



Posgrado en Biotecnología: Tesis de Doctorado en Biotecnología

Desarrollo de sensores basados en proteínas fluorescentes para la detección no invasiva y dinámica de cambios redox y nucleótidos cíclicos en tripanosomátidos

Estudiante: Msc. María Florencia Sardi Piano

Tutor: Dr. Marcelo Comini

Co-tutor: Dr. Sergio Pantano

Instituto Pasteur de Montevideo

Tribunal de defensa: Dra. Ana Denicola, Dra. María Ana Duhagon y Dr. Guillermo Alonso

Abril 2025

Agradecimientos

Esta tesis se la dedico a mi familia, en especial a mi esposo, que me ha brindado un apoyo inmenso para poder hoy estar entregando el manuscrito de tesis y poder finalizar esta etapa tan importante en mi vida y que me llena de mucho orgullo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Marcelo por todos los años de trabajo junto en el laboratorio y en el Instituto. Agradecerle todas las oportunidades de formación y capacitación, así como por entender diferentes situaciones que se nos presentan y poder dar el soporte necesario para poder avanzar. Más vale tarde que nunca, como dicen por ahí...

Me gustaría agradecer a Sergio por haber participado como Co-tutor de tesis y haber brindado su conocimiento y a su equipo para poder enriquecer las discusiones, proponer diferentes hipótesis y aportarle el toque bioinformático al trabajo.

Me gustaría agradecer a todos mis compañeros del Laboratorio de Biología redox de tripanosomátidos, aquellos desde el principio, allá por el año 2012, como también a los que estuvieron y se fueron en el correr de los años, en mayor o menor medida siempre cada integrante tiene su aporte en el trabajo de tesis de uno, desde lo emocional/anímico hasta lo técnico.

Me gustaría agradecer a todas las demás personas del Instituto que participaron en el desarrollo del proyecto de tesis, a la UBC, a ProTeMCA, a la UPR y a la UATE.

Finalmente agradecer al tribunal por su tiempo, amabilidad y disposición para y con la propuesta de tesis de doctorado.

Resumen

La gran mayoría de los procesos celulares como por ejemplo, la síntesis de proteínas, el metabolismo energético, el ciclo celular, la proliferación, diferenciación y muerte, están sujetos a regulación mediante mecanismos que involucran a iones y diferentes biomoléculas relacionadas el metabolismo energético (ATP, nucleótidos cíclicos) y redox (NADPH, tioles de bajo peso molecular). Descubrimientos recientes han demostrado que estas vías de señalización operan de manera dinámica y cruzada para lograr un control fino de la respuesta celular. Por lo tanto, el monitoreo en tiempo real y de manera no invasiva de estas señales representa un desafío biotecnológico importante, ya que estas herramientas permitirían identificar blancos moleculares y estrategias de intervención sobre funciones celulares específicas.

El descubrimiento y la caracterización bioquímica y estructural de las proteínas fluorescentes, permitió manipular genéticamente las mismas para convertirlas en sensores con alta especificidad para traducir señales del entorno (desde pH y temperatura a metabolitos específicos) principalmente por cambios en su espectro de fluorescencia. Con la finalidad de diseñar biosensores capaces de detectar cambios redox y niveles de nucleótidos cíclico en tripanosomátidos, se propone el desarrollo de un biosensor con corrimiento espectral hacia el rojo (rxmRuby2), que permita el monitoreo dinámico y no invasivo del estado redox intracelular, con aplicaciones en imagenología *in vivo* y compatibilidad con otros fluoróforos, y se propone el desarrollo de un biosensor FRET que detecte simultáneamente cambios redox y AMPc (INF-RXM).

Los ensayos *in vitro* e *in vivo* demostraron que el biosensor rxmRuby2 permite detectar cambios redox intracelulares en *T. brucei*, equilibrándose con el par $TS_2/T(SH)_2$ y evidenciando estrés oxidativo en parásitos aislados de sangre. La generación de una variante ratiométrica no fue lograda, pero la línea reportera desarrollada tiene gran potencial para estudiar la biología de tripanosomátidos e identificar nuevos blancos terapéuticos en combinación con otros biosensores.

El desarrollo de un sensor dual estuvo basado en el par Clover/rxmRuby2, con mejor relación señal/ruido y compatibilidad espectral (INF-RXM). Se logró expresar y purificar la forma soluble del biosensor en *E. coli*, aunque con baja eficiencia y pérdida de fluorescencia de rxmRuby2, posiblemente por cambios conformacionales que afectan su cromóforo. Se logró validar la funcionalidad del sensor dual en *Leishmania tarentolae*, permitiendo la detección de cambios redox y de AMPc. Experimentos con el inhibidor de fosfodiesterasas ACG 29.3 confirmaron la producción basal de AMPc en *L. tarentolae* y validaron el modo de acción del compuesto. Se comprobó que forskolina e IBMX no inducen acumulación de AMPc en *Leishmania*, reafirmando diferencias en la regulación de este nucleótido entre tripanosomátidos y mamíferos.

En este contexto, los sensores fluorescentes genéticamente codificados constituyen instrumentos muy potentes para seguir la evolución espacio-temporal de manera no invasiva de la dinámica de eventos moleculares que ocurren *in vivo*.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Vías de señalización celulares	7
1.1.1 Defensa antioxidante <i>versus</i> señalización redox	8
1.1.2 Señalización por AMPc/ GMPc	12
1.1.3 Interacción entre vías de señalización redox y vías de señalización por AMPc/GMPc.	21
1.2 Estudio de la vía de señalización redox	22
1.2.1 Limitaciones de los métodos convencionales para detectar especies redox activas	22
1.2.1.1 Propiedades de las Proteínas Fluorescentes redox sensibles	23
1.2.1.2 Sensores redox fluorescentes con corrimiento espectral hacia el rojo.	31
1.3 Estudio de la vía de señalización por AMPc/GMPc	35
1.3.1 Métodos de detección de AMPc/GMPc.	35
1.3.2 Sensores FRET para detección de AMPc/GMPc	35
1.4 Aplicaciones de los sensores redox y de AMPc en procesos biológicos.	46
1.5 Tripanosomátidos como modelo de estudio de la interacción de vías de señalización redox y de AMPc.	52
1.5.1 <i>Tripanosoma brucei</i> , <i>Tripanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania</i> spp.: Consideraciones generales y ciclo de vida	52
1.5.2 Metabolismo redox y señalización redox de Tripanosomas	55
1.5.3 Señalización de AMPc en Tripanosomátidos.	58
2. OBJETIVO	66
2.1 Objetivo específico 1: Desarrollo de un sensor redox con corrimiento espectral hacia el rojo.	66
2.2 Objetivo específico 2: Desarrollo de un sensor basado en el fenómeno de FRET capaz de detectar GMPc.	67
2.3 Objetivo específico 3: Desarrollo de un sensor dual con corrimiento al rojo basado en el fenómeno FRET capaz de detectar en simultáneo homeostasis redox y nivel de AMPc.	67
3. MATERIALES Y MÉTODOS	68
3.1. Reactivos y Fungibles	68
3.2. Métodos de biología molecular	68
3.2.1. Diseño y preparación de vectores de expresión de los sensores rxmRuby2 y hGrx1-rxmRuby2 en <i>Escherichia coli</i> y tripanosomátidos.	68

3.2.2. Diseño y preparación de vectores de expresión del sensor FRET (CFP/YFP) de GMPC y su variante redox sensible.	70
3.2.3. Diseño y preparación de vectores de expresión del sensor FRET (Clover/mRuby2) de AMPc y su variante redox sensible.	71
3.2.4. Amplificación, purificación y secuenciación de plásmidos y vectores	72
3.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	73
3.3.1. rxmRuby2	73
3.3.2. Sensor FRET de GMPC: CFP-GMPC-YFP (CUTie2) y sensor dual CFP-GMPC-rxYFP (rxCUTie2)	75
3.3.3. Sensor dual FRET y redox: Clover-AMPc-rxmRuby2 (INF-RXM)	76
3.4. Técnicas analíticas	77
3.4.1. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida/poliacrilamida	77
3.4.2. Cuantificación de proteínas	77
3.4.3. Cuantificación de tioles	78
3.4.4. Titulación de pH	78
3.4.5. Determinación del potencial redox	78
3.5. Espectrofluorimetría	80
3.5.1. Sensor rxmRuby2	80
3.5.2. Sensor CUTie2	81
3.5.3. Sensor rxCUTie2	81
3.6. Cultivos Celulares	82
3.6.1. Cultivo de <i>T. cruzi</i>	82
3.6.2. Nucleofección de la forma epimastigota de CL-Brener <i>T. cruzi</i>	83
3.6.3. Cultivo de <i>Leishmania tarentolae</i> .	84
3.6.4. Nucleofección de la forma promastigota de <i>L. tarentolae</i> .	85
3.6.5. Cultivo de <i>T. brucei</i>	85
3.6.6. Nucleofección de la forma infectiva de <i>T. brucei brucei</i>	86
3.7. Ensayos de FRET en parásitos promastigotes <i>L. tarentolae</i> INF-RXM	87
3.8. Citometría de flujo	87
3.9. Microscopía de fluorescencia	89
3.10. Infección de ratones BALB/cJ con <i>T. brucei brucei</i> hGrx-rxmRuby2	90
3.11. Programas computacionales	91
3.11.1. Base de datos	91
3.11.2. Procesamiento de datos e imágenes	91
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93

4.1. Objetivo específico 1: Sensor redox rxmRuby2	93
4.1.1. Diseño molecular y generación de la proteína rxmRuby2.	93
4.1.2. Expresión y purificación de la proteína rxmRuby2	94
4.1.3. Caracterización in vitro del sensor rxmRuby2 a diferentes estímulos redox.	97
4.1.4. Generación de una línea celular de <i>T. brucei</i> reportera del estado redox de tioles de bajo peso molecular.	103
4.1.5. Caracterización de la línea reportera hGrx-rxmRuby2 de <i>T. brucei</i> .	105
4.1.6. Análisis comparativo de respuesta a diamida de líneas reporteras hGrx-roGFP2 y TXN-roGFP2 de <i>T. brucei</i> .	108
4.1.7. Desempeño in vivo de la línea reportera <i>T. brucei</i> hGrx-rxmRuby2	111
4.1.8. Conclusiones objetivo específico 1	115
4.2. Objetivo específico 2: Biosensor dual redox y de GMPc, CFP-GMPc-rxYFP (rxCUTie2)	119
4.2.1. Diseño molecular y generación del biosensor CUTie2	119
4.2.2. Expresión y purificación del sensor CUTie2	121
4.2.3. Caracterización in vitro del biosensor CUTie2.	123
4.2.4. Diseño del biosensor dual (redox y cGMP) rxCUTie2	126
4.2.5. Expresión y purificación del biosensor rxCUTie2	127
4.2.6. Caracterización in vitro de la funcionalidad del biosensor rxCUTie2 a estímulos redox y nucleótido cíclico.	133
4.2.7. Generación de líneas celulares de <i>T. brucei</i> y de <i>T. cruzi</i> que expresen el biosensor rxCUTie2	140
4.2.8. Conclusiones objetivo específico 2	143
4.2.9. Anexo	146
4.3. Objetivo específico 3: Biosensor dual redox y de AMPc, Clover-AMPc-rxmRuby2 (INF-RXM)	147
4.3.1. Diseño molecular y generación del biosensor Clover-AMPc-rxmRuby2	147
4.3.2. Expresión y purificación del sensor Clover-AMPc-rxmRuby2	148
4.3.3. Generación de líneas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> , y de <i>Leishmania tarentolae</i> reporteras del biosensor Clover-AMPc-rxmRuby2.	164
4.3.4. Caracterización biológica de la línea reportera de <i>L. tarentolae</i> INF-RXM.	169
4.3.5. Conclusiones objetivo específico 3	182
5. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	186
6. BIBLIOGRAFÍA	195

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Vías de señalización celulares

A nivel celular, todos los organismos vivos están continuamente intercambiando información y energía tanto con el medio que los rodea como internamente (inter-organelas). Entre las vías de señalización que operan dichos mecanismos de comunicación y que resultan comunes a todos los tipos celulares se destacan aquellas que implican: i) la química del ATP, asociada a producción de energía y señalización por eventos de fosforilación/desfosforilación, etc; ii) las reacciones de oxido-reducción (redox) que involucran intercambios tiol/disulfuro, iii) y las relacionadas a la apertura de canales de calcio (**Figura 1**).

En todos los sistemas biológicos, diferentes reacciones de oxidación-reducción permiten generar energía para realizar trabajo osmótico, electroquímico y anabólico (síntesis). Los gradientes de concentración iónicos y moleculares de transmembrana también son generadores de potencial energético. La señalización celular al igual que la regulación metabólica involucra mecanismos de control dependientes de estas fuentes de energía. Esto implica la participación de quinasas/fosforilasas (nucleótidos), oxido-reductasas y tioles de bajo peso molecular (reacciones de oxidación-reducción de cisteínas) y flujo de iones a través de membranas biológicas (Ca^{2+} , Na^+/K^+).

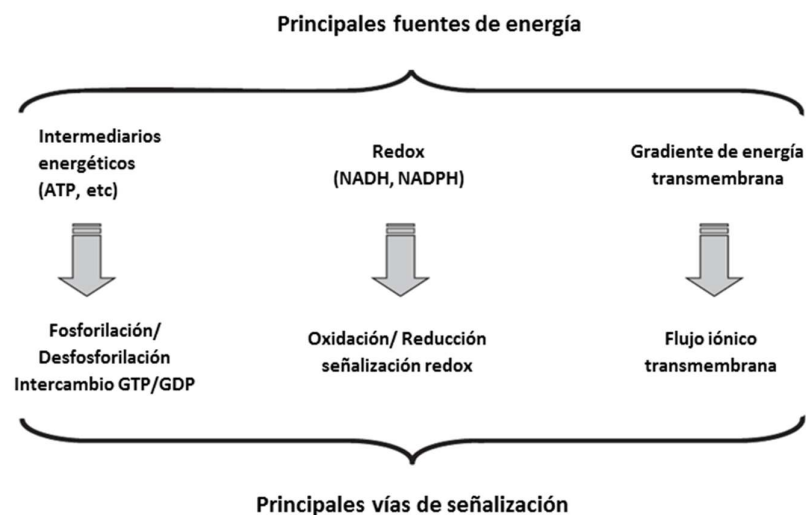


Figura 1. Principales mecanismos de señalización celular. Tomado y modificado de (Jones, 2010)

1.1.1 Defensa antioxidante *versus* señalización redox

Los organismos aerobios utilizan oxígeno (O_2) para la oxidación de nutrientes (fundamentalmente glúcidos y aminoácidos) que mediante una serie de reacciones catabólicas generan energía en la forma de ATP, NADH y NADPH. Estas moléculas alcanzan concentraciones mM en las células y son la “moneda” energética que abastecerá distintas funciones celulares. La utilización del O_2 implica un riesgo para las células ya que su reducción parcial da lugar a la formación de diferentes especies reactivas (EROs: especies reactivas del oxígeno) como el radical aniónico superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Además, en combinación con el óxido nítrico (NO), el $O_2^{\cdot-}$ puede dar lugar a la formación del peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), una especie reactiva del nitrógeno generada por células del sistema inmune en condiciones fisiológicas de defensa contra patógenos (Imlay, 2003). Todas estas especies presentan una alta reactividad contra diferentes biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, azúcares, etc) siendo capaces de producir su oxidación o modificación irreversible. Por lo tanto, la acumulación de estas especies tiene graves consecuencias funcionales para la célula (Cabiscol, 2000). Por ejemplo, la reacción de los radicales libres y peróxidos con los ácidos grasos poli-insaturados de membranas biológicas da lugar a la peroxidación de lípidos. El primer efecto de esta peroxidación es la disminución de la fluidez de las membranas, alterando las propiedades de éstas así como la función de diferentes proteínas de membrana. La formación de radicales lipídicos tiene un fuerte efecto amplificador de la generación de nuevas especies radicalares que derivan en la degradación de los ácidos grasos poli-insaturados a una variedad de productos. Algunos de ellos, como por ejemplo los aldehídos, son grupos altamente electrofílicos que reaccionaran o modificaran de manera irreversible distintas biomoléculas. Por otra parte, los EROs pueden reaccionar tanto contra las bases nitrogenadas como contra los azúcares el ADN, lo cual da lugar a la ruptura de enlaces moleculares simples o dobles, a la formación de aductos entre las bases y azúcares y al entrecruzamiento con otras moléculas. Estas modificaciones químicas suelen ser irreversibles e implican un bloqueo del proceso de replicación del material genético. Por último, el ataque de especies oxidantes a las proteínas incluye la oxidación de grupos sulfhidrilo, la modificación de grupos prostéticos o *clusters* de metal, y el entrecruzamiento entre polipéptidos o la fragmentación peptídica, entre otras (Cabiscol, 2000).

El contenido de EROs es controlado tanto a nivel de su producción y por sistemas dedicados a su neutralización. La producción está intrínsecamente ligada al estado metabólico y necesidades funcionales de las células. La degradación de EROs es llevada a cabo por enzimas con una alta eficiencia y selectividad que incluyen a diferentes tipos de peroxidasas,

superóxido dismutasas, glioxalastas y S-transferasas. Varias de estas proteínas emplean residuos de cisteína o seleno-cisteína (ej. peroxidasas y S-transferasas) para catalizar la conversión de EROs a especies de nula o menor reactividad. A su vez, el funcionamiento de estas enzimas y rutas catabólicas depende de la provisión de poder reductor aportado por dos grandes sistemas que son, en general, ubicuos a la mayoría de los organismos: el sistema de tiorredoxina (Trx) y el sistema de la glutarredoxina (Grx) y el glutatión (GSH). Por su alta concentración intracelular, también los tioles de bajo peso molecular contribuyen como amortiguadores de EROs.

