de la banda se detalla el PM aparente en función de la posición con respecto al marcador de peso molecular.

4.2 – Ensayos de actividad enzimática a partir de medidas fluorimétricas.

Para corroborar la funcionalidad de las enzimas purificadas, se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática para prolil oligopeptidasas utilizando el sustrato Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC y para leucil aminopeptidasas utilizando el sustrato Leu-AMC, los cuales una vez fragmentados por las enzimas van a liberar la molécula fluorescente AMC. En la Fig. 4.2.1A se puede observar cómo aumenta el valor de unidades relativas de fluorescencia (RFU) en función del tiempo para un volumen de muestra de 1 μL de rPOPTc80 de concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, lo que marca lo concentrada que estaba la enzima en las fracciones eluidas y el alto grado de actividad de la misma si se tienen en cuenta que para las otras enzimas tuvieron que utilizarse volúmenes de 5 μL de muestra de concentraciones 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Analizando la Fig. 4.2.1B podemos notar que la curva crece de manera abrupta hasta llegar a la saturación a un tiempo aproximado de 7 min. Una cantidad de 5 μL de la muestra de rPOPTb de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, logra alcanzar, luego de 15 min, una actividad enzimática similar a la alcanzada por 1 μL de la muestra de rPOPTc80 de igual concentración.

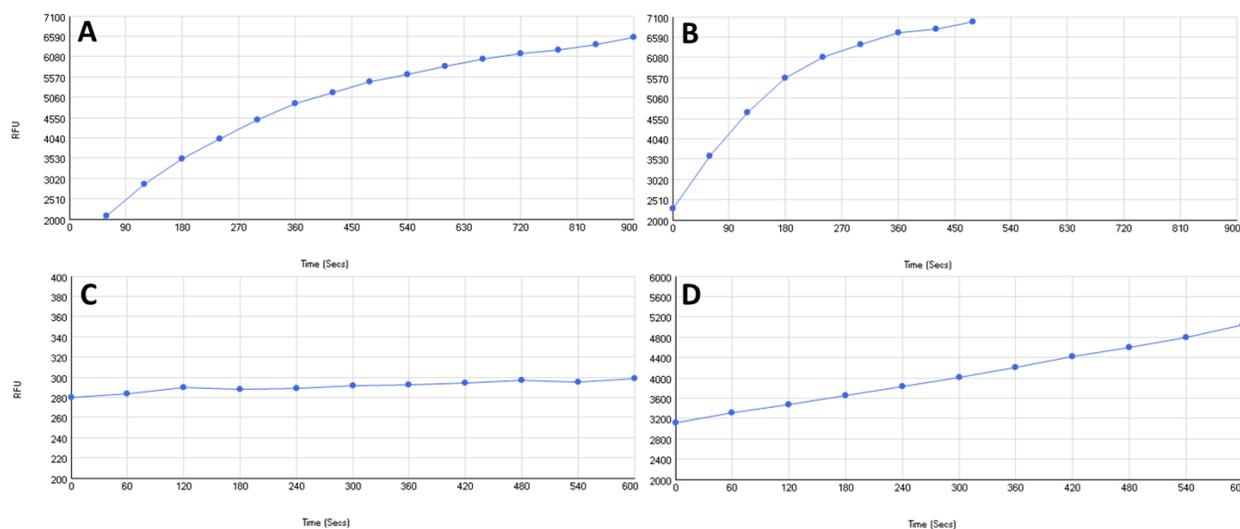


Figura 4.2.1. Ensayos de actividad enzimática. Valores registrados en unidades relativas de fluorescencia (RFU) a valores de $\lambda_{\text{abs}} = 360 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$. Los ensayos fueron realizados para cada una de las enzimas purificadas utilizando como sustrato el péptido Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC para A y B, y Leu-AMC para C y D, en una concentración final de $20 \mu\text{M}$ de sustrato. El volumen de muestra utilizado para la reacción fue de $1 \mu\text{L}$ para A y $5 \mu\text{L}$ para B, C y D, en un volumen final de $100 \mu\text{L}$. **A)** rPOPTc80; **B)** rPOPTb; **C)** rLAPTc2 *BugBuster*[®]; **D)** rLAPTc2 Sonicación. Resultados obtenidos en software SoftMax Pro 6.2.1.

En el caso de la purificación de rLAPTc2, se siguieron dos protocolos de lisis bacteriana, diferentes: se utilizó el *kit BugBuster[®] Master Mix* (Novagen) basado en una lisis alcalina, o se procedió a realizar un protocolo que incluyese ciclos de sonicado, tal como se describió en la sección Metodología. En el primer caso, y como muestra la Fig. 4.2.1C, no se registró actividad enzimática alguna en las fracciones de elución para rLAPTc2, más allá de que en la Fig. 4.1.1B, sí se observó la presencia de una proteína mayoritaria. Por el contrario, el proceso de lisis bacteriana que incluyó ciclos de sonicado logró mantener la funcionalidad de la enzima tal como se observa en la Fig. 4.2.1D, en donde el valor del RFU aumenta con el tiempo a medida que se va fragmentando el enlace Leu-AMC y se libera el sustrato fluorimétrico.