Si la capacidad de neutralizar dichas especies se ve excedida, se genera lo que se conoce como “estrés oxidativo” cuyo efecto está asociado a la patogénesis de un amplio rango de enfermedades, como la inflamación, el daño isquémico de tejidos y desórdenes neurodegenerativos (Fujino G. , 2006). Si bien es cierto que a altas concentraciones los EROs producen daño oxidativo sobre diferentes moléculas, son varias las evidencias experimentales obtenidas en las últimas dos décadas que demuestran que, a bajas concentraciones, estas especies pueden actuar como señales que regulan la función de diferentes proteínas y procesos biológicos. En una vía de señalización tiol-disulfuro, el segundo mensajero es normalmente un oxidante de bajo peso molecular con la capacidad de difundir tanto en un medio acuoso como de permear membranas y modificar el estado redox de residuos de cisteínas en moléculas “sensoras”. Tomando esto en cuenta, y que los residuos de cisteína deberían estar parcialmente oxidados, las principales moléculas oxidantes responsables de desencadenar la vía de señalización son el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido, el óxido nítrico, el peroxinitrito y los lipoperóxidos. Estos oxidantes pueden inducir modificaciones reversibles de los tioles redox activos de las moléculas sensoras, como serían la S-nitrosilación, oxidación a ácido sulfénico y ácido sulfínico, o disulfuro (homo o mixto: por ej. glutathionilación; (Jones, 2010)). Como se observa en la **Figura 2**, la tiolación de cisteínas proteicas puede darse tanto por reacción entre un sulfhidrilo proteico parcialmente oxidado o por reacción de intercambio tiol/disulfuro.

El disulfuro mixto de GSH con tioles proteicos, denominado S-glutathionilación, es una modificación postraducciona l dinámica que además de prevenir la hiperoxidación (Barford, 2004) de residuos de cisteína modifica la accesibilidad, dinámica y polaridad del sitio/región de la proteína donde éste tiene lugar, impactando de esta forma en su funcionalidad. En sistemas biológicos, la S-glutathionilación ocurre principalmente por reacción del GSH libre con tioles proteicos que se encuentran como ácido sulfénico (**Figura 2**), amida sulfenilo, o intermediario de S-nitrosilo (Allen, 2012) (Dalle-Donne, 2011). En menor medida, la glutathionilación de

proteínas puede tener lugar por intercambio tiol/disulfuro catalizado o no por Grx. Por el contrario, las Grxs son altamente eficientes en facilitar la reacción reversa, la remoción del GSH del disulfuro mixto, conocida como actividad deglutathionilasa o deglutathionilación.

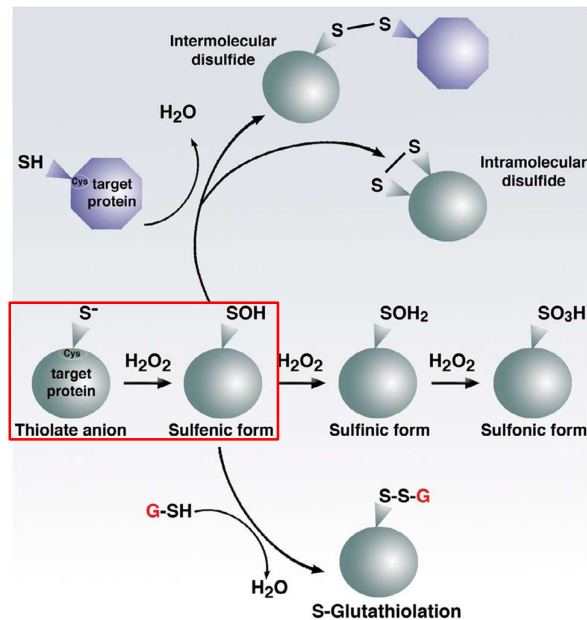


Figura 2. Señalización redox dependiente de la química del residuo de cisteína. Residuos de cisteína específicos presentes en proteínas blanco pueden ser modificados covalentemente por moléculas generadas durante condiciones de estrés oxidativo (ej. H₂O₂). De manera similar a la fosforilación en residuos de serina o treonina, alteraciones en el grupo tiol pueden modificar la actividad enzimática de una proteína. La oxidación a ácido sulfénico (SOH) es reversible y puede derivar en la formación de disulfuros intra- o inter-moleculares así como en la S-glutathionilación. Estados de mayor oxidación como el ácido sulfínico o sulfónico son generalmente irreversibles salvo por la sulfirredoxina, capaz de revertir este tipo de oxidación en peroxirredoxinas (Rhee, 2012). Tomado y modificado de (Finkel T., 2011).

Si bien son varias las proteínas que cuentan con residuos de cisteína, no todas ellas presentan las características adecuadas (ej. accesibilidad, reactividad, entorno electrostático) para reaccionar de manera competente y selectiva con EROs. En ese sentido, diferentes tipos de cisteína y seleno-cisteína peroxidasas califican como moléculas “sensores” altamente eficientes para detectar de manera específica diferentes tipos de hidroperóxidos (Paulsen, 2010) (Brigelius-Flohé, 2011). Estas peroxidasas pertenecen a la familia de las peroxirredoxinas (por ej. se describieron 6 isoformas en mamíferos) y de las peroxidasas dependientes del GSH. Se trata de proteínas abundantes que se distribuyen en distintos compartimentos subcelulares donde, además de brindar protección contra la acción de dichos oxidantes, pueden operar

como traductores de señal. Las distintas peroxirredoxinas muestran selectividad por hidroperóxidos inorgánicos o de ácidos grasos (Chae, 1994) (Kim, 1988) (Reyes, 2016) (De Armas, 2019) (Piñeyro, 2011), mientras que las glutatión peroxidasa tienen predilección por hidroperóxidos orgánicos (Fisher, 1999) (Diechtierow, 2011). La primera etapa del mecanismo de reducción de hidroperóxidos (señalado con marco rojo en la **Figura 2**), es decir el ataque nucleofílico del tiol- o selenol- sobre la molécula de peróxido, es idéntico para todas estas peroxidases. Sin embargo, la forma en la cual se completa el ciclo catalítico difiere entre ellas y, dependiendo la familia y clase, puede incluir la formación de disulfuros intra o intermoleculares y/o la reducción por tiorredoxina, GSH u otra proteína conteniendo tioles en su superficie (Deponte, 2013) (Poole, 2011); (**Figura 3**).

En el caso que el equivalente de oxidación generado en la peroxidasa sea transferido directamente a una proteína efectora, esto desencadenará una respuesta específica, como por ejemplo se demostró para la peroxirredoxina 1 (Prx1) y la modulación de la actividad del receptor andrógeno (Park, 2007), el proto-oncogén celular c-Abl (Wen, 1997) y la quinasa JNK (Kim, 2007).

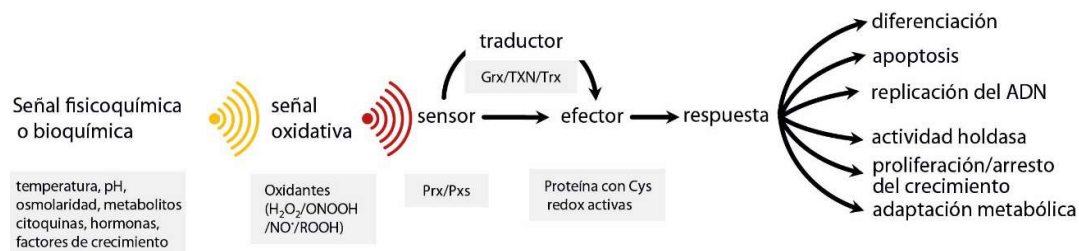


Figura 3. Señalización redox dependiente de tioles. La señalización redox requiere de un estímulo primario (endógeno o exógeno) que dispara una señal en la célula que será conducida por un conjunto específico de elementos redox que dará lugar a una respuesta celular específica. Tomado y modificado de (Specker, 2021).

Eventualmente, distintas oxidoreductasas (tiorredoxina, glutarredoxina y Triparredoxina) pueden actuar como traductores de la señalización redox ya que luego de reducir a las moléculas sensoras podrían oxidar a diferentes moléculas efectoras. En ese sentido, si bien la Trx contribuye al balance del estado redox intracelular como proteína reductora de disulfuros (Nordberg, 2001), se ha visto que ésta proteína puede actuar como intermediario de señalización y transmitiendo su estado redox a moléculas efectoras como las proteínas quinasas (Fujino G. , 2006). La triparredoxina (TXN) es una oxidoreductasa multipropósito, que comparte características con la tiorredoxina y la glutarredoxina que es específica de Euglenidos

(Kinetoplastos y tripanosomátidos) y que emplea bis-glutationil-spermidina como cofactor redox (Nogoceke, 1997) (Lüdemann, 1998).

Un aspecto importante en esta cadena de señalización es que las proteínas efectoras compiten directamente con los traductores de señal Grx o Trx, o bien con los reductores de éstos como ser GSH o TrxR, respectivamente. Por lo tanto, la conducción efectiva de la señal estará determinada por la concentración y reactividad mutua de los reactantes involucrados. La proximidad espacial y la compartimentalización son factores adicionales que pueden contribuir a favorecer la reacción entre duplas.

Vale la pena destacar, que, en muchos casos, las oxidoreductasas multipropósito Grx y Trx pueden reciclar la forma reducida de los efectores y, como se mencionó anteriormente, los sensores. De esta forma se controla el flujo de ciertas rutas de señalización de acuerdo con el estado redox intracelular. Una gran variedad de procesos celulares, incluyendo la respuesta a factores de crecimiento y hormonas, apoptosis y senescencia celular, la traducción de proteínas, la respuesta a estrés oxidativo y la expresión génica, están sometidos tanto a regulación como señalización redox (Finkel T. , 2000) (Finkel T. , 2011).

1.1.2 Señalización por AMPc/ GMPc

El 3',5' monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y el 3',5' monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) son segundos mensajeros universales que regulan un sinnúmero de funciones y procesos celulares, como la transcripción de genes, la migración celular, la homeostasis mitocondrial, la proliferación celular, y la muerte celular (Lefkimmatis, 2014).

La vía de señalización por AMPc involucra diferentes componentes y moléculas. En primer lugar, la unión de ligandos específicos a receptores acoplados a proteína G (GPCRs) produce la deslocalización de una subunidad de esta última que, en un proceso dependiente de GTP, activará a la enzima Adenilato ciclasa (AC), la cual también se haya unida a membrana citoplasmática. Empleando ATP como sustrato, la AC produce AMPc que desencadenará una cascada de señalización dentro de la célula. El AMPc producido puede unirse a diversas moléculas siendo los principales efectores: los canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (canales de GNC) (Matulef, 2003), los factores de intercambio de nucleótidos de guanina activados por AMPc (EPAC) (de Rooij, 1998) (Kawasaki, 1998), y las proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA) (Taylor, 2013). La señalización puede ser interrumpida a diferentes niveles: en etapas iniciales, mediante la degradación del AMPc por parte de

fosfodiesterasas (PDEs) (Manganiello, 1999) y en etapas finales, mediante la desfosforilación de los blancos moleculares catalizada por fosfatasa (Heijman, 2013) (**Figura 4**).

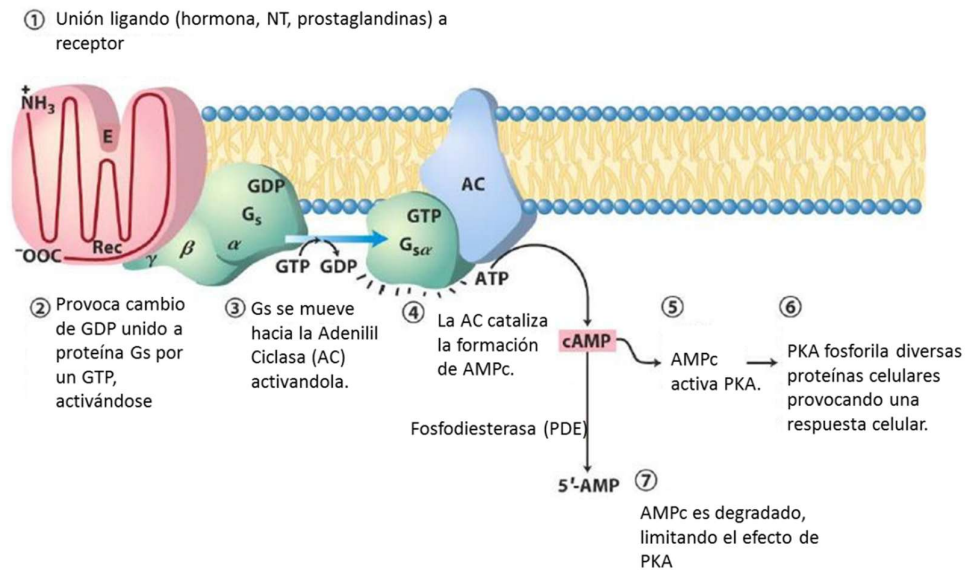


Figura 4. Vía clásica de señalización por AMPc. La unión del ligando al receptor (1) provoca el cambio de una molécula de GDP unido a la proteína G por una molécula de GTP (2) provocando su activación. La proteína G activa se desplaza hacia la adenilato ciclasa (AC) (3) activándola. La AC cataliza la formación de AMPc (4) y el AMPc activa la proteína quinasa A (PKA) que podrá fosforilar otras proteínas celulares desencadenando diversas respuestas celulares (6). Luego el AMPc generado es degradado por la fosfodiesterasa (7).

Existen dos clases diferentes de AC que se distinguen por su distribución subcelular: las de unión a membrana (TmAC), que totalizan 9 de los 10 genes que codifican para AC (TmAC1 a TmAC9), y las solubles (sAC), codificadas por un único gen (Lefkimmiatis, 2014). Numerosos estudios han demostrado que las TmACs no son intercambiables, sino que cada isoforma actúa como una unidad de regulación independiente. Por ejemplo, TmAC1 y TmAC8 son activadas por el catión calcio, mientras que TmAC5 y TmAC6 son inhibidas por el catión calcio.

Diferentes evidencias experimentales sugieren que la clave para que cada TmAC tenga una función específica está dada por su organización en complejos macromoleculares con diferentes GPCRs y con proteínas de anclaje o de apoyo. Dentro de las moléculas de apoyo, las más reconocidas y estudiadas son las proteínas de anclaje a PKA o AKAPs (del inglés A-kinase anchoring proteins). La proteína AKAP Yotiao tiene capacidad de interactuar con varias TmACs y de la relación que se establezca se podrán dar diferentes efectos regulatorios. Por ejemplo, la interacción de Yotiao con TmAC2 disminuye drásticamente la actividad de AC en

presencia de inductores como la forskolina, mientras que al unirse a TmAC9, Yotiao promueve la formación de un macrocomplejo con PKA (Lefkimiatis, 2014).

Dentro de los principales efectores asociados a AMPc, están los canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (canales de GNC), los factores de intercambio de nucleótidos de guanina activados por AMPc (del inglés Exchange protein activated by AMPc, EPAC), y la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA).

Las EPAC son una familia de proteínas de unión a AMPc con actividad de factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) que pueden activar de manera directa a GTPasas como Rap1 y Rap2. El descubrimiento de esta familia de proteínas en el año 1998 por los grupos de Rooij y Kawasaki, ha facilitado significativamente el estudio y el entendimiento de la vía de señalización dependiente de AMPc y ha abierto nuevos caminos para el desarrollo de terapias contra el cáncer, la diabetes, la falla cardíaca, la inflamación y las enfermedades infecciosas entre otras.

Hoy en día se han identificado dos miembros de la familia EPAC, como EPAC 1 y EPAC 2. En la especie humana, ambas proteínas presentan un alto grado de similitud a nivel de secuencia aminoácida (68%) y estructural (Banerjee, 2015). Estas se componen de una región N-terminal regulatoria y una región C-terminal catalítica. La región regulatoria incluye un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) mientras que la región catalítica está conformada por tres dominios básicos denominados CDC25, dominio de asociación a Ras (RA) y dominio de intercambio Ras (REM).

En ausencia de AMPc, la actividad de EPAC está autoinhibida, dado que la región regulatoria N-terminal se encuentra asociada a la región catalítica C-terminal a través de interacciones intra-moleculares. Esta conformación evita la unión de Rap al dominio CDC25 de EPAC y por lo tanto mantiene a la proteína en su estado inactivo (**Figura 5**). Frente a un estímulo, el AMPc producido se unirá al dominio CNBD induciendo un drástico cambio conformacional en el mismo que dará lugar a un distanciamiento de la región regulatoria de la catalítica. Este cambio alostérico expondrá el dominio CDC25 del sitio catalítico al cual se unirá la proteína Rap produciéndose de esta forma la activación de EPAC. A su vez, la proteína EPAC activada cataliza el intercambio de GDP (Rap inactiva) a GTP (Rap activa) sobre RAP regulando así positivamente las funciones/acciones de esta última sobre distintos efectores.

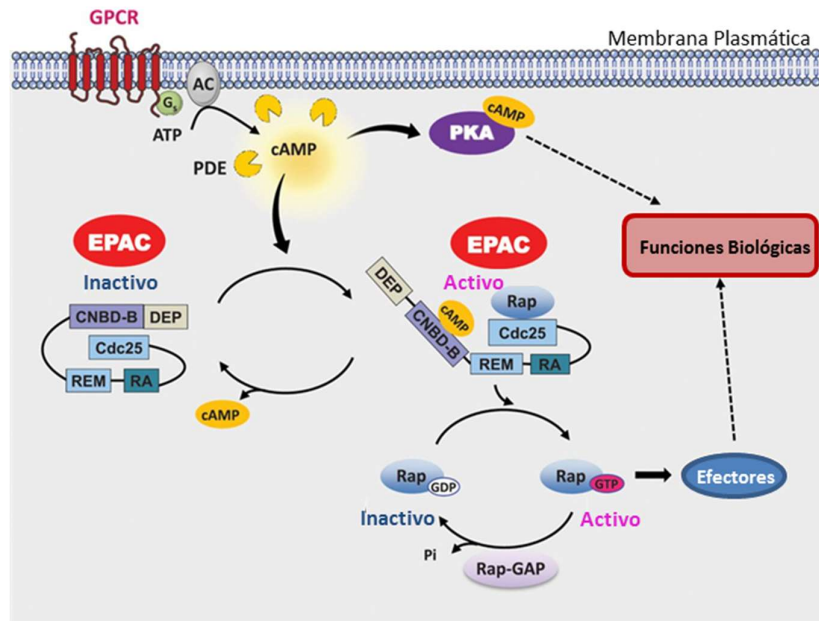


Figura 5. Mecanismo de acción de la proteína EPAC frente a la activación de la vía de señalización por AMPc.