Los ensayos de actividad enzimática no se realizaron para la enzima rLAPTc1 en función de los resultados obtenidos por SDS-PAGE, los cuales indicaban la ausencia de enzima de interés en las fracciones eluidas (Fig. 4.1.1C)

4.3 – Tinción y recuento de cuerpos lipídicos.

A continuación se procedió a evaluar la cantidad de cuerpos lipídicos formados en las células del cultivo bacteriano de macrófagos murinos J774, antes y después del tratamiento con las enzimas purificadas. En la Fig. 4.3.1 se muestran fotos representativas de los cuerpos lipídicos, que se distinguen al microscopio óptico como elementos de color rojo intenso, localizados todo a lo largo del citoplasma celular. Se notan pocas diferencias en la cantidad de dichas estructuras, de distribución citoplasmática, en función de la cantidad de enzima agregada.

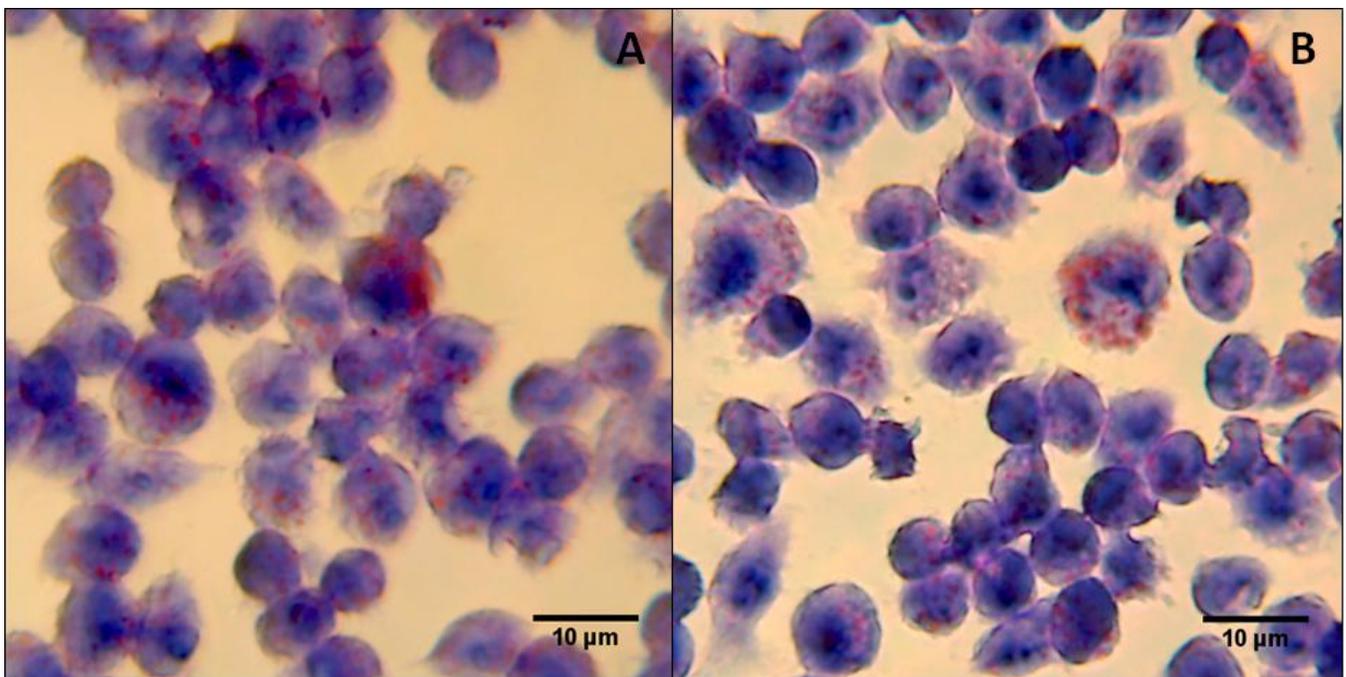


Figura 4.3.1. Tinción de cuerpos lipídicos. Se muestran las células de macrófagos murinos de la línea J774 tratados con la proil oligopeptidasa rOPB de *T. cruzi* a una concentración de **A)** 0,1 ng/μL, y **B)** 1 ng/μL por 24 h. La tinción de dichas estructuras subcelulares se llevó a cabo con el colorante *Oil Red*.

Este resultado es más significativo luego de realizado el recuento de los cuerpos lipídicos al microscopio óptico (Fig.4.3.2). Hay una relación que resulta ser estadísticamente significativa, entre el número de cuerpos lipídicos contados por célula y la cantidad de enzima recombinante agregada, si lo comparamos con un control sin tratar (UNS). Más interesantes son los resultados

si se tiene en cuenta que tanto para la condición de 100 como de 1000 ng de enzima, la cantidad de cuerpos lipídicos contados fue mayor a la que se registró cuando se adicionó a los macrófagos una cantidad de 1 μ L de LPS 1 μ g/mL.

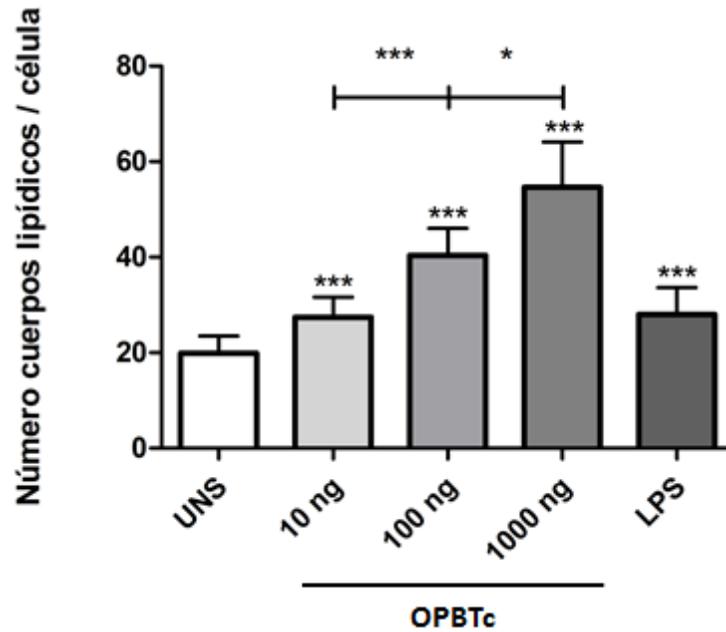


Figura 4.3.2. Cuantificación de cuerpos lipídicos. En cultivos de macrófagos de la línea J774 incubados con la enzima rOPBTc por 48 h, se procedió al recuento de cuerpos lipídicos a partir de la tinción de los mismos por la técnica del colorante *Oil Red*. Se contaron 50 células en cada una de las condiciones detalladas en la figura utilizando un microscopio óptico a un aumento de 1000X (Prueba de comparación múltiple de Dunn: * $P < 0,05$; *** $P < 0,01$, GraphPad Prism).

4.4 – Cuantificación de citoquinas por ELISA

Para evaluar en qué medida el agregado de las enzimas recombinantes modificaba el perfil de citoquinas secretado por los macrófagos murinos, ensayos de tipo ELISA sándwich fueron realizados para cuantificar, en los sobrenadantes de cultivo, las citoquinas IL-6 e IL-1 β . Para cada una de las enzimas ensayadas (rPOPTc80, rPOPTb y rOPB) se estudiaron dos tiempos diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.4.1.