En su estado inactivo, la PKA se encuentra en forma tetramérica, formando un holo-complejo compuesto por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras que inhiben a las primeras. Las subunidades catalíticas se encuentran en un estado inactivo en ausencia de AMPc, mientras que las subunidades reguladoras de PKA tienen alta afinidad por unir AMPc, y al hacerlo se separan de las subunidades catalíticas, lo cual libera la inhibición sobre estas últimas (Kim, 2007) (**Figura 6 B**), permitiendo la fosforilación de los sustratos de la PKA.

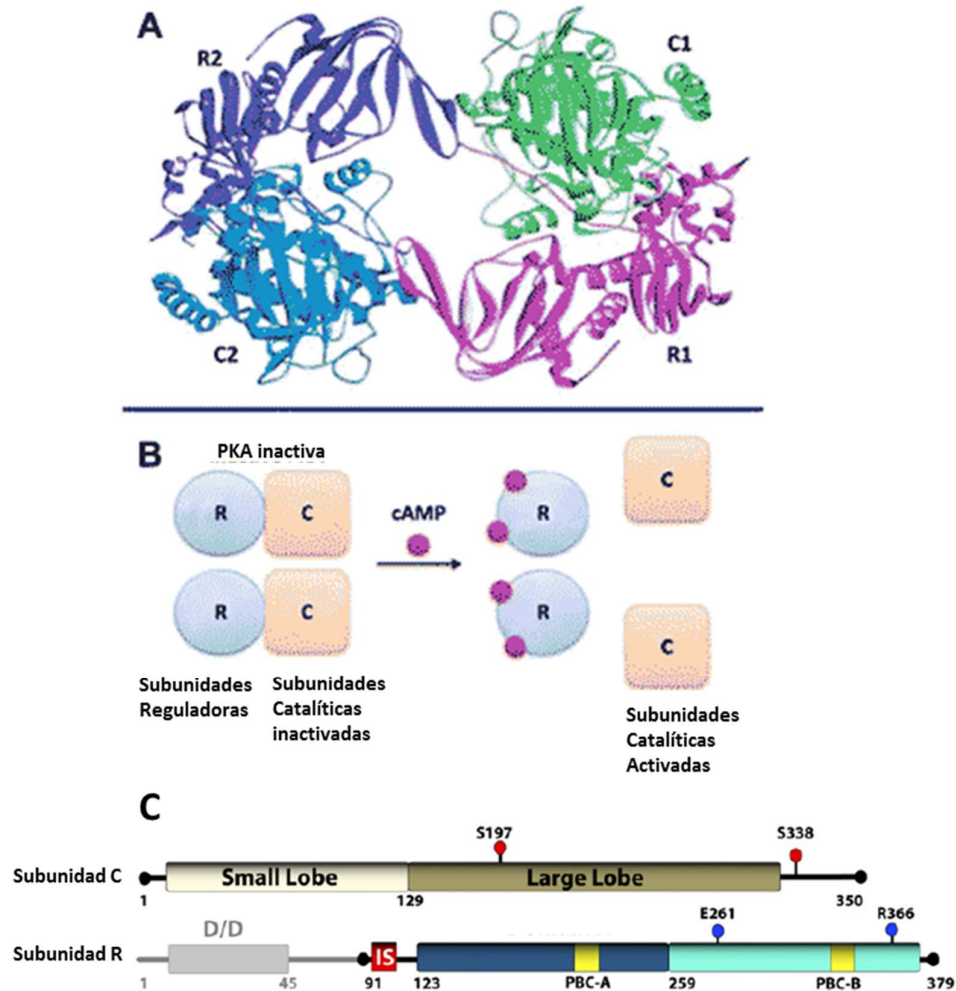


Figura 6. Mecanismo de acción de la PKA. A. Estructura de la holoenzima tetramérica; Tomado y modificado de (Sakkiah, 2017). B. Mecanismo de funcionamiento de la PKA en ausencia y presencia de AMPc.; Tomado y modificado de (Sakkiah, 2017). C. Características genéticas de la subunidad C y subunidad R. Donde, Small lobe: lóbulo pequeño de las subunidades C; Large Lobe: lóbulo grande de la subunidad C. D/D: dominio de dimerización / Docking de la subunidad R; IS: secuencia inhibidora en la subunidad C; PBC-A: dominio A de unión a AMPc y PBC-B: dominio B de unión a AMPc. Tomado y modificado de (Kim, 2007).

La subunidad catalítica (C) pertenece a la familia de las enzimas serin / treonin quinasas (STK), y más de 250 sustratos de PKA ya se han identificado (Søberg, 2018), mientras que la subunidad reguladora (R) define el mecanismo mediante el cual el AMPc transduce una señal extracelular en un proceso biológico intracelular. Hay dos clases principales de subunidades R, las RI y las RII, que son funcionalmente no redundantes, dentro de estas clases se encuentran los subtipos α y los β (RI α , RI β , RII α y RII β). El dominio de reconocimiento de AMPc es

prácticamente universal y este mecanismo de señalización se haya conservado desde las bacterias hasta los humanos (Kim, 2007).

Las subunidades reguladoras (R) forman un dímero gracias a la presencia en el extremo N-terminal de un dominio helicoidal D/D (Dimerización/*Docking*) que interacciona con las AKAPs (Taylor, 2013) (Kinderman, 2006) (Newlon, 2001). Cada AKAP contiene una hélice anfipática que se une con gran afinidad al surco hidrofóbico generado por el dominio D/D en el extremo N-terminal de las subunidades R, la mayoría de estas proteínas son específicas para las subunidades RII y otras para ambas: RI y RII, mientras que muy pocas lo son para las subunidades RI. El linker del dominio D/D incorpora una secuencia inhibidora (IS) que en ausencia de AMPc ancla el sitio activo de la subunidad C manteniendo así a la enzima inhibida. A continuación del dominio D/D, ya en el extremo C-terminal de cada subunidad R hay dos dominios en tándem de unión a AMPc (dominio A y dominio B, PBC-A y PBC-B, respectivamente) (**Figura 6 C**), cada uno de estos dominios está conformado por un β -sándwich y un subdominio helicoidal no continuo. Es importante recalcar que el rol de las AKAPs es facilitar la proximidad de la PKA a determinados blancos moleculares como por ej. los canales iónicos.

La subunidad catalítica es una proteína globular bilobulada con un dominio pequeño que actúa como sitio de unión al ATP, escondiendo el anillo de adenina en un parche hidrofóbico entre los dos lóbulos y posicionando al γ -fosfato que va a ser transferido a una proteína sustrato. El lóbulo más grande, es más estable y sirve como marco para la maquinaria catalítica y también como andamiaje para la unión de proteínas que operan como sustratos o inhibidores de la actividad quinasa (Kim, 2007) (Cheng, 2001) (Johnson, 2001) (Knighton, 1991) (**Figura 6 C**).

En lo que refiere a la señalización por GMPc, la producción de este segundo mensajero está mediada por dos familias de guanilato ciclasas (GCs), las de transmembrana (pGC) y las solubles (sGCs). Las pGC comprenden una familia de 7 proteínas ubicadas en la membrana celular, que pueden ser activadas por péptidos natriuréticos (NP) como del tipo-A (ANP), tipo-B (BNP) y tipo-C (CNP), mientras que las sGC son receptores citosólicos ubicuos que pueden ser activados por el óxido nítrico (NO) (Zaccolo, 2007) (**Figura 7**).

Las sGC controlan la relajación del músculo liso, inhiben la agregación plaquetaria, y modulan la comunicación sináptica. Por todo ello, su función fisiológica se encuentra relacionada a procesos de neurotransmisión y vasodilatación, y han atraído interés para el

desarrollo de fármacos contra desórdenes cardiovasculares y de disfunción eréctil (Padayatti, 2004).

En esta ruta de señalización, el GMPc activa a la proteína quinasa dependiente de GMPc o la proteína quinasa G (PKG), que luego fosforilará diferentes blancos responsables que actuarán regulando el tono vascular, la función gastrointestinal y la actividad neuronal entre otras (Hofmann, 2006) (**Figura 7**).

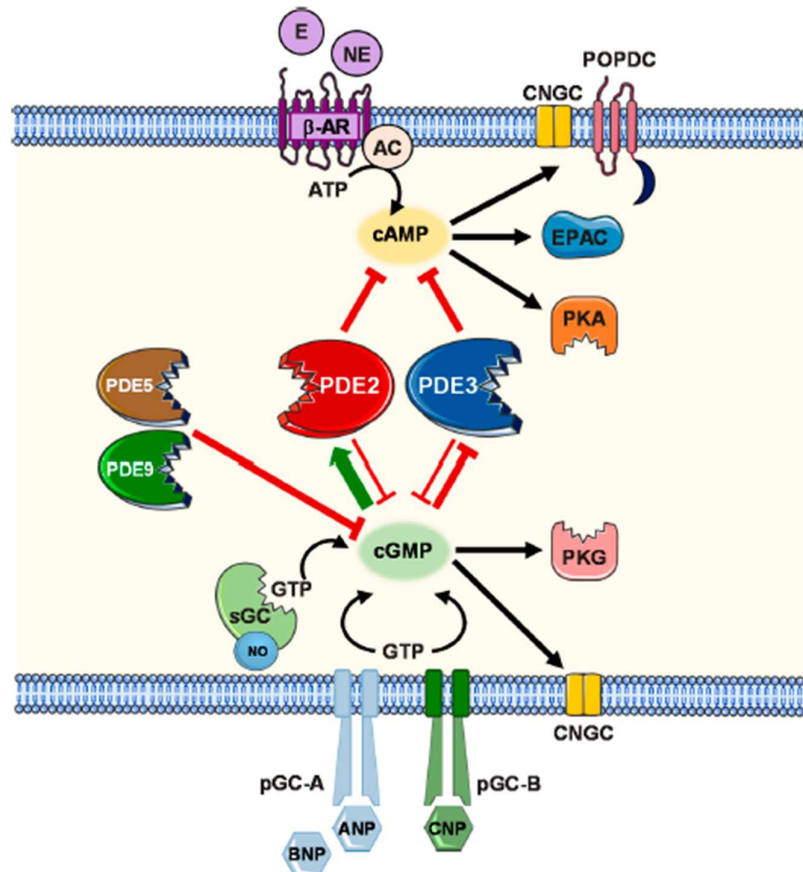


Figura 7. Producción celular de GMPc. El GMPc puede ser generado tanto por la guanilato ciclasa soluble sensible al NO (sGC) o por receptores GC (pGC) sensibles a los péptidos natriuréticos (NP). El GMPc formado promueve la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG). En diferentes compartimentos subcelulares, GMPc estimula la fosfodiesterasa 2 (PDE2) pero inhibe competitivamente la hidrólisis de AMPc mediada por PDE3. Mientras que PDE5 y PDE9 degradan el GMPc en cardiomiocitos.

Tanto AMPc como GMPc son hidrolizados exclusivamente por PDEs de nucleótidos cíclicos, las cuales tienen un rol clave en determinar el nivel basal intracelular de AMPc al estar continuamente hidrolizando el AMPc generado de forma constitutiva por las ACs y también en

controlar la amplitud y la duración de la respuesta por AMPc a estímulos externos. De hecho, las PDEs constituyen el único mecanismo responsable de terminar con la señal por AMPc o GMPc, lo cual es esencial para evitar una sobre-estimulación de efectores y las consecuencias fisiológicas que esto podría acarrear.

Las PDEs son codificadas por al menos 21 genes diferentes, agrupados en 11 familias, en base a similitud de secuencia, modo de regulación, y preferencia por sustrato nucleotídico (Zaccolo, 2007). Sin embargo, la transcripción de estos genes a partir de diferentes sitios de iniciación y splicing alternativo de los ARNm puede resultar en 90 isoformas diferentes, muchas de las cuales confieren distribuciones tisulares e intracelulares diferentes, y posibilidad de regulación cruzada con otras cascadas de señalización. En ese sentido, está muy bien documentado que los niveles intracelulares de GMPc (nanomolar a micromolar) pueden regular los niveles de AMPc al activar o inhibir diferentes AMPc-PDE (PDE1, PDE2 y PDE3) (Zaccolo, 2007). Por ejemplo, existen evidencias de la comunicación entre estas dos vías de señalización en el tejido cardíaco, donde AMPc-PDEs son blancos de acción de la vía mediada por GMPc (Zaccolo, 2007).

En el tejido cardíaco, se han descrito 7 familias de PDE: PDE1 (Loughney, 1996), PDE2 (Loughney, 1996), PDE3 (Meacci, 1992), PDE4 (Kostic, 1997), PDE5 (Senzaki, 2001), PDE8 (Soderling, 1998) y PDE9 (Onody, 2003). PDE1 y PDE2 son enzimas con especificidad dual (**Figura 8**) capaces de hidrolizar tanto AMPc como GMPc, mientras que PDE3, PDE4 y PDE8 solamente hidrolizan AMPc y PDE5 y PDE9 solamente hidrolizan GMPc. De las PDEs que hidrolizan AMPc expresadas en el tejido cardíaco, la PDE3 y la PDE1 son inhibidas por GMPc, mientras que la PDE2 se ve activada por la presencia de GMPc (**Figura 8**). Estas PDEs también difieren respecto a su regulación por otras vías de señalización (**Figura 8**). La afinidad con la que unen el GMPc la PDE1, PDE2 y PDE3, puede variar hasta en 2 órdenes de magnitud. Pequeños niveles de GMPc provocarían una inhibición selectiva de PDE3, niveles intermedios de GMPc, se daría la estimulación de la PDE2, mientras que niveles altos de GMPc, la actividad de PDE1 será inhibida.

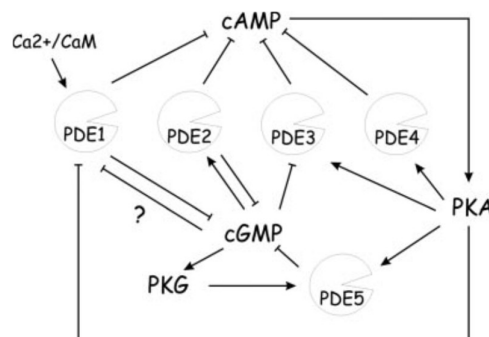


Figura 8. Vía regulatoria de las fosfodiesterasas cardíacas. PDE1, PDE2 y PDE3 hidrolizan AMPc. PDE1 y PDE2 también hidrolizan GMPc. PDE4 hidroliza AMPc de manera selectiva y PDE5 hidroliza GMPc selectivamente. El GMPc inhibe la capacidad de hidrolizar AMPc de la PDE1 y de PDE3 y activa PDE2 vía cambios alostéricos. De manera inversa, a través de inhibición competitiva, altas concentraciones de AMPc inhiben la actividad de hidrolizar GMPc de PDE1 y PDE2. AMPc también influye en la actividad de PDE3, PDE4, y PDE5 vía activación por PKA. La actividad de PDE5 también se ve estimulada por PKG. La actividad de PDE1 es estimulada por ion calcio y calmodulina, y es inhibida por fosforilación de PKA. Flechas indican activación, extremo romo indican inhibición o hidrólisis de nucleótido cíclico. Tomado de (Zaccolo, 2007).

Una misma célula puede expresar de manera simultánea múltiples receptores que participan en la señalización por AMPc, así como múltiples blancos de PKA. Esto en principio sugiere que la señal inducida por un estímulo estará fuertemente influenciada por el contexto bioquímico donde se dé la misma. Siguiendo esta línea de pensamiento, varios estudios han demostrado que la cascada asociada al AMPc no es lineal, es decir, la generación de AMPc en respuesta a un estímulo externo seguido por la activación de un efector y la finalización de la vía mediante degradación del mensajero por una fosfodiesterasa no explicaría la capacidad del AMPc de transmitir la información con una alta fidelidad en respuesta a una multitud de estímulos extracelulares. Por ejemplo, tanto el tratamiento con prostaglandina E1 (PGE1) como con isoproterenol (ISO) (agonista de receptor β -adrenérgico) provocan un aumento de AMPc y niveles comparables de activación de PKA en el corazón, pero solamente el tratamiento con ISO indujo el efecto esperado (contracción muscular), mientras que PGE1 no lo hizo (Chao, 2019).

Aún dentro de la misma célula, los nucleótidos cíclicos disparan diferentes respuestas dependiendo de los estímulos extracelulares y del receptor estimulado. A lo largo de las últimas décadas, se ha ido juntando evidencia de que la señalización por nucleótidos cíclicos no se encuentra distribuida de manera uniforme en el citosol, sino que se encuentra organizada en microdominios subcelulares de señalización. Cada uno de estos microdominios contiene un conjunto específico de GPCRs, proteína quinasas, PDEs, y AKAPs (Sprenger J. U., 2013).

El desarrollo de herramientas moleculares para la detección de cambios en AMPc en tiempo real en células vivas intactas, permitió confirmar la presencia y funcionalidad de estos microdominios de AMPc. En particular, los sensores de AMPc y de PKA basados en la transferencia de la energía de resonancia de Förster (FRET) revolucionaron los estudios sobre la vía de señalización de AMPc (**sección 1.3.2**).

Tal como se discutió en la sección anterior para los mecanismos de señalización redox, la proximidad espacial de los componentes de las vías de señalización es un factor clave que garantiza una cadena de transferencia efectiva, específica, confinada y controlada de la señal.

1.1.3 Interacción entre vías de señalización redox y vías de señalización por AMPc/GMPc.

Evidencias recientes en células de mamíferos demuestran que los mecanismos de regulación redox operan de manera cruzada con otras vías de señalización permitiendo un control fino e integrado de procesos celulares. Por ej. el estrés oxidativo y ciertos conmutadores redox regulan la actividad de diversas fosfatasa (PTEN, Cdc25, PTP1B, PTP2-a y SHP-1 y 2) y quinasas (Sty1, PKA-R1, Src, PKG-1, ASK-1) (Han, 2017) (Thannickal, 2000) (Tonks, 2005) (Fujino, 2006) (Wright, 2009). Por otro lado, se ha reportado que las EROs son capaces de modular la respuesta de numerosas vías de señalización celular (vía de la insulina, (Mahadev, 2001); regulación de PTEN y PIP3, (Kwon, 2004); señalización mitocondrial, (Lee, 2006)), incluyendo la regulación de la proteína PKA y la vía de señalización por AMPc (Humphries K. M., 2002) (Humphries, 2005).