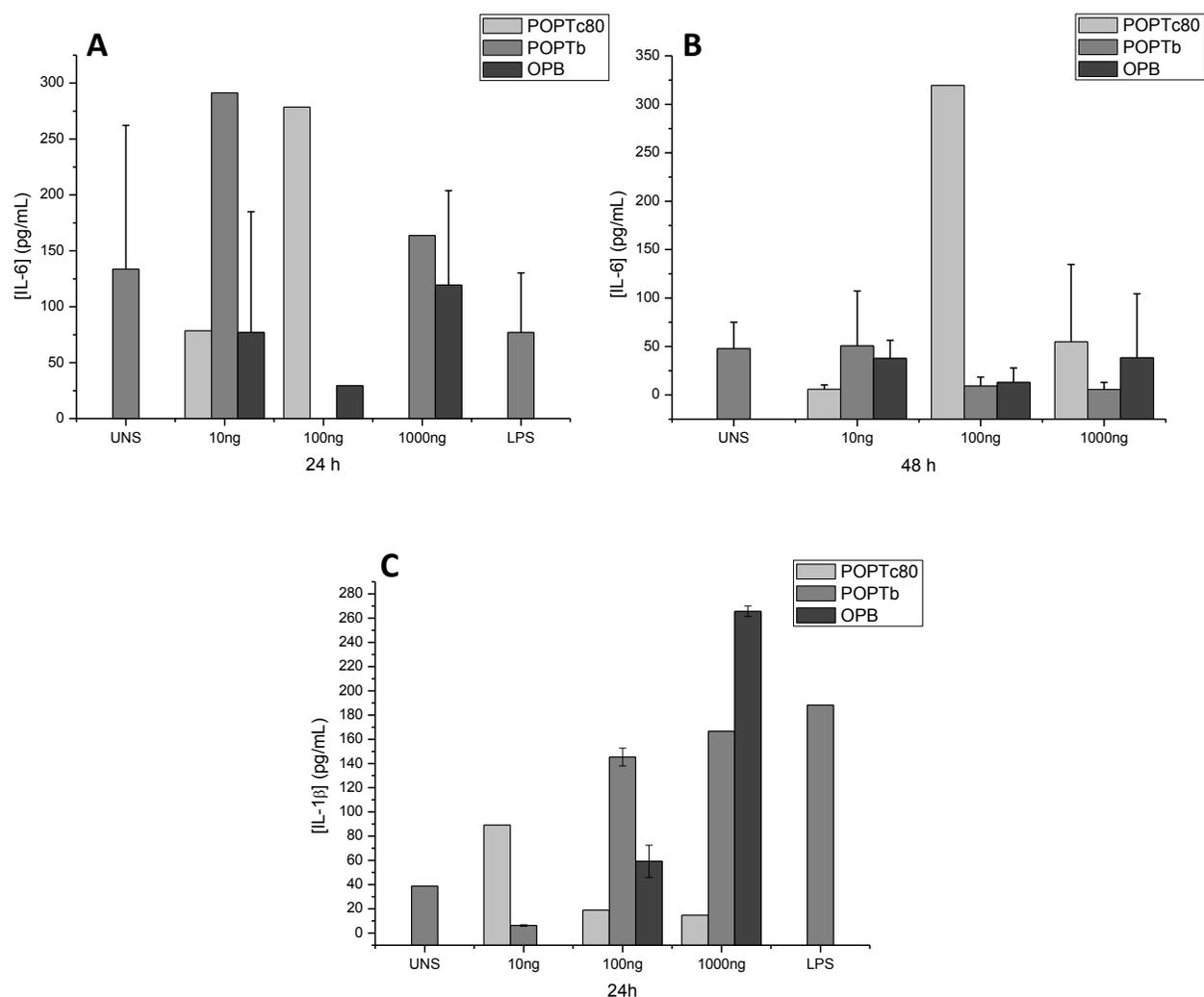


Figura 4.4.1. Cuantificación de citoquinas. La concentración de IL-6 e IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo fue medida por la técnica de ELISA tipo sándwich según lo indicado en la sección metodología. **A)** Concentración de IL-6 luego de 24 h de cultivo. **B)** Concentración de IL-6 luego de 48 h de cultivo. **C)** Concentración de IL-1 β luego de 24 h de cultivo. UNS: no tratado. 10, 100 y 1000 ng: Cantidad de enzima recombinante colocada por pocillo. LPS: control con 1 μ L de LPS 1 μ g/mL. Se realizó una única medida tanto para la condición sin tratamiento (UNS) como para el tratamiento con LPS.

Comparando los resultados que se muestran en las Fig. 4.4.1A y 4.4.1B, podemos notar que no se obtuvieron resultados contundentes, que mostrasen un perfil claro de aumento o disminución de las citoquinas evaluadas.

Los valores en concentración de IL-6 para 24 h son bastante mayores a los obtenidos para 48 h, a no ser por el caso de la condición de rPOPTc80 y rOPB en una cantidad de 100 ng que pareciera mantenerse.

Con respecto a la IL-1 β , podemos observar en la Figura 4.4.1C que la concentración de dicha citoquina aumenta a medida que crece la cantidad de rOPB agregada, superando el valor alcanzado por el control con LPS para el valor de 1000 ng de enzima recombinante. Lo mismo sucede para el caso de rOPTb; en este caso el aumento es menos marcado, sin llegar a alcanzar los valores de IL-1 β registrados para el control de LPS. Los datos no permiten establecer una relación clara entre la cantidad de citoquina producida y el agregado de rPOPTc80.

5 – DISCUSIÓN

Con respecto a los resultados obtenidos a partir de la SDS-PAGE, realizada con cada una de las fracciones resultantes de la cromatografía de afinidad, podemos notar que en la Fig. 4.1.1B comenzamos a percibir la presencia de la enzima recombinante de interés a partir del carril 5, correspondiente a la fracción recogida luego del agregado del *washing buffer*. Cabe destacar que este *buffer* tiene una concentración de imidazol 10 veces menor a la del *elution buffer* (20mM contra 200mM, respectivamente), por lo que, seguramente, la interacción entre la columna y el *tag* de histidina de la enzima rLAPTc2 fuese menos fuerte de manera que menores concentraciones de imidazol hayan logrado desplazar dicha interacción, resultando en una elución más temprana.

Analizando la Fig. 4.1.1C, podemos notar que no se ven bandas para las distintas fracciones eluidas en la columna. Sí se observa un patrón de bandas característico en el carril 1, propio de un extracto total proveniente de un lisado celular, pero pareciera ser que no existe ninguna proteína en ese lisado que contenga un *tag* de histidina que le permita unirse a la columna de afinidad. La razón de esto podría deberse a que el plásmido utilizado en la transformación de las bacterias contuviese un error en la secuencia codificante de la proteína de interés, rLAPTc1, de manera que el producto generado en la traducción fuese no funcional, o tuviese un codón STOP prematuro que haya determinado la ausencia de expresión de la proteína. Sería primordial secuenciar el plásmido en la región de interés, utilizando primers específicos para las regiones flanqueantes, de manera de poder asegurarnos si una alteración en la secuencia podría ser el causante de la anomalía observada a nivel de la expresión de la proteína.

Otra posible explicación podría tener en cuenta los niveles de expresión alcanzados para el cultivo bacteriano en cuestión. Podría tratarse de una inducción poco eficaz que haya rendido un total de proteína de interés que no fuese detectable por una tinción con Azul de Coomassie, por lo que se podría haber recurrido a una tinción un tanto más sensible, como ser la tinción del gel con nitrato de plata, e incluso realizar un *western blot* utilizando un anticuerpo específico

que aumentase aún más la sensibilidad de la técnica y permitiera detectar niveles de proteína considerablemente más bajos.

Al analizar la Fig. 4.1.2, mediante la cual se intentó estimar los PMs aparentes de las enzimas purificadas, se observa la presencia de bandas demasiado gruesas como para permitir una correcta estimación. Sería necesario repetir el análisis electroforético sembrando menores cantidades de las enzimas de manera de obtener bandas más estrechas y conseguir de esta forma mayor precisión.

En cuanto a los resultados de los ensayos de actividad enzimática, podemos notar que al momento de realizarlos no se conocía la concentración real de las enzimas de interés en las muestras. El procedimiento de obtención de las muestras consistió en recolectar las fracciones eluidas que por SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie habían mostrado presencia única o principal de la enzima de interés, y luego un paso de concentración de las muestras tal como se explicó en la sección materiales y métodos. El hecho de haber utilizado volúmenes de 1 o 5 μL de muestra para los ensayos de actividad enzimática no habla necesariamente de una mayor actividad de rPOPTc80 (enzima colocada en una cantidad de 1 μL), sino que puede deberse a que se encontrara más concentrada en la muestra. Para tener resultados comparables se tendría que haber realizado la cuantificación de proteínas por cualquiera de los varios métodos existentes y proceder al sembrado de una misma cantidad en un volumen final de 100 μL de manera de haber enriquecido la discusión. A partir de lo realizado en este trabajo, solamente se puede hablar de actividad o inactividad de una enzima dada.

Sorprendentemente, y tal como se observa en la Fig. 4.2.1C, el uso de un *kit* de lisis bacteriana basado en la lisis alcalina como es el *BugBuster® Master Mix* (Novagen), pareciera resultar en una pérdida de la actividad enzimática. Lo extraño de esta situación es que este *kit* está principalmente indicado para protocolos de lisis que busquen realizar ensayos de actividad enzimática de la proteína de interés. Sin embargo los datos no son determinantes, ya que el experimento se realizó una única vez al haber resultado exitosa la lisis por sonicado. De esta forma, y en caso de querer estar seguros de que la falta de actividad de la enzima de interés era

consecuencia del uso de dicho *kit*, se podría haber procedido con la repetición de los experimentos.

A su vez, para tener una mejor idea de la actividad propia de las enzimas y poder comparar los resultados obtenidos, se tendrían que haber expresado los valores en unidades de actividad específica, de manera que se tuvieran en cuenta los μ moles de enzima adicionada en el ensayo

Los resultados mostrados en la Fig. 4.3.1 muestran cómo fue posible el marcaje de los cuerpos lipídicos mediante la tinción con el colorante *Oil Red*, para proceder a su recuento, mostrado mediante el gráfico de barras de la Fig. 4.3.2. Claramente hay una relación que es significativa entre la cantidad de enzima recombinante adicionada y los niveles de producción de cuerpos lipídicos por parte de los macrófagos. Los macrófagos son la primer línea de defensa en una infección por *T. cruzi*; sobre-expresan COX-2² y producen altos niveles de PGE₂, a partir del ácido araquidónico almacenado en los cuerpos lipídicos. Los cuerpos lipídicos son fuente de estas moléculas, por lo que se podría vincular su aumento a una síntesis aumentada de PGE₂ y una mayor expresión de COX-2 por parte de los macrófagos. Para confirmar esto se podrían incluir experimentos diseñados para marcar exclusivamente COX-2 o PGE₂ en ensayos de co-localización con marcadores específicos de cuerpos lipídicos y evaluar el tipo de localización a nivel intracelular así como si los niveles están o no aumentados. Adicionalmente, se ha descrito que la inducción del aumento en el número de cuerpos lipídicos está dada por un mecanismo dependiente del *Toll-like Receptor 2* (TLR2)⁴³.