La PKA interviene en una variedad de procesos celulares, destacándose su rol en la regulación de la fuerza y frecuencia de las contracciones cardíacas y en la actividad de células del sistema inmune (Lefkimmatis, 2014). Esta quinasa también está sujeta a regulación redox ya que es susceptible a oxidación por H_2O_2 lo cual da lugar a su dimerización covalente mediante puentes disulfuro que son reducidos por Trx. La dimerización redox-dependiente de PKA promueve su translocación desde el citosol hacia el núcleo y/o la membrana plasmática debido a un aumento de afinidad por factores de localización conocidos como AKAPs (Sarma, 2010). Por lo tanto, el confinamiento espacial de PKA mediado por H_2O_2 posibilita la acción específica de esta quinasa “promiscua” en respuesta a estímulos delimitados en el tiempo y espacio, sugiriendo una estrecha comunicación entre estado redox y micro compartimentos discretos regulados por señales de cAMP.

Las EROs también pueden regular la vía de señalización mediada por PKA tanto a nivel de la producción y degradación del AMPc, como en la fosforilación y desfosforilación de sustratos. Relativo a la producción de AMPc, evidencia bioquímica en células cardíacas de ratón ha mostrado que el H_2O_2 presenta un efecto bifásico sobre la activación de la AC, que se traduce

en potenciamiento e inhibición de actividad en tiempos cortos y prolongados, respectivamente, de exposición a este oxidante (Persad, 1997). Con respecto a la regulación de componentes corriente debajo de la vía de señalización, se ha visto que la oxidación por glutatión de la subunidad catalítica de PKA se da específicamente en el residuo de cisteína (Cys) 199, el cual se ubica en una región de activación de la quinasa (Humphries K. M., 2002). La oxidación de este residuo a un disulfuro mixto con glutatión o a un disulfuro intramolecular con la Cys343 (Humphries K. M., 2007) inhibe la actividad de la quinasa y favorece la exposición y desfosforilación del residuo fosforilado de treonina 197. La deglutatiónilación y reactivación de la quinasa se logra luego de un tratamiento con agentes reductores o con la enzima reductora de enlaces disulfuro mixto como la Grx.

La relativa sensibilidad de la PKA y las fosfatasa a ser inhibidas por oxidación de sus grupos tioles y reactivadas por reducción de los mismos, constituyen mecanismos sutiles e integrados de regulación redox de las vías de señalización por nucleótidos cíclicos.

1.2 Estudio de la vía de señalización redox

1.2.1 Limitaciones de los métodos convencionales para detectar especies redox activas

La generación de sondas redox con capacidad para detectar y cuantificar a especies redox activas de manera sensible y específica, sin perturbar la integridad y homeostasis celular, y con resolución espacio-temporal representa un gran desafío desde el punto de vista bioquímico.

Los métodos convencionales de detección de EROs o del estado redox de las moléculas traductoras o efectoras de señalización redox presentan limitaciones que están asociadas principalmente a la pérdida de la integridad celular o reacción irreversible con moléculas de interés y especificidad por el analito a ser detectado (Comini, 2016). Con respecto al primer factor, muchos métodos bioquímicos y proteómicos requieren lisar las células para extraer y analizar las especies de interés. Dado que muchas de estas moléculas suelen presentar una distribución y estado redox no homogéneo a nivel intracelular, este tipo de determinaciones solo dan una idea global pero totalmente imprecisa del estado redox de las especies de interés. Si durante el procesamiento de las muestras no se emplean controles y tratamientos especiales para evitar reacciones inespecíficas entre los grupos tioles, esto podría dar lugar a reacciones de óxido-reducción inespecíficas. Por otro lado, al tratarse generalmente de ensayos de punto final no resulta sencillo emplearlos para estudiar la dinámica de los cambios redox (reversibles) ya que esto requeriría del procesamiento de un gran número de muestras.

Estos tipos de ensayos han sido empleados para la determinación de contenido de GSH/GSSG, NADP(H) (ej. métodos enzimáticos acoplados, cuantificación por HPLC), Trx oxidada/reducida (electroforesis de proteínas) e identificación de modificaciones postraduccionales como S-glutathionilación (proteómica redox, redox-DIGE). La especificidad por el analito en algunos casos es un problema, en particular para los quimiosensores, es decir compuestos que reaccionan químicamente con el analito (generalmente en una reacción de óxido-reducción o modificación covalente), ya que estas reacciones pueden presentar cierta inespecificidad y/o incluso los intermediarios de la reacción o productos finales convertirse en potenciales agentes tóxicos o generadores de estrés oxidativo. La irreversibilidad de la reacción del quimiosensor con el analito es otro problema que no solo puede acarrear problemas de citotoxicidad sino que también impide monitorear transiciones reversibles de estados redox. No obstante, en la última década se ha mejorado sustancialmente el espectro de sondas químicas disponibles para detectar diferentes especies.

1.2.1.1 Propiedades de las Proteínas Fluorescentes redox sensibles

Las proteínas fluorescentes (FPs) han contribuido enormemente al conocimiento y estudio de eventos intracelulares en organismos vivos debido a que estas puedan expresarse de manera heteróloga y estable (sea en modo constitutivo o inducible) en cualquier tipo celular. El hecho que sus propiedades espectroscópicas (fluorescencia) no dependan de ningún cofactor, junto a su gran robustez frente a diferentes condiciones físico- y bio-químicas (alta fuerza iónica, acción de proteasas, temperatura y pH: 6-9) e inocuidad para las células u otras proteínas las ha convertido en herramientas esenciales en biología y bioquímica celular (Lukyanov, 2014) (Meyer, 2010) (Shaner N. C., 2007) (Dean, 2014). Otra ventaja sobresaliente de las FPs es que si estas incorporan las secuencias adecuadas o bien se fusionan a proteínas de interés, la expresión de las mismas puede ser dirigida a diferentes compartimentos (mitocondria y núcleo; (Hu, 2008); (Schwarzländer M. , 2008); (Rosenwasser, 2014)) o regiones subcelulares (peroxisoma, (Elbaz-Alon Y. , 2014); (Schwarzländer M. , 2008)). Esto permite el monitoreo in situ de procesos biológicos. También presentan varias regiones en su estructura que admiten inserciones o deleciones de uno o varios aminoácidos que, dependiendo de su ubicación y/o naturaleza, podrán modificar las propiedades espectroscópicas de la FP convirtiéndola en un biosensor. Por ejemplo, la composición química del cromóforo tiene un rol muy importante en ajustar las propiedades espectrales de las FPs (**Figura 9**) (Dean, 2014). El

cromóforo formado por un tripéptido puede tolerar sustitución en los primeros dos posiciones pero no en la tercera debido a su rol en la ciclación. El principal determinante en las longitudes de onda de excitación y de emisión es el segundo aminoácido en el tripéptido, observándose una histidina en FPs azules, un triptófano en FPs cian y una tirosina en FPs verdes y amarillas (**Figura 9**). Las FPs con propiedades espectrales especiales son aquellas con un gran corrimiento de Stokes (>100 nm). Estas FPs, como LSSmOrange, T-Sapphire y mTagBFP2, pueden ser particularmente útiles para la multiplexación espectral, donde una única longitud de onda de excitación puede excitar múltiples FPs, (ejemplo a 405nm) (Dean, 2014).

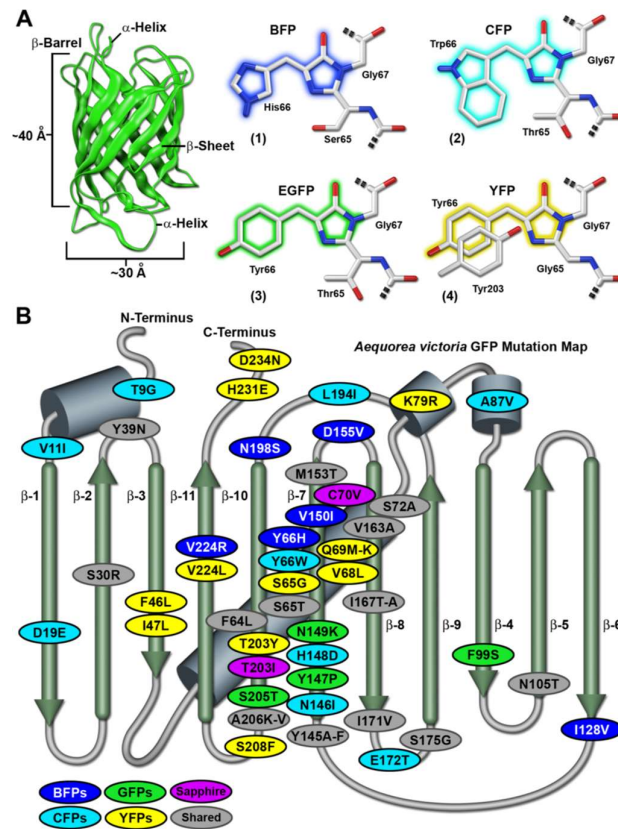


Figura 9. Características de los diferentes cromóforos en las FPs. A. Dimensiones y arquitectura del barril de la FP, y estructura de alguno de los cromóforos más comunes derivados de Aequorea FP, 1 BFP; 2 CFP; 3 GFP; 4 YFP. B. Mapa de mutaciones más comunes sobre la Aequorea GFP. Las hojas- β están numeradas y representadas por cilindros verdes con flecha indicando hacia el extremo C-terminal, mientras que las α -hélices están representadas como cilindros grises. Las mutaciones están coloreadas de acuerdo con la variante que representan: BFPs (azul), CFPs (cian), GFPs (verde), YFPs (amarillo), Sapphire (violeta), plegamiento (gris). Tomado de (Shaner N. C., 2007).

La proteína GFP salvaje, originalmente aislada de la medusa *Aequorea victoria* por Osamu Shimomura, es una proteína soluble de 27 kDa. La cadena polipeptídica de 238 aminoácidos

conforma un barril β de 11 hojas que oculta en el interior del mismo una hélice α que contiene al grupo cromóforo. El cromóforo de la GFP salvaje está conformado por 3 aminoácidos, Ser65, Tyr66 y Gly67 (Meyer, 2010). Estos aminoácidos sufren una reacción de ciclación postraduccion, seguido de un paso de deshidratación y un paso de oxidación, que da lugar al cromóforo maduro (**Figura 10**). La oxidación lleva a la formación de un sistema conjugado de electrones- π capaces de absorber y emitir luz visible. La proteína GFP salvaje presenta dos picos de excitación que reflejan diferentes estados de protonación del grupo fenol del residuo Y66 dentro del cromóforo, pero solo un pico de emisión con máximo en 509 nm. El primer pico de excitación con un máximo de 395 nm corresponde a la forma protonada o neutra del cromóforo (banda A) y el segundo pico con un máximo de 475 nm corresponde a la forma desprotonada, o aniónica (banda B). El protón es reversiblemente traslocado entre la Tyr66 y el Glu222 a través de un puente de hidrógeno que involucra también a la Ser205 (Meyer, 2010) (**Figura 10**).

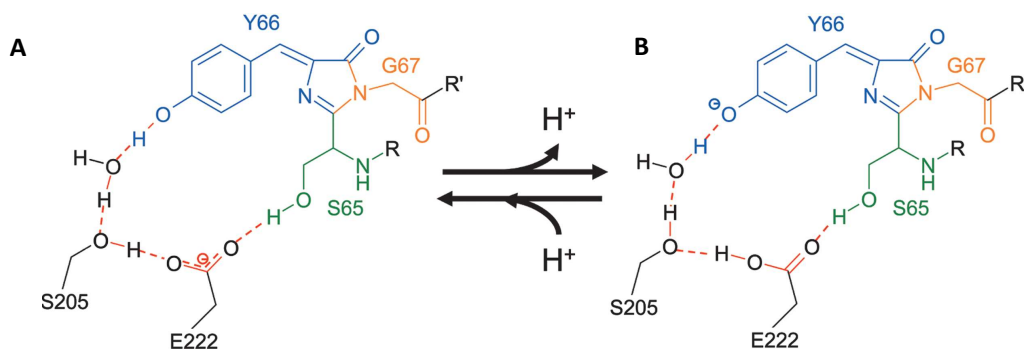


Figura 10. Desprotonación reversible del cromóforo de la proteína GFP. Interconversión del cromóforo entre la forma neutra (A) y la aniónica (B). El cromóforo está conformado por S65 (verde), Y66 (azul) y G67 (naranja). La desprotonación del grupo hidroxilo del fenol está acoplada con la protonación del E222 a través de un enlace de hidrógeno, y de una molécula de agua.

Luego de la excitación de la banda A (por ejemplo, con un láser a 405 nm) el cromóforo excitado neutro (A^*) se convierte en la forma aniónica no relajada y transfiere el protón fenólico del residuo Y66 al carboxilato del residuo E222. Los aminoácidos más relevantes en la transferencia de protón en el estado excitado o ESPT (del inglés *excited state proton transfer*) (Meyer, 2010) son los involucrados en la red de enlaces puente de hidrógeno alrededor del cromóforo (por ejemplo, S205, E222, S65) y aquellos cercanos a la Y66 (por ejemplo, N146, H148, T203). Este mecanismo de transferencia de protón/hidrógeno es el que determina en gran medida la capacidad con la que el grupo cromóforo absorbe y emite luz.

Dentro del rango de pH fisiológico (pH 5.5-8.5), la acidez del medio circundante no afecta de manera marcada el estado de protonación del cromóforo. No obstante, pH ácidos tienden a disminuir (quenchar) la intensidad de fluorescencia. Otra característica importante de algunas FPs (ej. GFP) es que presentan picos de excitación discretos y destacados a diferentes longitudes de ondas que muestran un comportamiento inversamente recíproco dependiendo el estado de protonación del cromóforo (**Figura 11**). Este comportamiento ratiométrico permite normalizar las medidas de fluorescencia adquiridas bajo diferentes condiciones y cancelar variaciones en intensidad de fluorescencia que no sean inducidas por los estímulos específicos, como lo pueden ser diferencias en niveles de expresión entre células o interferencias negativas (*quenching* por pH, compuestos o pigmentos celulares). Otras FPs simplemente poseen un único pico de excitación y por lo tanto las mediciones son intensiométricas (**Figura 11**) y cuando se emplean como sensores, requieren de calibraciones o normalizaciones especiales para descartar o cuantificar su contribución o interferencia con la fluorescencia. Una de las desventajas de los biosensores ratiométricos es que “ocupan” un mayor rango espectral, limitando el uso de mediciones multiparamétricas con otros fluoróforos de FPs por solapamiento de espectros de fluorescencia.

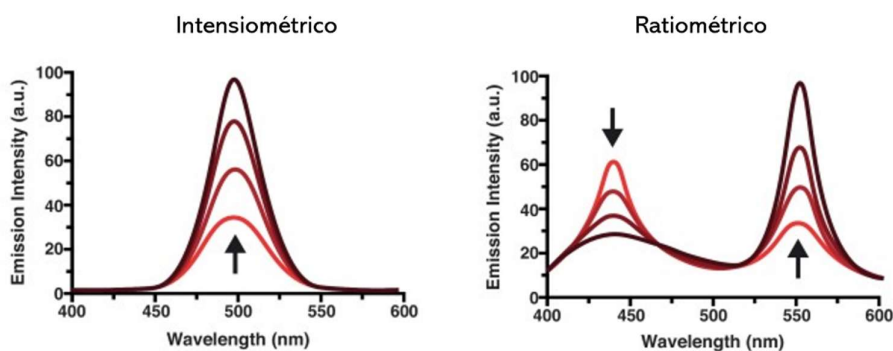


Figura 11. Tipos de respuesta de los biosensores. Biosensor intensiométrico (izquierda) y Biosensor ratiométrico (derecha), se indica el cambio en la intensidad de fluorescencia como función de un aumento en la concentración de analito.

Los grupos de Jakob Winther y James Remington desarrollaron de forma independiente sondas redox sensibles basadas en la proteína amarilla fluorescente o YFP (por su sigla en inglés Yellow Fluorescent Protein; (Ostergaard, 2001)) y la proteína verde fluorescente o GFP (por su sigla en inglés Green Fluorescent Protein; (Dooley, 2004); (Hanson, 2004)), respectivamente. Las mismas fueron denominadas rxYFP y roGFP y se generaron mediante

técnicas de mutagénesis sitio dirigida. La estrategia consistió en reemplazar por residuos de cisteína un par de aminoácidos espacialmente adyacentes (de manera tal que se favorezca la formación de un enlace disulfuro entre ellos), expuestos al solvente (para que puedan interactuar con especies redox del medio circundante) y próximos a aminoácidos que forman parte del cromóforo o bien de la red de interacciones electrostáticas o de Van der Waals del mismo (ya que esto permitiría traducir cambios conformacionales inducidos por estado redox de las cisteínas en cambios espectroscópicos a nivel del cromóforo) (Schwarzländer, 2016). Se estudiaron diferentes mutantes de Cys de estas proteínas, hallándose los mejores desempeños en término de respuesta y amplitud de cambios en intensidad de fluorescencia para los mutantes Ser147Cys (cadena β 7) y Gln204Cys (cadena β 10) de la EGFP (mutante denominado roGFP2), y los residuos N149C y S202C de la YFP.

En el caso del biosensor generado a partir de la proteína GFP, roGFP2, se vio que la desprotonación del cromóforo es significativamente favorecida cuando se sustituye la S65 por una treonina, lo cual provoca un corrimiento del pico mayor de excitación a 488 nm, dando lugar a la proteína GFP mejorada o EGFP (del inglés *enhanced GFP*) (Heim, 1995), su cromóforo presenta dos picos de absorción (405 nm y 488 nm) cuya capacidad de excitación mostró una respuesta inversa en relación al estado redox de sus cisteínas. El comportamiento de doble excitación asociado a una única λ_{em} de la GFP es justamente lo que posibilita realizar medidas ratiométricas con esta proteína. La oxidación (formación del disulfuro) de la proteína roGFP2 resulta en un incremento en el pico de excitación a 405 nm y en una disminución en el pico de excitación a 488 nm y un comportamiento opuesto bajo condiciones reductoras (**Figura 12 A**). Cada paso individual de los tres del intercambio tiol-disulfuro es totalmente reversible (ejemplo en presencia de DTT), esto representa como gran ventaja la capacidad del biosensor de monitorear cambios redox *in vivo*. A diferencia de la GFP, el cromóforo de la (rx) YFP presenta solo un pico de absorción destacado (488 nm), por lo que los cambios en el estado redox de las cisteínas se traducen solo en cambios intensiométricos de fluorescencia (**Figura 11; Figura 12 B**).