Debemos tener en cuenta que en la mayor parte de los trabajos, los resultados observados que constatan un aumento de los cuerpos lipídicos en infecciones con *T. cruzi*, se realizan, en general, a partir del tratamiento de las células con parásitos vivos, enteros, y, en algunos casos, con un lisado de parásitos. En nuestro caso estamos utilizando una única enzima. El factor de virulencia OPB se caracteriza por favorecer la entrada del parásito en la célula del huésped. Se encuentra tanto a nivel de la superficie celular como en la vecindad del parásito ya que puede ser liberada. Las concentraciones que se pueden alcanzar en condiciones fisiológicas no serían las analizadas en estos experimentos, sin embargo el hecho de observar que rOPB aumente

considerablemente los niveles de cuerpos lipídicos contados a nivel intracelular podría dar cuenta del rol que podría tener en situaciones fisiológicas. A su vez, se podría haber incluido un control de exclusividad del efecto, tratando las células con cualquier otra proteasa, de manera de asegurarnos que lo observado es propio de la enzima rOPB.

En un contexto fisiológico, en modelos más robustos de infección por *T. cruzi*, un aumento exacerbado de cuerpos lipídicos, traducido a un aumento en la cantidad de PGE₂ producida, cumple un efecto de modulación negativa en la actividad de los macrófagos². Hay una reducción en la secreción de citoquinas proinflamatorias, disminución de la presentación antigénica y disminución en la producción de radicales libres, todo lo cual favorece la infección y replicación del parásito. Teniendo en cuenta el rol que cumple la enzima OPB en la inducción de la síntesis de estos organelos, podría pensarse una estrategia en donde atacar la enzima y reducir sus niveles perjudique la sobrevivencia del parásito en el hospedero al favorecer la puesta en marcha de una respuesta inmune primaria más potente.

Con respecto a los valores de producción de citoquinas obtenidos por el método de ELISA, cabe mencionar que la elección de las citoquinas cuantificadas se basó en el interés por vincular la respuesta de las células en términos de producción de cuerpos lipídicos, con citoquinas de carácter pro-inflamatorio. Tanto para IL-1 β generada a partir del tratamiento por 24 h con rOPTb y rOPB, como para IL-6 generada a partir del tratamiento por 24 y 48 h con rOPTc80, se puede decir que los mismos deberían ser contrastados con los valores obtenidos al tratar las células con las mismas enzimas pero libres de endotoxinas bacterianas propias del lisado bacteriano del cual derivan. En la superficie de una célula bacteriana encontramos varias moléculas con capacidad de actuar como endotoxinas, como ser el LPS, e inducir, por sí mismas, la producción de citoquinas pro-inflamatorias⁴⁴. Al expresar proteínas recombinantes en cultivos bacterianos, pese a que realizamos etapas de purificación específicas, puede darse que queden algunas de estas endotoxinas asociadas a nuestras moléculas de interés, y que el efecto final observado no se deba a la acción propia de la enzima recombinante, sino a ese grupo de otras moléculas bacterianas adicionadas. Existen varios métodos por los cuales podemos deshacernos de dichas endotoxinas como ser la cromatografía de intercambio aniónico, si es

que nos aseguramos que nuestra molécula de interés no esté igualmente cargada que el LPS. El LPS tiene carga negativa, por lo que se unirá a un intercambiador aniónico. Este procedimiento puede ser aplicable siempre y cuando nuestra molécula de interés presente una diferencia de carga considerable en comparación con el LPS, por ejemplo, sea positiva. A su vez, se puede recurrir a la destilación o ultrafiltración para el caso de proteínas pequeñas si es que queremos deshacernos de grandes agregados de endotoxinas ⁴⁴, así como a la cromatografía de afinidad utilizando L-histidina, poli-L-lisina, poli-(γ -metilglutamato), etc. El método de elección dependerá pura y exclusivamente de las características de la proteína blanco.

Intentando relacionar los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de citoquinas con los obtenidos para el recuento de cuerpos lipídicos, podemos observar que los niveles de IL-6, una de las principales citoquinas pro-inflamatorias, disminuyen tanto para la condición de 24 como la de 48 h, si los comparamos con los registrados para las células sin tratar, cuando nos referimos a la enzima rOPB, así como lo hacen los niveles de IL-1 β en el caso de las células tratadas con rPOPTc80 por 24 h. Esto puede deberse a lo mencionado anteriormente: un aumento en la cantidad de cuerpos lipídicos podría tener un efecto inmunomodulador en la actividad de los macrófagos, lo que se vería reflejado en una disminución en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias.

En los casos en que no logra observarse una tendencia entre las distintas concentraciones de trabajo para cada una de las enzimas recombinantes utilizadas en el tratamiento, o en aquellos casos donde los resultados parecen no poder ser correlacionados unos con otros, podemos decir que podrían haberse realizado más ensayos de tipo ELISA que ayudasen a confirmar lo observado.

Sin embargo, teniendo en cuenta el rol que cumple la POP a nivel fisiológico, podría ser esperable que no se encontraran modificaciones a nivel de la cantidad de cuerpos lipídicos producidos en los macrófagos como en los niveles de citoquinas secretadas ya que su principal rol, tal como se describió en la introducción, sería el de degradar los polímeros que constituyen la matriz extracelular para facilitar la invasión en células no fagocíticas.