La cristalización de la forma reducida y oxidada de una de las variantes de roGFP (PDB 1JC0 y 1JC1) permitió estudiar en detalle los cambios estructurales que explicarían la formación del disulfuro y la protonación del cromóforo (Hanson, 2004). El mecanismo exacto a partir del cual los cambios de fluorescencia ocurren son significativamente diferentes entre cada una de las variedades de las proteínas fluorescentes.

La formación de un enlace disulfuro entre los residuos cisteína mutados en las posiciones 149 y 202 en la proteína rxYFP (Ostergaard, 2001) exhibió una reducción del pico de emisión de fluorescencia de 2.2 veces respecto al wtYFP, sin un cambio significativo en la longitud de onda de excitación. La proteína rxYFP exhibe dos picos de absorción para la banda A (cromóforo neutro, $\lambda_{\text{máx}} = 392 \text{ nm}$) y para la banda B (cromóforo aniónico, $\lambda_{\text{máx}} = 514 \text{ nm}$), con un claro punto isobéstico a 432 nm. Sin embargo, debido al *quenching* de la fluorescencia, la forma del cromóforo neutro de la rxYFP es no fluorescente y por lo tanto exhibe un solo pico de excitación con un máximo en 512 nm con un hombro menor cercano a los 448 nm (**Figura 12 B**). El potencial redox medio de la rxYFP fue determinado como $E^{\circ'} 261 \text{ mV}$ a partir de la titulación de la proteína recombinante con un amortiguador 2 GSH/GSSG (Ostergaard, 2001). Además como la reactividad de la rxYFP frente al glutatión es relativamente lenta, las muestras de proteína tuvieron que ser incubadas por 21 horas y luego ajustado la relación 2 GSH/GSSG.

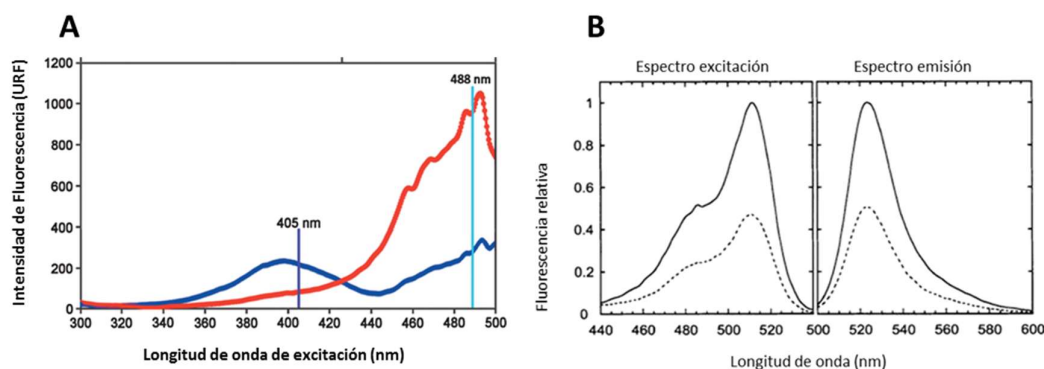


Figura 12. Características espectrales de los sensores redox fluorescente roGFP2 y rxYFP. A. Cambios redox dependientes en el espectro de excitación de la proteína roGFP2. El cromóforo de la proteína roGFP2 reducida se encuentra preferentemente desprotonado, exhibiendo un pico de excitación cercano a los 488nm (curva roja). Frente a la oxidación, el cromóforo se encuentra protonado, ganando excitabilidad a 405nm y perdiendo excitabilidad a 488 nm (curva azul). B. Espectro de excitación y de emisión de la forma oxidada (línea punteada) y reducida (línea entera) de la proteína rxYFP a pH 7.0. Los dos espectros fueron registrados a una longitud de onda de emisión y de excitación de 540 nm y 490 nm, respectivamente. Tomada y modificada de (Ostergaard, 2001).

A diferencia de la rxYFP, al presentar dos picos de excitación que responden de manera opuesta al estímulo redox, la roGFP2 permite realizar medidas ratiométricas, independientes de la concentración de la sonda (**Figura 11**). Este comportamiento tiene el potencial de reducir o eliminar alteraciones en los datos causados por fotoblanqueamiento, por diferencias en

niveles de expresión, por inestabilidad en la iluminación, y por una distribución no uniforme entre las células o entre grupos de células. De todos modos, hay que considerar que estas medidas ratiométricas son sensibles a las longitudes de onda elegidas y a las características de cada instrumento, tales como el ancho de banda de excitación, y la sensibilidad del detector. Por lo que se debe realizar curvas de calibración individuales para cada sonda bajo las condiciones utilizadas para las medidas experimentales.

Para ambos biosensores se demostró que poseen una alta predilección por reaccionar con GSSG/GSH, no así con otros oxidantes o reductores fisiológicos como el O_2^- , H_2O_2 o la Trx (Meyer A. , 2007) (Meyer, 2010) (Schwarzländer, 2016) (Banach-Latapy, 2013) (Dooley, 2004). La reactividad de roGFP2 y rxYFP con glutatión y la reconocida capacidad de la Grx por catalizar reacciones reversibles de intercambio tiol/disulfuro entre este tiol de bajo peso molecular y proteínas blanco condujo a la realización de ensayos de oxidoreducción de estos biosensores en presencia de Grx.

Estos estudios mostraron que la Grx aceleró significativamente la oxidación y reducción de ambos biosensores cuando el sustrato era GSSG y GSH, respectivamente. De hecho, la sensibilidad de estos biosensores se vio significativamente incrementada cuando la Grx formó parte de las reacciones sea que la misma estuviera libre en solución (Björnberg, 2006) o fusionada al biosensor (Gutscher, 2008). En términos cuantitativos esto se reflejó en un incremento de al menos 3 órdenes de magnitud en la cinética de la oxido-reducción de los biosensores, en la detección de concentraciones nanomolares de GSSG y en una capacidad de respuesta en el orden de los milisegundos. Estos trabajos fueron realizados con Grx1p de levadura y Grx humana, lo cual además contribuyó a demostrar que el módulo traductor de señal no establece una interacción directa con el módulo sensor sino simplemente a través del tiol de bajo peso molecular. Esto fue luego corroborado indirectamente al observarse respuestas comparativamente similares en la respuesta de estos biosensores a diferentes estímulos redox cuando fueron expresados en células y organismos de diferentes especies pero con sistemas GSH/Grx funcionales (Hansen, 2006) (Gutscher, 2008). En resumen, en sistemas biológicos, ambos biosensores responderían de manera relativamente específica a fluctuaciones en la relación GSH/GSSG mediante reacciones catalizadas por Grx.

En base a estas observaciones y para lograr que las mediciones de estado redox del pool GSH/GSSG no dependa de la disponibilidad de Grx endógena, la cual puede variar de célula a célula y a nivel de compartimentos subcelulares, es que se desarrolló una segunda generación

de biosensores redox fusionados a Grx (**Figura 13**). De hecho, la hGrx-roGFP2 ha contribuido a elucidar que la relación GSH/GSSG en los peroxisomas y en el espacio intermembrana mitocondrial, dos dominios subcelulares con casi nula o limitada cantidad de Grx nativa, es comparable a la presente en el citosol de la célula (Kojer, 2015) (Kojer, 2012) (Elbaz-Alon Y. , 2014).

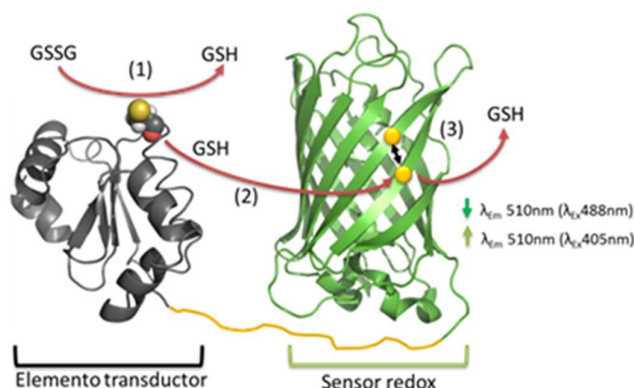


Figura 13. Biosensor redox hGrx-roGFP2. La hGrx cataliza eficientemente el equilibrio entre el par GSH/GSSG y la roGFP2. Para la reacción de oxidación, (1) el glutatión disulfuro reacciona con la cisteína nucleofílica del sitio activo de la hGrx, dando lugar a la cisteína glutationilada con la liberación de una molécula de glutatión reducido; (2) este disulfuro mixto de la hGrx es atacado por una de las cisteínas redox sensibles de la roGFP2 dando lugar a la forma glutationilada del sensor y la forma reducida de hGrx; (3) el disulfuro entre una de las cisteínas de la roGFP2 y el glutatión se resuelve por medio de la formación de un disulfuro intramolecular en la roGFP2 y la liberación de la segunda molécula de GSH. Este último paso se acompaña con un cambio ratiométrico en la intensidad de fluorescencia de la roGFP2 cuando es excitada a 488 nm y 405 nm. Tomada y adaptada de (Comini, 2016).

En esta configuración de fusión, la proximidad molecular y relación estequiometría entre el módulo traductor de señal y el módulo sensor aseguran una comunicación eficiente entre ambos. Justamente esta propiedad y la versatilidad de la roGFP2 para ser oxidada por otras proteínas traductoras o tioles de bajo peso molecular dio lugar a la generación de biosensores donde la especificidad por el analito a detectar está dada por el módulo traductor. Este es el caso de la fusión de peroxidasas o redoxinas tiol-específicas a roGFP2 que dio lugar a biosensores con capacidad para detectar H_2O_2 , micotiol o bacilitiol (ambos tioles de bajo peso molecular presentes en micobacterias y actinomicetes) y el tripanotión (tiol de bajo peso molecular exclusivo del linaje Euglenozoa: tripanosomátidos) (Dooley, 2004); (Hanson, 2004); (Østergaard, 2004); (Jiang, 2006); (Meyer A. , 2007); (Bhaskar, 2014)). El esquema de la **Figura 14** resume las características y variantes y algunas de las aplicaciones de los biosensores redox basados en la roGFP2.

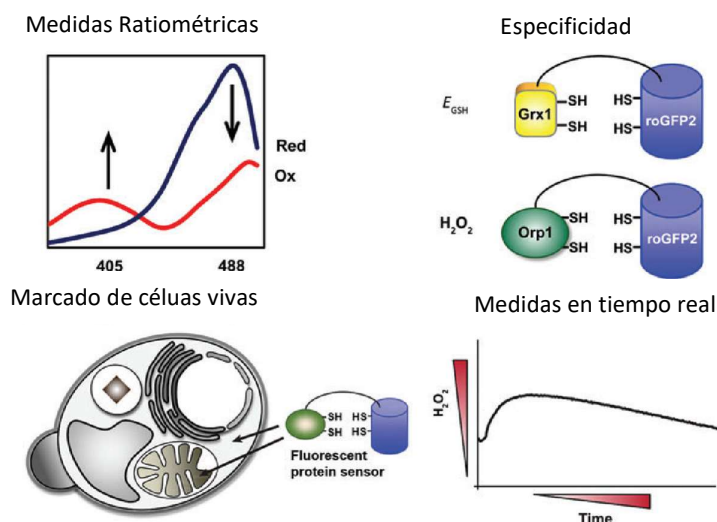


Figura 14. Propiedades de las proteínas redox fluorescentes para el estudio *in vivo* de procesos biológicos redox. Estas incluyen, (A) la posibilidad de realizar medidas ratiométricas independientes del nivel de expresión de la sonda (aplicable a roGFPs no a rxYFP). (B) Especificidad por especies redox puede lograrse vía la fusión con enzimas redox específicas con la opción de tener como blanco (C) localizaciones subcelulares definidas por medio de fusionar genéticamente proteínas o péptidos apropiados hacia el blanco. (D) La oxidación de la sonda es totalmente reversible, permitiendo medidas en tiempo real.

1.2.1.2 Sensores redox fluorescentes con corrimiento espectral hacia el rojo.

Una de las desventajas de los biosensores basados en FPs que poseen espectros de emisión en la zona del espectro visible y ≤ 500 nm es su escaso potencial para ser empleados en la mayoría de los modelos *in vivo* debido a la baja penetración en los tejidos de la luz de excitación violeta/azul y de la emisión de la luz verde. Una alternativa prometedora para superar estas limitaciones lo constituyen las FPs con espectros de adsorción y emisión corridos hacia el rojo lejano ($\lambda_{em} > 600$ nm). Las primeras FPs con estas características fueron aisladas de la anemona *Entacmaea quadricolor* y de un coral del género *Discosoma*, las cuales presentan una conformación tetramérica (eqFP611; (Petersen, 2003), (Wiedenmann, 2002)) y dimérica (DsRed; (Mizuno, 2001)), respectivamente. Algunas de las desventajas que presentaban estas proteínas, como ser bajos rendimientos cuánticos, limitada fotoestabilidad y conformaciones oligoméricas que pueden afectar su uso como biosensor (Campbell, 2002);

(Shaner, 2008); (Wiedenmann, 2005); (Wiedemann, 2009), han sido superadas mediante la generación de variantes mutagenizadas (Shui, 2011) (Feng, 2019).

Las primeras versiones de biosensores redox basados en FP con corrimiento espectral hacia el “rojo” han sido reportadas recientemente (Sugiura, 2015) (Fan, 2015) (Mishin, 2015) (Ermakova, 2014). Una de ellas es la versión roja de la GFP, denominada rxRFP (de las siglas en inglés *redox sensitive red fluorescent protein*). A diferencia de la estrategia empleada para los sensores roGFP2 y rYFP, la rxRFP ha sido permutada circularmente y se le ha incorporado un residuo de cisteína tanto en el extremo N-terminal como C-terminal de los sitios de permutación. Con los residuos de cisteína en estado reducido por tratamiento con DTT, la rxRFP presenta una intensidad de fluorescencia basal baja debido a que la permutación modificó la posición de los residuos que forman la red de interacciones electrostáticas alrededor del cromóforo y este último queda expuesto al solvente. Cuando los residuos de cisteína son oxidados por el agregado de GSSG, forman un disulfuro intramolecular, y se logra restaurar la conformación de los residuos próximos al cromóforo con lo cual éste se estabiliza y aumenta cerca de 4 veces su intensidad de fluorescencia a pH fisiológico (Ex/Em 576/600 nm) (Fan, 2015) (**Figura 15**). El sensor rxRFP sería una sonda fluorescente útil para detectar cambios redox generales, pero no una sonda específica para un determinado EROs/ERNs.

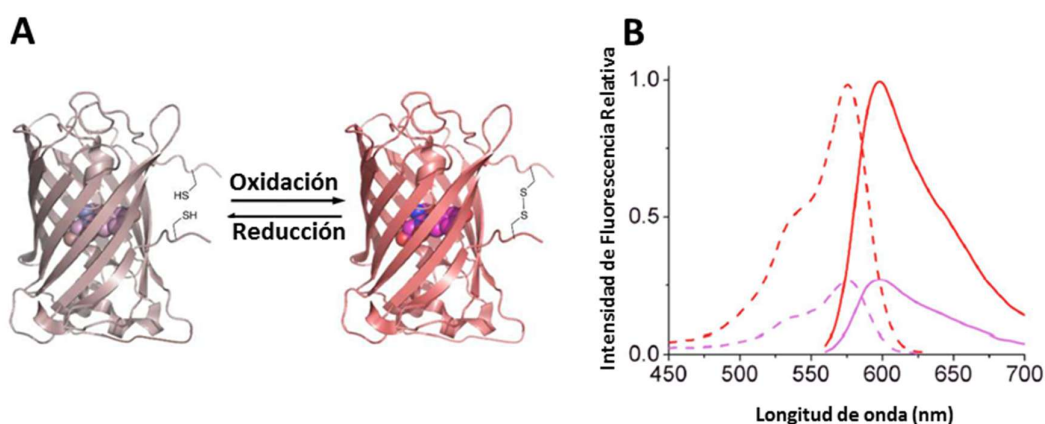


Figura 15. Esquema del funcionamiento del sensor rxRFP. A. En condiciones reductoras, las cisteínas N-terminal y C-terminal de la proteína circularmente permutada se encuentran como tiolatos. En condiciones oxidantes, se forma el disulfuro intramolecular entre las mismas cisteínas, observándose un aumento en la intensidad de fluorescencia. B. Espectro de excitación (rojo) y de emisión (magenta) de la proteína rxRFP.

Uno de los grandes problemas que presenta esta configuración de sensor redox es que en estado reducido (el cual es preponderante en condiciones fisiológicas y en la mayoría de los organelos celulares con la excepción del retículo endoplasmático y los peroxisoma), el cromóforo queda expuesto al solvente y éste ha mostrado ser particularmente sensible a pH (disminución de la intensidad de fluorescencia a pH menores a 8) y a reaccionar (oxidarse) de manera irreversible con el ONOO^- y el O_2^- .

Otro biosensor basado en una FP roja es el denominado HyPerRed que constituye el primer sensor fluorescente rojo codificado genéticamente para detectar peróxido de hidrógeno (Ermakova, 2014). Hasta ese momento los dos tipos de sensores codificados genéticamente para detectar peróxido de hidrogeno *in vivo* eran los correspondientes a la familia de los reporteros HyPer (Belousov, 2006) y el sensor roGFP2-Orp1 (Gutscher, 2008). HyPer es un producto de la integración de una proteína fluorescente amarilla permutada circularmente (cpYFP) con el dominio regulador de la proteína bacteriana OxyR (OxyR-RD). Para generar la HyPerRed, se procedió a reemplazar la cpYFP del sensor HyPer por una versión circularmente permutada de la proteína mKate (Shui, 2011), FusionRed (Shemiakina, 2012) y cpRed (una proteína fluorescente roja circularmente permutada cpmApple; (Zhao, 2011). (**Figura 16**). Se prepararon diferentes librerías de expresión, una para cada cpFP, variando la longitud de los linkers entre la cpFP y los dos dominios flanqueantes OxyR-RD. En cada librería, las secuencias de los linkers fueron randomizadas para lograr identificar variantes únicas con las mejores condiciones de plegado y de maduración. Únicamente las librerías basadas en la proteína cpRed presentó clones que respondieron al agregado de H_2O_2 . El clon seleccionado correspondió a la proteína cpRed (cpmApple) asociada los linkers Pro-Arg-Thr y Ala-Gly-Val, que demostró un incremento de un 80% de la intensidad de fluorescencia luego del agregado de H_2O_2 , esta proteína es la que se denominó como HyPerRed.

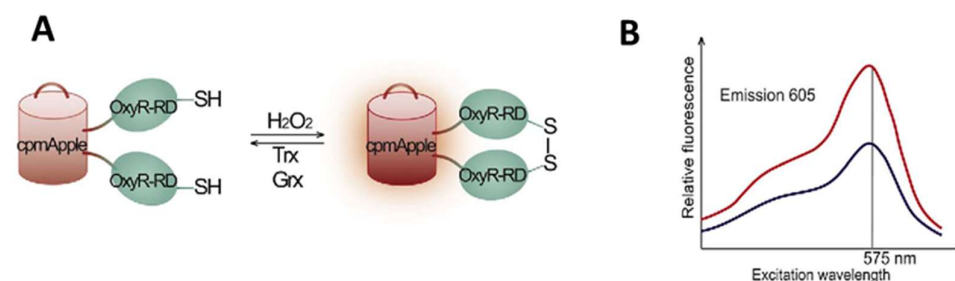


Figura 16. Esquema del funcionamiento del sensor HyPerRed. En condiciones reductoras, los residuos de cisteína de los módulos OxyR-RD se encuentran como tiolatos y el cromóforo queda expuesto al solvente y carece de la red de interacciones electrostáticas que lo estabilizan, lo cual se traduce en una intensidad de fluorescencia basal baja. En condiciones oxidantes, se forma el disulfuro entre las subunidades OxyR-RD, lo cual estabiliza la red de contactos del cromóforo y provoca un incremento de la intensidad de fluorescencia. B. Espectro de excitación del sensor oxidado (rojo) y reducido (azul) a un λ_{em} de 605nm. Tomado de (Bilan, 2016).

Al igual que el biosensor rxRFP, la intensidad de fluorescencia de HyPerRed es fuertemente influenciada por el pH del medio. Al igual que para cpmApple (Zhao, 2011), la proteína HyPerRed presenta una curva de titulación de pH similar, donde la forma oxidada y la forma reducida de HyPerRed presentan un pKa de 8,5 y de 8,7, respectivamente. Por lo que se recomienda, el uso de un control frente a cambios de pH en ensayos paralelos, como, por ejemplo, el uso de la variante HyPerRedC199S, donde Cys199 es un residuo crítico para reaccionar con el H_2O_2 y formar el puente disulfuro con la Cys208 del dominio OxyR. La sustitución del Cys199 mostro propiedades espectrales similares a HyPerRed pero no fue sensible al H_2O_2 , pudiendo ser utilizado como un control de calibración interno frente a cambios en la intensidad de fluorescencia producto de cambios en el pH.

Otra desventaja es que HyPerRed (al igual que las variantes que emplean la versión permutante circular de las FPs) es intensiométrico, lo cual, como fuese mencionado anteriormente, obliga a la inclusión de controles experimentales de calibración redox.

Por otro lado, (Shokhina, 2019) desarrollaron la proteína redox sensible con corrimiento al rojo, roCherry. Dos cisteínas fueron insertadas en los residuos 150 y 203 de mCherry (Shaner, 2004) dando lugar a un prototipo de proteína, denominada roCherry. La inserción de una treonina a continuación de la Cys150 y una mutación adicional (S151E) fueron realizadas para aumentar y favorecer la movilidad y rango dinámico de la proteína. La enzima Grx1 fue fusionada al extremo N-terminal de roCherry por medio de un linker, previamente utilizado para el sensor Peredox (Hung, 2011). El sensor redox sensible Grx1-roCherry presenta un tipo de respuesta intensiométrica, con un único pico de excitación a 589 nm y un único pico de emisión a 610 nm. Al igual que otras sondas redox sensibles previamente reportadas y ya mencionadas en este trabajo de tesis, el sensor hGrx-roCherry es sensible al pH, su potencial es ~ -311 mV y no responde de manera directa al peróxido de hidrógeno *in vitro*, pero si en cultivo celular. Al comparar este sensor, con el Grx1-roGFP2, es menos específico y presenta respuesta a altas concentraciones de oxidante, como óxido nítrico.

1.3 Estudio de la vía de señalización por AMPc/GMPc

1.3.1 Métodos de detección de AMPc/GMPc.

En su gran mayoría, los métodos clásicos para estudiar y cuantificar concentraciones de AMPc/GMPc implican el lisado de células o tejidos (Gruteser, 2020). Entre ellos se encuentran los basados en la medición de niveles de AMPc por ensayos de competencia a una proteína específica de unión o inmunoensayos (radioinmunoensayos (RIA) y los enzimoimmunoensayos (EIA)). Para los inmunoensayos, el AMPc/GMPc presentes en el lisado celular compiten, por el sitio de unión a un anticuerpo anti-nucleótido cíclico específico, contra estándares de AMPc/GMPc artificialmente radiomarcados (RIA) o inmunoconjugados (EIA). La detección se da por la unión de otro conjunto de anticuerpos que reconocen el sustrato modificado pero no el nativo. Estos segundos anticuerpos, generalmente, están acoplados a una enzima que metaboliza un sustrato dando lugar a la emisión de una señal detectable ópticamente (ej. luminiscencia, colorimétrica, radiocontraste (Harper, 1975); (Frandsen, 1976); (Chiulli, 2000)). Una de las principales desventajas de estos métodos es la complejidad para obtener y preparar los antisueros, si bien, existen kit comerciales disponibles, el costo por unidad es alto y se vuelve aún mayor a la hora de realizar experimentos de gran escala (Chen, 2002).

Un ensayo muy empleado para cuantificar AMPc es el de competencia de unión a PKA, donde un sustrato marcado compite con el AMPc presente en la muestra por la unión a esta proteína (Chen, 2002); (Gilman, 1970). Las ventajas de este ensayo son su simplicidad, bajo costo y alta especificidad. Sin embargo, sus puntos críticos son que requieren la producción/purificación de la proteína de unión, la extracción del AMPc de las muestras, y la cuantificación del AMPc marcado (Chen, 2002). Otra de las principales desventajas de los métodos basados en la unión por competencia, son los múltiples pasos de manipulación de la muestra y los tiempos de incubación, que pueden extenderse por 16-18h.

1.3.2 Sensores FRET para detección de AMPc/GMPc

En los últimos años, el desarrollo de sensores codificados genéticamente ha revolucionado el área y ha permitido medir cambios en la concentración de estos segundos mensajeros con una alta resolución espacial y temporal a nivel celular. Este tipo de nuevas

herramientas ha permitido profundizar los estudios de la vía de señalización, así como en la distribución y compartimentalización de los diferentes componentes. Varios de ellos consisten en variantes espectrales de la GFP que interaccionan mediante efecto FRET regulado por transiciones alostéricas inducidas por cAMP sobre dominios de alta afinidad por este ligando (Sprenger, 2013).

El fenómeno de FRET se basa en la transferencia de energía de un fluoróforo excitado (dador) a un cromóforo (aceptor) cuyo espectro de excitación se solapa con el espectro de emisión del dador (**Figura 17 B**). La transferencia de energía se da sin la aparición de un fotón por parte del dador y es resultado de interacciones dipolo-dipolo entre dador y aceptor. La tasa de energía transferida depende de la superficie de solapamiento espectral entre el espectro de emisión del dador y el espectro de absorción del aceptor, del rendimiento cuántico del dador, de la orientación relativa entre los dipolos del dador y aceptor, y de la distancia entre las moléculas dadora y aceptora (**Figura 17 A**).

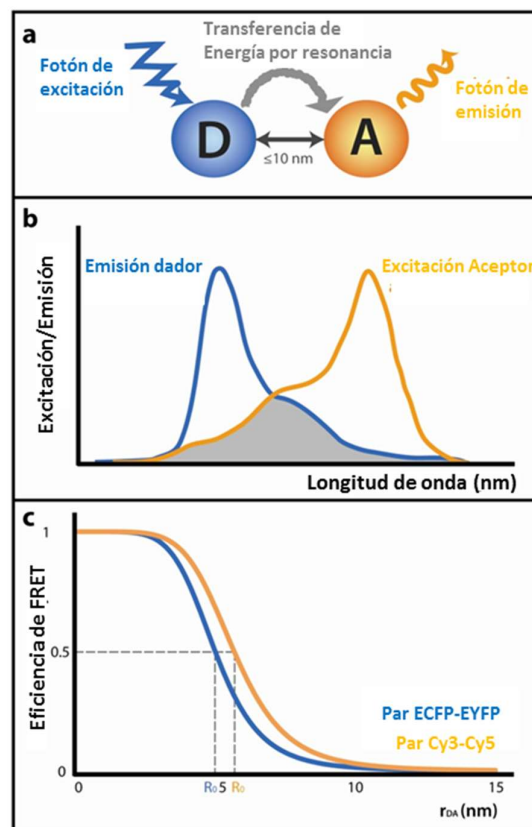


Figura 17. Propiedades del fenómeno de FRET. A. Esquema de transferencia de energía entre una molécula excitada (dador de FRET) y la emisión de la segunda molécula (aceptor de FRET), se indica una distancia óptima de 10 nm entre ellas. B. Solapamiento espectral óptimo entre el espectro de emisión de la molécula dadora y el espectro de excitación de la molécula aceptora. C. La eficiencia de FRET (E) es

dependiente de la distancia entre ambas moléculas. El R_0 es la distancia a la cual se da un 50% de eficiencia de FRET.

La tasa de transferencia de energía de FRET (k_{ET}) está dada por la ecuación de Förster (**eq 1**).

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

$$R_0 = 8.785 \times 10^{-25} (\text{cm}^3 \text{ mol l}^{-1}) \frac{\kappa^2 \phi_d J}{n^4}$$

La cantidad de energía transferida por unidad de tiempo, k_{ET} , es dependiente del τ_d , la vida media del dador en ausencia de moléculas del aceptor; r , la distancia entre el dador y el aceptor; R_0 , la distancia a la cual la eficiencia de la energía de transferencia es del 50% (**Figura 17 C**). La distancia R_0 está determinada por los siguientes parámetros: κ^2 , un factor adimensional relacionado con la orientación del dador y el aceptor; ϕ_d , el rendimiento cuántico del dador en ausencia de moléculas del aceptor; n , el índice de refracción del medio; y J , la integral de la superposición espectral, la cual mide el grado de superposición espectral entre el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor (**Figura 17 B**).

La producción del efecto de FRET conlleva diversos cambios espectrales en el sistema. Primero, la intensidad de fluorescencia del fluoróforo dador decae dado que parte de la energía es absorbida por el fluoróforo aceptor. En segundo lugar, la intensidad de fluorescencia del aceptor se ve incrementada (si el aceptor es fluorescente), debido a la presencia de una fuente de excitación. En tercer lugar, el tiempo de vida del estado excitado del fluoróforo del dador disminuye, debido a que mayor cantidad de energía se ve disipada hacia el aceptor. Sobre esa base física, es que distintos parámetros pueden ser utilizados para evaluar cambios en FRET: 1) la relación de intensidad de fluorescencia dador/aceptor (medida ratiométrica), 2) el aumento de la intensidad de fluorescencia del dador frente al fotoblanqueamiento del aceptor, y 3) la medición del tiempo de vida de la fluorescencia del dador.

La principal ventaja de las sondas basadas en el fenómeno de FRET es la posibilidad de realizar medidas ratiométricas. Las principales desventajas son: 1) sus bajos rangos dinámicos, 2) sus altos pesos moleculares, ya que se componen de al menos dos FPs y polipéptidos accesorios, lo cual puede afectar su correcta distribución celular (en particular cuando deben

traslocar a compartimentos específicos) y 3) cubren un amplio rango del espectro, limitando así el uso de fluoróforos complementarios. La mayoría de las FPs son más o menos sensibles al pH, por lo tanto, sensores FRET con dos cromóforos diferentes pueden tener respuestas complejas al pH (Lukyanov, 2014).

El desarrollo de biosensores FRET se ha basado históricamente en el uso de variantes espectrales que funcionan en el rango de longitudes de onda entre el cian y el amarillo (CFP e YFP). Sin embargo, muchos de los reporteros CFP-YFP han inducido fototoxicidad causada por la fuente de excitación y presentado eventos fotocinéticos complejos como fotoblanqueamiento y fotoconversión. Además, en muchos casos el rango dinámico es tan bajo que los cambios de FRET son marginales y por lo tanto no es posible utilizarlos para medir respuestas bioquímicas sutiles o transientes.

Pares de FRET alternativos entre GFP o YFP y entre OFP (de su sigla en inglés *orange fluorescent protein*) o RFP han sido ampliamente explorados, pero aun así tienen limitaciones. Las proteínas OFPs presentan un bajo tiempo de maduración, rápido fotoblanqueamiento o fotoconversión a especies verdes o rojas (Shaner, 2008) (Kremers, 2009). Respecto a las proteínas RFPs, los pares descritos anteriormente con RFP como aceptor no mejoran la tasa de FRET en comparación a la brindada por los sensores basados en el par CFP-YFP (Kwok, 2008) (Mutoh, 2009).

Un atributo no deseable en los pares FRET es el solapamiento entre el espectro de emisión del dador y el espectro de emisión del aceptor. Este solapamiento en la emisión disminuye la capacidad de cambio, por ejemplo, un aumento en el FRET y por lo tanto en la emisión del aceptor se verá contrarrestada por la reducción de la emisión del dador infiltrada en el canal de emisión del aceptor. El par CFP-YFP, por ejemplo, muestra un extenso solapamiento de las emisiones del dador y del aceptor. Otra característica importante en los pares FRET, es la eficiencia de FRET (E) entre las proteínas del par. La eficiencia de FRET (E) se encuentra relacionada con la distancia inter-fluoróforo (r , **eq. 1**) por una curva sigmoide descrita por la ecuación de Förster (**eq. 1**). Esta curva (**Figura 17 C**) presenta el punto más pronunciado en su punto medio, donde E es igual a 0,5 y r es igual a la distancia a la cual la eficiencia de la energía de transferencia es del 50 %, R_0 , un parámetro que depende de las propiedades fisicoquímicas del par FRET y de la ubicación del dipolo de transición de emisión del dador y del dipolo de transición de absorción del aceptor. Como se puede observar en la curva (**Figura 17 C**), pendientes mayores está asociado a proteínas reporteras que operen con un E cercano a 0,5 y a valores mayores de r , en comparación a proteínas reporteras que

operen lejos del 0,5. Valores más grandes de r (≥ 5 nm), está asociado con mayores eficiencias de FRET que tiene como ventaja un incremento en la emisión del aceptor, minimizando la interferencia que puede tener la emisión del dador en el canal del aceptor.

Recientemente se han desarrollado proteínas fluorescentes optimizadas en cuanto a brillo, estabilidad y superposición de características espectrales para efecto FRET (Lam, 2012). El foco ha estado puesto principalmente en la ingenierización de dos proteínas fluorescentes: Clover y mRuby2, que han mostrado tener un brillo y tasa de FRET significativamente superior al descrito para otros pares FRET (Lam, 2012) (**Figura 18**). El par FRET Clover-Ruby2 ha mostrado poseer una elevada fotoestabilidad, rango dinámico de FRET y tasa de emisión de fluorescencia (Lam, 2012), durante el desarrollo de este par se puso especial énfasis en mejorar la separación entre la emisión del dador y la del aceptor y en obtener mayores r (aumentando el rendimiento cuántico del dador, el coeficiente de extinción del aceptor y la integral de superposición espectral entre emisión del dador y excitación del aceptor) (Lam, 2012).

La proteína Clover tiene un máximo de excitación y de emisión a 505 y 515nm, respectivamente, los cuales se encuentran entre los correspondientes a EGFP y EYFP. Sin embargo, a diferencia de estas últimas, su coeficiente de extinción ($111,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y rendimiento cuántico (0,76) es 2 y 1,3 veces superior a la EGFP (Day, 2009) (Lam, 2012), respectivamente. Esto convierte a Clover en la proteína más brillante nunca antes caracterizada, siendo 2,5 veces más que la EGFP (Day, 2009), (Lam, 2012) y que otras variantes como, mTurquoise2 (3 veces más, (Goedhart, 2010)) y mTFP1 (1,5 veces más, (Day, 2009)). Clover difiere de la proteína GFP en 10 mutaciones (S30R, Y39N, S65G, Q69A, N105T, Y145F, M153T, V163A, I171V y T203H) que impactan positivamente en sus parámetros fisicoquímicos.

La proteína mRuby2, es una variante de la mRuby (difiere en cuatro residuos: L15M I102V A119V A131P (Lam, 2012) (Wiedenmann, 2009), cuyo precursor es la proteína eqFP611 (Baird, 2000). mRuby2 mostró tener un espectro similar a mRuby y un brillo mejorado ($\epsilon = 113,000$ versus $112,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\phi = 0.38$ versus 0.35, (Lam, 2012)). A diferencia de la mRuby, la cual muestra cierta fotosensibilidad (10% de pérdida de fluorescencia en 2 segundos) y foto blanqueamiento (vida media de 101 segundos) cuando es expuesta a una lámpara de Xenon, la mRuby2 mostró ser menos fotosensible con un decaimiento mono-exponencial y vida media de 121 segundos (Kredel, 2009). Además, se ha visto que la proteína mRuby2 puede funcionar con una gran cantidad de fusiones a diferentes proteínas subcelulares tanto en su C-terminal o en su N-terminal, por ejemplo, mRuby2-18aa- α -tubulina (microtúbulos), mRuby2-7aa-Rab5a

(endosomas) y mRuby2-10aa-H2B (nucleosomas) (Lam, 2012).