Los resultados obtenidos en este trabajo señalan una ruta en la que investigadores de todo el mundo ya han incursionado. Los parásitos se caracterizan por contar con una infinidad de mecanismos que les permiten evadir, entre otras cosas, las respuestas inmunes generadas por el hospedero. Conocer esos blancos moleculares para atacarlos puede suponer una ventaja en la lucha contra las enfermedades causadas por estos parásitos. En este caso concreto, se podría pensar en estas enzimas como blancos de drogas que apunten a inhibir o disminuir su acción, de manera de inclinar la balanza en favor del hospedero a la hora de montar una respuesta inmune que resulte en la erradicación del parásito, donde la puesta en marcha de señales pro-inflamatorias y que permitan el reclutamiento de células del sistema inmune no se vea regulada negativamente.

6 – CONCLUSIONES

De acuerdo a lo planteado en los objetivos, se lograron expresar y purificar tres de las cuatro enzimas de tripanosomátidos: rPOPTc80, rPOPTb y rLAPTc2, todas funcionalmente activas (capaces de fragmentar sus sustratos blanco, tal como revelaron los ensayos de actividad enzimática).

Se pudieron establecer los cultivos de macrófagos peritoneales murinos de la línea J774, los cuáles fueron tratados con las enzimas purificadas: rPOPTc80 y rPOPTb y con rOPB, esta última previamente generada en el laboratorio a partir del trabajo de otro estudiante. Se midieron los niveles de producción de IL-6 e IL-1 β por parte de las células tratadas, con cada una de las enzimas, obteniendo resultados que no son categóricos pero que sí muestran un claro aumento en la concentración de IL-1 β luego del tratamiento con rPOPTb y rOPB por 24 h.

Finalmente, y pese a que los resultados obtenidos no permitieron obtener conclusiones contundentes, cabe destacar la enormidad de técnicas puestas a punto durante este trabajo, como ser: la transformación de cepas de bacterias competentes con la posterior inducción de la expresión de las proteínas de interés en aquellas colonias seleccionadas como positivas, la purificación por técnicas cromatográficas de dichas proteínas de interés, la puesta a punto de ensayos de análisis de actividad enzimática por métodos fluorimétricos, la identificación de las proteínas purificadas por electroforesis de tipo SDS-PAGE y posteriores análisis por *western blot*, el manejo de técnicas de cultivo celular para los ensayos de producción de citoquinas, los cuales requirieron de la cuantificación de las mismas por la técnica de ELISA y el preparado de láminas para una posterior tinción que permitiese evaluar la cantidad de cuerpos lipídicos en el interior celular por análisis microscópico.

Sin duda el trabajo deja abiertas varias vías por las que se podría continuar. Por ejemplo, podrían analizarse los niveles de cuerpos lipídicos para las enzimas restantes (rPOPTc80 y rPOPTb). También podría ampliarse el panel de citoquinas analizadas por ELISA, incluyendo citoquinas anti-inflamatorias como ser IL-10 o TGF- β para confirmar o no el rol

inmunomodulador de estas enzimas. Seguidamente, se podría evaluar la capacidad infectiva de parásitos con niveles de expresión disminuidos de estas enzimas o generar anticuerpos específicos que permitan bloquear su acción actuando tanto de manera profiláctica como terapéutica.

7 – BIBLIOGRAFÍA

1. Coura, J. R. & Borges-Pereira, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **45**, 286–296 (2012).
2. D’Avila, H., Toledo, D. A. M. & Melo, R. C. N. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-Trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. *Mediators Inflamm.* 1–11 (2012). doi:10.1155/2012/478601
3. Barrett, M. P. *et al.* The trypanosomiasis. *Lancet* **362**, 1469–1480 (2003).
4. Cuervo, P., Domont, G. B. & De Jesus, J. B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J. Proteomics* **73**, 845–867 (2010).
5. Botoni, F. a *et al.* Treatment of Chagas cardiomyopathy. *Biomed Res. Int.* **849504**, 1–9 (2013).
6. Barrett, A. J. & McDonald, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem. J.* **237**, 935 (1986).
7. Puente, X. S., Sánchez, L. M., Overall, C. M. & López-Otín, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 544–558 (2003).
8. Dos Santos, A. L. S., Soares, R. M. D. A., Alviano, C. S. & Kneipp, L. F. Heterogeneous production of metallo-type peptidases in parasites belonging to the family Trypanosomatidae. *Eur. J. Protistol.* **44**, 103–113 (2008).
9. Chapman, H. A., Riese, R. J. & Shi, G. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 63–88 (1997).
10. Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T. & Cazzulo, J. J. The peptidases of Trypanosoma cruzi: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 195–206 (2012).
11. Troeberg, L. *et al.* Proteases from Trypanosoma brucei brucei. Purification, characterisation and interactions with host regulatory molecules. *Eur. J. Biochem.* **238**, 728–736 (1996).
12. Grab, D. J. *et al.* Protease activated receptor signaling is required for African trypanosome traversal of human brain microvascular endothelial cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e479 (2009).