El par Clover-mRuby2 presenta un alto ϕ_D (rendimiento cuántico del dador; 0.76; **Figura 18 C**), ϵ_A (extinción molar del aceptor; 113,000 M⁻¹cm⁻¹; **Figura 18 C**) y un óptimo solapamiento entre el espectro emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor. (**Figura 18 B**). Como resultado, esta combinación de fluoróforos tiene un R_0 de 6.3nm (un valor nunca antes visto para ningún otro par FRET, **eq. 1; Figura 18 C**). Recordar que es la distancia a la cual la eficiencia de la energía de transferencia es del 50%, un valor promedio de R_0 es de 5 nm, por lo que el valor del rendimiento cuántico del dador en ausencia de moléculas del aceptor y la integral de la superposición espectral, la cual mide el grado de superposición espectral entre el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor son mayores a lo habitual, obteniendo una eficiencia de FRET nunca antes conseguida. El par Clover-mRuby2 debería permitir realizar imagenología y ensayos *in vivo* con menos citotoxicidad y con una mayor relación señal/ruido que la combinación CFP-YFP, además de ser compatible con láser azul y filtros de excitación comúnmente presentes en la mayoría de los equipos de fluorescencia (citómetros, microscopios).

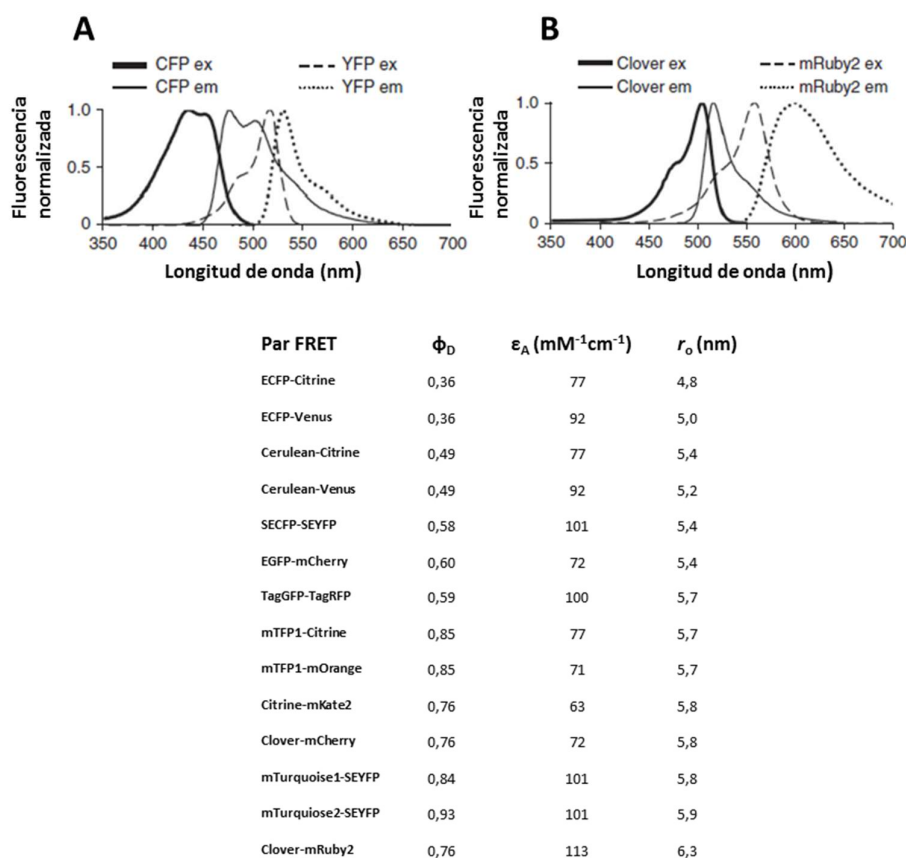


Figura 18. Características y propiedades del nuevo par de FRET Clover-mRuby2. A. Espectro de excitación y de emisión del par FRET CFP-YFP. B. Espectro de excitación y emisión del par FRET Clover-mRuby2. C. Tabla comparativa entre diferentes pares FRET, donde ϕ_D (rendimiento cuántico del dador); ϵ_A (coeficiente de extinción molar del aceptor) y R_0 (es la distancia a la cual se da un 50% de eficiencia de FRET.). Tomado y modificado de (Lam, 2012).

Los sensores de AMPc/GMPc codificados genéticamente basados en FRET hacen uso de los dominios de unión a AMPc presentes en PKA o EPAC, (Zaccolo M. , 2000) (Nikolaev, 2004) y agregan una gran sensibilidad de detección a nivel fisiológico con gran resolución a nivel espacial y temporal. En estos sensores, la proteína fluorescente aceptora de FRET y la proteína fluorescente dadora de FRET, se encuentran unidos por un módulo que contiene la estructura receptora que es responsable de sensar los niveles de AMPc/GMPc presentes en el entorno.

Para el caso de los sensores de nucleótido cíclico, generalmente la molécula detectora es un dominio de unión a nucleótido cíclico (CNBD; del inglés cyclic nucleotide-binding domain) fusionado genéticamente a variantes espectrales de la proteína GFP. Cuando la concentración intracelular de nucleótido cíclico aumenta, se une al CNBD, desencadenando un cambio

conformacional alostérico que modifica la distancia relativa y orientación de ambos fluoróforos, traduciéndose en un cambio en la señal de FRET.

Los primeros sensores de FRET para AMPc fueron desarrollados en la década de los 90 por el grupo de Tsien. El sensor (FICRhR) generado por este laboratorio consistió de una PKA dependiente de AMPc donde las subunidades catalíticas (C) y regulatorias (R) fueron conjugadas a diferentes sondas fluorescentes, fluoresceína y rodamina, capaces de hacer FRET entre ellas cuando la holoenzima se encuentra en su forma tetramérica (R2C2). Cuando las subunidades R unen moléculas de AMPc se disocian de las subunidades C, con lo cual aumenta la distancia entre los fluoróforos, disminuye el efecto FRET y aumenta la emisión de fluorescencia del dador a expensas de la no captación de fluorescencia por parte del aceptor (**Figura 19 A**). Si bien el sensor FICRhR ha sido empleado para monitorear AMPc en células vivas, sus principales desventajas son su preparación (se necesita de un marcado *in vitro*, purificación), incorporación intracelular (microinyección del holotetrámero de 170kDa) y uso limitado a ciertos tipos celulares.

Posteriormente, el grupo de Zaccolo (Zaccolo M. , 2000) (Zaccolo M., 2002) exploró el desarrollo de sensores de AMPc codificados genéticamente que superaran las limitaciones presentadas por el FICRhR (Adams, 1991), (Bacskai, 1993). Se generaron con este fin, un gran número de quimeras donde proteínas modificadas de la GFP (variantes S65T (mutación S65T, ex 510nm; em 545nm) y EBFP (EBFP, ex 380 nm; em 460nm) fueron fusionadas en cualquiera de sus extremos (N- o C- terminal) a la subunidad reguladora (RI o RII) o a la subunidad catalítica (C) de la PKA (**Figura 19 B**, (Zaccolo M. , 2000). De todas las conformaciones evaluadas, las dos fusiones que mostraron mejores resultados y que consistieron en la primera generación de este tipo de sensores, fueron la fusión en el extremo C-terminal de las subunidades catalítica (C) y la subunidad regulatoria RII de la PKA a S65T y a EBFP, respectivamente, a través de un linker de 11 aminoácidos (C-S65T y RII-EBFP, **Figura 19 B**), , que en estado basal (baja concentración de AMPc) fueran capaces de realizar FRET entre sí y que dicho fenómeno de FRET no tuviera lugar o disminuyera significativamente frente al incremento intracelular de AMPc, provocado justamente por la separación de las subunidades regulatoria y catalítica de la PKA (**Figura 19 B**). La co-transfección con ambas construcciones (C-S65T y RII-EBFP) en distintos tipos celulares mostró un ratio 460/545 (excitación 380nm, óptimo para EBFP) de 1,5 y 2,5 , mientras que el ratio 460/545 fue de 4 y 5 cuando se analizaron células co-transfectadas con los controles de FPs individuales (EBFP y S65T, es decir no fusionadas a las subunidades de PKA) o bien las quimeras conteniendo las FPs fusionadas al extremo N-terminal de las correspondientes subunidades de la PKA fusiones (EBFP-C y S65T-

RII, **Figura 19 B**). Estas diferencias en el ratio indicaron que, en la holoenzima, las proteínas EBFP y S65T se encuentran cercanas al estar fusionadas por el C-terminal a la subunidad reguladora RII de la PKA(RII-EBFP) y a la subunidad catalítica (C-S65T), respectivamente. El FRET entre estas dos construcciones fue confirmado, por un lado, al observar un pico de emisión a 511 nm en células CHO co-transfectadas, mientras que este pico no fue observado en los controles de las FPs individuales ni de las quimeras conteniendo las FPs fusionadas al extremo N-terminal y por otro lado, por la observación de un aumento en el ratio 460/545 frente al tratamiento con agentes estimulantes de la producción de AMPc, como forskolina y dibutiril AMPc (dbAMPc), sin verse modificado el valor de la relación en los controles. Debido a ciertas limitaciones observadas para este sensor de FRET compuesto por dos construcciones, como por ejemplo, la necesidad de una expresión equimolar de las quimeras dentro de la célula, la interacción requerida entre las construcciones co-transfectadas asociado a las propiedades catalíticas y mecanismo de cooperatividad necesario (unión cooperativa de AMPc a sitios de diferente afinidad), es que otros grupos de investigación continuaron con el desarrollo de sensores más simples y más eficientes.

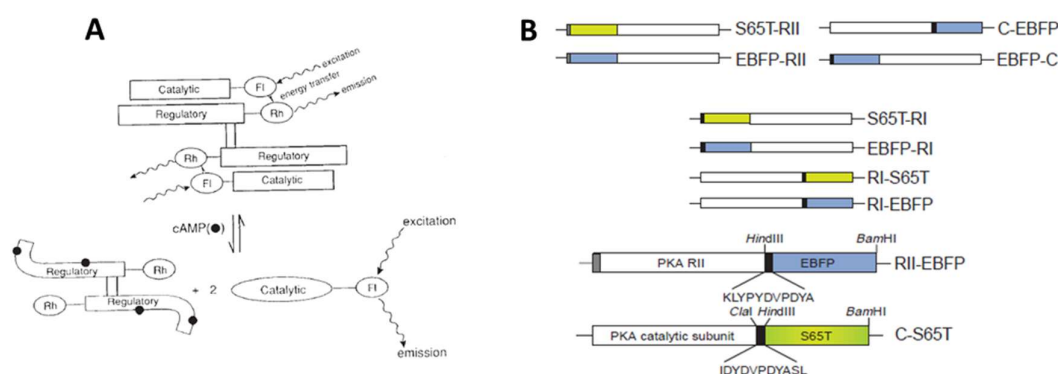


Figura 19. Esquema de sensores de AMPc bi-moleculares y tipo FRET basados en PKA. A. Sensor FICRHR, tomado de (Adams, 1991). B Representación de alguna de las quimeras evaluadas. En recuadro negro, el linker peptídico; RI: subunidad reguladora I de la PKA. Para las construcciones RII-EBFP y C-S65T se muestra la secuencia aminoacídica del linker; C: subunidad catalítica de PKA. Tomado y modificado de (Zaccolo M. , 2000).

En el año 2004, Nikolaev y colaboradores desarrollaron diferentes sensores para detectar AMPc donde las proteínas EYFP (del inglés, *enhanced yellow fluorescent protein*) en el N-terminal y la ECFP (del inglés, *enhanced cyan fluorescent protein*) en el C-terminal se encontraban ligadas entre ellas por un polipéptido que contiene los dominios de unión a AMPc

de Epac o PKA (Nikolaev, 2004) (**Figura 20**).

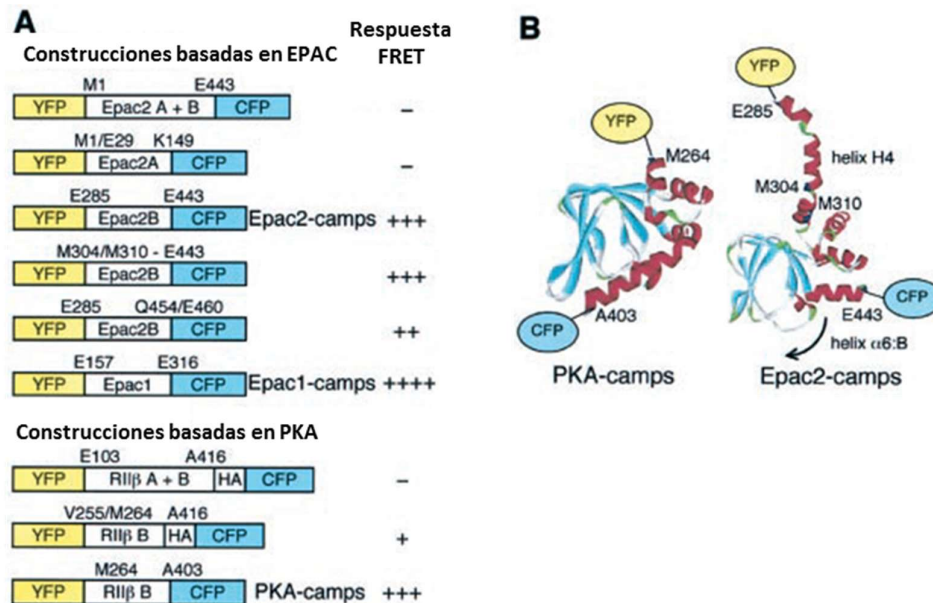


Figura 20. Desarrollo y funcionamiento del sensor Epac2-camps. A. Grupo de construcciones generadas con el dominio de unión a nucleótido cíclico de la proteína EPAC o PKA fusionado a la proteína YFP (extremo N-terminal) y a la proteína CFP (extremo C-terminal). B. Mecanismo de acción del sensor Epac2-camps frente al agregado de AMPc. Tomado y modificado de (Nikolaev, 2004).

Para ambos tipos de sensores se generaron y estudiaron diferentes construcciones y mutantes de los dominios de Epac 1 y 2 y de la subunidad II reguladora de PKA (**Figura 20A**). Basado en datos estructurales obtenidos previamente por (Rehmann, 2003), se propuso que posicionando la proteína YFP directamente en el N-terminal en la α -hélice 4 y la proteína CFP en el C-terminal en la α -hélice 6 del dominio B de unión de AMPc de la proteína Epac 2 conllevaría un aumento en la distancia entre ambos fluoróforos causado por un cambio conformacional inducido por la unión de AMPc. (**Figura 20 B**). Confirmando esta hipótesis, el sensor denominado Epac2-camps mostró una disminución de FRET frente a la adición de AMPc. La respuesta a AMPc mostró ser específica ya que en ensayos *in vitro*, otros nucleótidos produjeron una pérdida marginal de FRET. El sensor Epac2-camps permitió obtener información sobre la organización espacio-temporal de la señalización por AMPc dentro de las células, revelando la propagación rápida (milisegundos) de gradientes de AMPc desde el sitio de activación del receptor, lo cual resultó ser más rápido de lo descrito anteriormente. A

diferencia del sensor tetramérico de PKA (Zaccolo M. , 2000) que presenta restricciones de distribución subcelular condicionado por la unión a las proteínas AKAP, el sensor Epac2-camps mostró distribuirse en todo el citosol y responder de manera sensible al AMPc libre.

Sin embargo, se ha reportado que la dinámica de la señal de FRET y, por lo tanto, la detección de AMPc se vio afectada cuando se incorporan señales de localización subcelular en las regiones amino- y carboxi- terminal de las FPs que flanquean al dominio de unión a nucleótidos (Herget, 2008) (Surdo, 2017). Se postuló que las secuencias de localización subcelular interfieren, mediante efecto estérico, con los cambios conformacionales que se requieren para la aproximación de ambos módulos fluorescentes en presencia de AMPc (Surdo, 2017) (Chao, 2019). De todas formas, el sensor Epac2-camps fue empleado para el estudio espacio-temporal de la señalización por AMPc en diferentes tipos celulares (Nikolaev, 2004) (Storch, 2017) (Berrera, 2008).

Con el objetivo de superar dichas limitaciones, recientemente se desarrolló un nuevo sensor para AMPc denominado CUTie (del inglés, cAMP universal tag for imaging experiments), que si bien se compone de los mismos elementos modulares presentes en el sensor Epac estos difieren en su disposición (**Figura 21 A**) (Surdo, 2017). La principal diferencia radica en que la secuencia codificante para la YFP se inserta en el loop 4-5 del CNBD, conservándose la fusión de CFP a la región C-terminal del CNBD. Este diseño estuvo sustentado por análisis de secuencias y simulaciones moleculares que mostraron que dicha modificación sería compatible con el correcto plegamiento tanto del CNBD como de la YFP. Por otro lado, esta nueva arquitectura molecular deja libre el extremo amino terminal del CNBD al cual se le pueden agregar diferentes péptidos señal sin que esto comprometa los cambios conformacionales e interacción entre las FPs. Otro aspecto destacado del biosensor CUTie es que, al contrario del sensor Epac2-camps, la unión de AMPc conlleva un incremento de la señal de FRET (**Figura 21 C**). Por lo tanto, la detección de AMPc a través de CUTie se dará por ganancia y no por pérdida de señal. Esto es muy relevante ya que diversos factores inespecíficos pueden contribuir a una menor señal de FRET no así a su incremento.

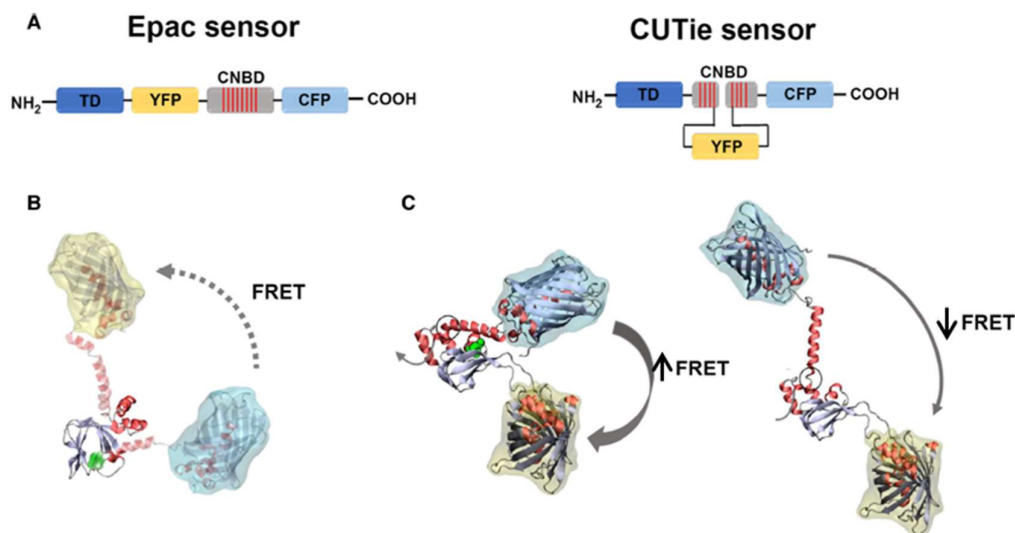


Figura 21. Configuración molecular de los sensores Epac y CUTie. (A) Representación esquemática de los sensores Epac y CUTie. CNBD, dominio de unión a nucleótido cíclico; TD, dominio blanco. (B) Modelo del sensor Epac construido utilizando la estructura de Epac2. Se encuentra coloreadas diferentes estructuras secundarias del CNBD (rojo: hélice; gris: región enrollada; celeste: hoja beta) y en esferas verde el AMPc. Las hélices del extremo amino y carboxi terminal del CNBD se encuentran semitransparentes resaltando que el mecanismo alostérico responsable de aumentar el FRET en ausencia de AMPc no está del todo confirmado. (C) El sensor CUTie en su conformación unida a AMPc y libre de AMPc. Las estructuras están coloreadas como en (B). Tomado y modificado de (Chao, 2019).