13. Seemiiller, E., Lupas, A., Zihl, F., Zwickl, P. & Baumeister, W. The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **359**, 173–178 (1995).
14. Fujinaga, M., Cherney, M. M., Oyama, H., Oda, K. & James, M. N. G. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3364–3369 (2004).
15. Polgár, L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. life Sci.* **62**, 2161–2172 (2005).
16. Matthews, D. A., Alden, R. A., Birktoft, J. J., Freer, S. T. & Kraut, J. Re-examination of the Charge Relay System in Subtilisin and comparison with Other Serine Proteases. *J. Biol. Chem.* **252**, 8875–8883 (1977).
17. Tetaert, D., Soudan, B., Huet-Duvillier, G., Degand, P. & Boersma, A. Unusual cleavage of peptidic hormones generated by trypanosome enzymes released in infested rat serum. *Int. J. Pept. Protein Res.* **41**, 147–152 (1993).
18. Rawlings, N. D., Polgár, L. & Barrett, A. J. A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochem. J. Lett.* **279**, 907–908 (1991).
19. Fülöp, V., Böcskei, Z. & Polgár, L. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* **94**, 161–70 (1998).
20. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. *Families of serine peptidases.* **244**, 19–62 (1994).
21. Shan, L. *et al.* Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* **297**, 2275–2279 (2002).
22. Bastos, I. M. D. *et al.* Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem. J.* **388**, 29–38 (2005).
23. Santana, J. M., Bastos, I. M. D., Dubost, L., Augustyns, K. & Grellier, P. Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. *Microbes Infect.* **12**, 457–466 (2010).
24. Santana, J. M., Grellier, P., Rodier, M.-H., Schrevel, J. & Teixeira, A. Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1466–1473 (1992).
25. Cazzulo, J. J. Proteinases of *Trypanosoma Cruzi* : Potential Targets for the Chemotherapy of Chagas Disease. 1261–1271 (2002).

26. Morty, R. E., Lonsdale-eccles, J. D., Mentele, R., Auerswald, E. A. & Coetzer, T. H. T. Trypanosome-Derived Oligopeptidase B Is Released into the Plasma of Infected Rodents, Where It Persists and Retains Full Catalytic Activity. *Infect. Immun.* **69**, 2757–2761 (2001).
27. Burleigh, B. A. & Andrews, N. W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺-signaling factor for mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 5172–5180 (1995).
28. Rodriguez, A., Rioult, M. G. & Ora, A. A Trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, Intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell Biol.* **129**, 1263–1273 (1995).
29. Matsui, M., Fowler, J. H. & Walling, L. L. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* **387**, 1535–44 (2006).
30. Beninga, J., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Interferon- γ can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* **273**, 18734–18742 (1998).
31. Cappiello, M. *et al.* Metal ion substitution in the catalytic site greatly affects the binding of sulfhydryl-containing compounds to leucyl aminopeptidase. *Biochemistry* **45**, 3226–3234 (2006).
32. Bozza, P. T., Magalhães, K. G. & Weller, P. F. Leukocyte lipid bodies — Biogenesis and functions in inflammation. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 540–551 (2009).
33. Melo, R. C. N. *et al.* Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function and current imaging techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 540–556 (2011).
34. Melo, R. C. N., D’Avila, H., Bozza, P. T. & Weller, P. F. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol. Biol.* **689**, 149–161 (2011).
35. Rimoldi, M. T. *et al.* Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 193–7 (1988).
36. Fishelson, Z. Complement evasion by parasites: search for “Achilles” heel. *Clin. Exp. Immunol.* **86**, 47–52 (1991).
37. Hall, B. F. & Joiner, K. A. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Immunol. Today* **12**, 23–27 (1991).

38. Capron, A. & Dessaint, J. P. Molecular basis of host-parasite relationship: towards the definition of protective antigens. *Immunol. Rev.* **112**, 27–48 (1989).
39. Petray, P., Rottenberg, M. E., Grinstein, S. & Örn, A. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **16**, 193–199 (1994).
40. Fernandez-Gomez, R., Esteban, S., Gomez-Corvera, R., Zoulika, K. & Ouaisi, A. *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J. Immunol.* **160**, 3471–3479 (1998).
41. Ouaisi, A. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* **168**, 6366–6374 (2002).
42. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130 (1986).
43. D’Avila, H. *et al.* Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. *J. Infect. Dis.* **204**, 951–961 (2011).
44. Magalhães, P. O. *et al.* Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **10**, 388–404 (2007).
45. Bastos, I. M. D., Motta, F. N., Grellier, P. & Santana, J. M. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease, Leishmaniasis and African trypanosomiasis. 3103–3115 (2013).