1.4 Aplicaciones de los sensores redox y de AMPc en procesos biológicos.

Los biosensores codificados genéticamente revolucionaron la capacidad de estudiar diferentes metabolitos y procesos, al permitir realizar medidas directas, en tiempo real y compartimento-específicas en células intactas (Schwarzländer, 2016) (Berrera, 2008) (Nikolaev, 2004) (Chao, 2019) (Belousov, 2006) (Björnberg, 2006) (Gutscher, 2008).

En lo que refiere a los biosensores redox, la primera cuestión a tener en claro es que la selectividad del sistema reportero está determinada en gran medida por el contexto fisiológico en el cual se encuentre inmerso el biosensor, el módulo traductor de señal que a éste se le acople y su cinética de reacción con la FP redox sensible, así como el potencial redox de las cisteínas de la FP. Equívocamente, una numerosa cantidad de artículos científicos reportan el

uso de roGFP2 como sonda para ERO (Pal, 2013). Sin embargo, la roGFP2 (así como tantas otras FPs relacionadas) no reacciona con la mayoría de los ERO en condiciones fisiológicas ya que sus cisteínas presentan una baja reactividad contra esas especies. La reacción directa de la roGFP2 al peróxido de hidrogeno sería cinéticamente insignificante (Muller, 2017), (Schwarzländer, 2016), así como el ácido hipocloroso (producido por los macrófagos durante el estallido respiratorio (Winterbourn, 2006) (Tlili, 2011) o el peroxinitrito, ambos potentes agente oxidantes que tampoco provocarían una respuesta sobre la cisteínas de la roGFP2 en las condiciones de concentraciones y tiempo en que se han evaluado, observándose solamente una directa oxidación sobre la roGFP2 frente a concentraciones de ERO extremas no fisiológicas (Muller, 2017). A nivel intracelular, la oxido-reducción de la roGFP2, y de otras FPs redox sensibles, es catalizada por la Grx endógena a expensas de la relación GSH/GSSG (Dooley, 2004) (Gutscher, 2008). Por lo tanto, desprovistos de elementos traductores estos biosensores reportan el estado del pool intracelular de GSH/GSSG donde la disponibilidad de Grx limitará la velocidad de respuesta del sensor. El acople de diferentes elementos traductores capaces de reaccionar con la roGFP2 dio lugar a la generación de biosensores de segunda generación que consistieron en fusiones de FPs redox sensibles a Grx (hGrx-roGFP2 (Meyer, 2010), Grx1p-roGFP2 (Gutscher, 2008), micorredoxina (Mpx-roGFP2, (Bhaskar, 2014)), bacilirredoxina (Brx-roGFP2, (Loi, 2017)), triparredoxina (Tpx-roGFP2, (Ebersoll, 2020)), peroxidasa (Orp1-roGFP2 (Gutscher M. , 2009)), HyPer, HyPer-2, HyPer-3 y HyPer7 (Belousov, 2006), (Markvicheva, 2011), (Bilan D. S., 2013), (Pak, 2020), TriPer (Melo, 2017) y NeonOxIrr (Subach, 2019), peroxirredoxinas (roGFP2-Tsa2CR, (Morgan, 2016), 3-mercapto piruvato sulfuro-transferasa (Moseler, 2021), o Tiorredoxina (Trx-rxRFP, (Fan Y. , 2017) , los cuales presentaron mejores cinéticas y especificidad en la respuesta a insultos oxidativos o sustratos redox activos o no. No obstante, aún se carece de sensores con especificidad por el anión superóxido, hidroperóxidos de lípidos así como de una ampliación de las variantes de FPs fusionadas a algunos de estos los elementos traductores, lo cual permitiría extender el rango espectral de los biosensores específicos.

Los biosensores redox basados en FP han sido empleados con éxito para el monitoreo dinámico, en tiempo real, en células y organismos completos vivos (Dooley, 2004) (Gutscher, 2008). Algunos ejemplos de aplicaciones de estos sensores redox codificados genéticamente se mencionan a continuación en la sección, pero se puede encontrar en la literatura, 1) el uso de los sensores roGFP para medir y cuantificar el potencial redox citosólico en diferentes especies (*Mycobacterium tuberculosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei brucei*) 2) para dilucidar la importancia de vías redox de señalización

asociado a diferentes patologías como el cáncer (Chen Y. , 2016) (Bräutigam, 2016), la diabetes (Rochette, 2014), las enfermedades neurodegenerativas ((Breckwoldt, 2014) (Niedzielska, 2016), e 3) identificar y evidenciar la función de proteínas que no han sido estudiadas hasta el momento.

Una de las aplicaciones más acertada de los sensores redox basados en proteínas fluorescentes es poder evidenciar el estrés redox inducido por compuestos tóxicos, por ciertas características genéticas y/o condiciones de cultivo. A partir de esta información es que se podrá conocer el mecanismo de acción molecular de diferentes oxidantes y de su interacción con diferentes vías celulares, en particular con los sistemas antioxidantes, permitiendo delucidar la función de algunos genes y sus productos codificantes relacionados con el metabolismo redox.

Un ejemplo es el caso de *M. tuberculosis* (Mtb), un patógeno de relevancia y significancia en salud pública, que provoca la enfermedad Tuberculosis en aproximadamente 10 millones de personas anualmente (MacNeil, 2020). El estudio de las características metabólicas de Mtb, así como tener mayor conocimiento sobre la capacidad de resistencia al daño oxidativo, son de gran importancia para el descubrimiento de nuevos fármacos. En el trabajo de (Arumugam, 2019), utilizando la sonda redox Mrx1-roGFP2 para hacer medidas de E_{MSH} , se identificaron posibles roles del operón MmpS6-MmpL6 sobre la fisiología de Mtb, este operón vería activada su expresión en presencia de diferentes compuestos redox activos (Triclosan, Plumbagina, Juglone) teniendo una función importante en la capacidad de Mtb de tolerar el estrés redox, la sonda Mrx1-roGFP2 mostro de igual manera una disminución en la relación micotiol reducido (MSH) y micotiol oxidado (MSSM) (Arumugam, 2019).

El trabajo de (Linzner, 2019), dedicado a la investigación del rol fisiológico de YpdA en *S. aureus* es otro ejemplo de cómo el uso de biosensores redox basados en proteínas fluorescentes aporta sobre la función de proteínas que no han sido aun exploradas (Linzner, 2019). La bacteria *S. aureus*, al igual que otros firmicutes, utiliza el bacilitiol como principal tiol de bajo peso molecular para mantener el estado redox, detoxificando antibióticos y electrófilos tóxicos (Chandrangsu, 2018). Si bien se ha establecido que las proteínas BrxA y BrxB serían capaces de realizar la reacción de-bacilitiolación (Gaballa A. , 2014), el responsable de la reducción del bacilitiol (BSH) permanece desconocida. Evidencia bioquímica (Mikheyeva, 2019) y genética (Gaballa, 2010) indicaría que la proteína YpdA tendría el rol de reducir el BSH, datos experimentales muestran que la sobreexpresión de YpdA aumentaría el nivel de BSH y contribuiría a la resistencia al estrés oxidativo (Mikheyeva, 2019). Haciendo uso de las sondas

Brx-roGFP2 y Tpx-roGFP2, (Linzner, 2019) investigaron la vía de electrones entre BrxA/BSH/YpdA bajo diferentes condiciones fisiológicas, obteniendo resultado que apoyan la hipótesis.

Por otro lado, más recientemente, el uso de sensores redox basados en proteínas fluorescentes se ha utilizado en investigaciones sobre la enfermedad diabetes. (Reissaus, 2019), desarrollaron una nueva plataforma para estudiar células del islote pancreático en modelo in vivo. Esta plataforma combina la expresión de biosensores en células de un animal vivo y microscopia intravital. El uso de imagenología abdominal permite la observación de repetidas veces del mismo ratón por varias semanas. En este trabajo, los autores demuestran la eficacia de su método en un modelo de diabetes inducido farmacológicamente. Inyecciones de estreptozocina (antibiótico que tiene propiedades antitumorales, que posee una acción citotóxica sobre las células beta del páncreas) inducen la oxidación del citoplasma de las células beta del páncreas, que fue medido por la sonda hGrx-roGFP2, sin embargo, el estado redox de las células vuelve a su estado normal luego de las dos semanas de tratamiento (Reissaus, 2019).

Al momento se conoce que la disfunción mitocondrial contribuye al desarrollo de esta patología (Galvan, 2017). Estudios hechos en ratones db/db, en un modelo genético para estudiar diabetes, el biosensor roGFP2 dirigido a la matriz mitocondrial, mostró que las mitocondrias del ratón diabético se encuentran más oxidadas que en ratones control sanos (Galvan, 2017) (Galvan D. , 2019). Además, las mitocondrias en el ratón diabético mostraron una fisión excesiva (Galvan D. , 2019). La fisión mitocondrial está regulada por la proteína Drp1 (Kraus 2017), un ratón diabético mutante en la posición ser600, mostro una mejora en ciertos parámetros bioquímicos e histológicos, una disminución en la fisión mitocondrial, y una normalización en el estado redox de la mitocondria en comparación con un ratón diabético control. Por lo que, la proteína Drp1 podría ser un blanco terapéutico interesante en el tratamiento de la diabetes (Galvan D. , 2019).

Las sondas de FRET de AMPc han sido utilizadas ampliamente para estudiar el funcionamiento del tejido cardíaco, para dilucidar el rol y la compartimentalización de la vía de señalización de AMPc en patologías cardiovasculares. Se ha visto que la señalización de PKA es fundamental en distintas patologías cardiovasculares (Stangherlin, 2012), que lideran índices de mortalidad en el mundo (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>) y el Uruguay, con aproximadamente 30 decesos diarios (<http://www.msp.gub.uy/publicación/estadísticas-de-mortalidad>). Evidencias recogidas en los

últimos años, han mostrado la presencia de alteraciones funcionales en múltiples microdominios subcelulares cardíacos (Nikolaev V. , 2017) y que incluyen a las vías de señalización por los mensajeros secundarios de nucleótido cíclico (Perera, 2015) (Nikolaev V. , 2010) (Zakhary, 2000). La imagenología de células vivas, aisladas, basada en sensores FRET, provee de los medios para poder disecar como la señalización ocurre dentro de la célula en tiempo y espacio. Técnicas de imagenología en tiempo real de AMPc, han potenciado notoriamente los conocimientos sobre la distribución y la naturaleza de los dominios de señalización intracelular de AMPc.

La resolución subcelular proporcionada por estos sensores FRET y la posibilidad de monitorear de manera cuantitativa este segundo mensajero en tiempo real aporta una información valiosa sin precedente sobre la dinámica del AMPc (Koschinski, 2015). Con estos sensores FRET, fue posible demostrar que la respuesta de AMPc a la activación de GPCRs no es homogénea dentro de la célula y que la concentración de AMPc es más alta dentro de ciertos sitios subcelulares (Zaccolo M. , 2002), y que los cambios heterogéneos de AMPc provocan que un único subset limitado de proteínas efectoras sean activadas (Di Benedetto, 2008). Otros estudios mostraron que diferentes GPCRs interaccionan con diferentes ACs (Bundey, 2006) generando diferentes pool de AMPc localizados (Houslay, 1997) donde se ve alterado el confinamiento espacial de estos pool frente a la inhibición de las PDEs, indicando el rol clave de estas enzimas en la compartimentalización del AMPc (Mika, 2012) (Stangherlin, 2012) (Cooper, 2014) (Guellich, 2014) (Froese, 2015).

Avances en la técnica basada en FRET, sensores de AMPc han sido genéticamente modificados para ser dirigidos a diferentes compartimentos subcelulares y así monitorear eventos de señalización en sitios específicos de la célula (DiPilato, 2004) (Allen, 2006) (Liu, 2011) (Lefkimmiatis, 2014) (Sprenger J. , 2015) (Agarwal, 2017) (Pendin, 2017) (Surdo, 2017).

La función más importante del AMPc en el corazón es sin dudas, la reacción de lucha o de huida, una respuesta fisiológica ante la percepción de daño, ataque, o amenaza a la supervivencia (Zaccolo, 2021). Esta reacción involucra la activación de receptores β -adrenérgicos (β -ARs) y se manifiesta con efectos cronotrópicos (aceleran frecuencia cardíaca), inotrópicos (aumentan la contracción cardíaca) y lusitrópicos positivos (aumentan relajación de la fibra miocárdica). Estos efectos están asociados principalmente con la fosforilación vía PKA de proteínas que participan en el acoplamiento de la excitación celular y la contracción de los miocitos (Zaccolo, 2021).

Muy recientemente, Nikolaev y col (Bastug-Özel, 2019) desarrollaron un nuevo sensor FRET, el biosensor PLM-EPAC1, al fusionar el sensor EPAC1 (descrito en la **sección 1.3.2**) por su extremo C-terminal al fosfolema (PLM), para monitorear en tiempo real la dinámica de AMPc en la cercanía del complejo Na^+K^+ ATPasa/PLM. Este estudio reveló una estricta regulación localizada de este microdominio por el eje $\beta 2\text{-AR/AMPc/PKA}$ y PDE3, no siendo así en situación de falla cardíaca (Bastug-Özel, 2019).

Utilizando una estrategia similar al grupo de Nikolaev, fusionar sensores FRET a componentes de complejos multiproteicos involucrados con la compartimentalización de AMPc, Surdo y col. (Surdo, 2017) desarrollaron tres sondas de AMPc, una fusionada a la proteína de membrana AKAP79 (AKAP79-CUTie), el cual permite evaluar de forma más precisa la señalización por AMPc y el complejo AKAP79/ $\beta 2\text{-AR/Adenilato ciclase/LTCC}$ en el plasmalema, otra sonda fusionada a la proteína AKAP18 δ (AKAP18 δ -CUTie) dirigida al retículo sarcoplasmático (SR) y otra sonda fusionada a la proteína Troponina I (TPNI-CUTie), dirigida a los miofilamentos, proveyendo de herramientas para estudiar la señalización adrenérgica subcelular en condiciones normales y patológicas de la función cardíaca. En ese estudio se identificó que el agonista β -adrenérgico isoprotenerol (ISO) induce significativamente menores respuestas de AMPc en los sitios de TPNI que en los sitios de AKAP79 y AKAP18 δ . La inhibición de las PDE por tratamiento con IBMX anula totalmente las diferencias en la respuesta de AMPc inducidas por ISO en cualquiera de los tres compartimentos, indicando que la actividad de las PDE es una limitante aún mayor en los niveles de AMPc en los sitios TPNI que en los sitios SR o plasmalema.

Surdo y col. (Surdo, 2017) demostraron también que el compartimento subcelular de los miofilamentos es particularmente sensible a cambios en la señalización por AMPc provocados en situaciones de hipertrofia cardíaca y de falla cardíaca. En miocitos de ratas neonatales expuestos a norepinefrina, un modelo in vitro de hipertrofia cardíaca previamente establecido, ISO induce respuestas a AMPc casi indetectables en los sitios de TPNI en comparación al control (células no hipertrofiadas), mientras que señales de AMPc en los sitios AKAP79 y AKAP18 δ no difieren significativamente del control en comparación a cardiomiocitos enfermos. Estos hallazgos podrían ser de relevancia clínica, la identificación de isoformas de PDE involucradas en la atenuación de la señalización de AMPc sobre TPNI podrían ser utilizadas como nuevos blancos terapéuticos frente a la falla cardíaca.

1.5 Tripanosomátidos como modelo de estudio de la interacción de vías de señalización redox y de AMPc.

1.5.1 *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp.:

Consideraciones generales y ciclo de vida

Los tripanosomátidos son protistas unicelulares y parásitos obligados con la capacidad de infectar diferentes especies animales (Lukeš, 2018). La mayoría de estos parásitos tienen capacidad de infectar insectos hematófagos que actuaran como vectores para la transmisión del agente infeccioso. Dentro de las enfermedades que ocasionan en seres humanos se destacan la enfermedad africana del sueño, la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis. Millones de personas que habitan regiones (sub) tropicales en el mundo están expuestas a estas infecciones que cursan con alto grado de morbilidad y también mortalidad si no reciben tratamiento (Stuart, 2008). Por otro lado, la tripanosomiasis animal ocasiona un gran impacto económico en zonas rurales al afectar la productividad y rendimiento del ganado bovino y ovino principalmente (Giordani, 2016).

Con el fin de desarrollar su complejo ciclo de vida, los parásitos sufren importantes cambios estructurales y metabólicos para adaptarse a las condiciones fisicoquímicas (temperatura, pH, y osmolaridad) y bioquímicas/biológicas (ej. depleción de nutrientes, enzimas digestivas, defensas del huésped) que les impone el medio circundante. La disección de los eventos y componentes moleculares que facilitan dichas adaptaciones es de crucial importancia no solo para comprender la biología del desarrollo de estos patógenos sino también para facilitar el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces y selectivas. A continuación, se describen los aspectos más destacados del ciclo biológico de los tripanosomátidos.

El ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* se divide en 2 etapas: una que incluye la infección del huésped mamífero (ganado u hombre) y otra de desarrollo en un insecto o vector biológico (mosca hematófaga del género *Glossina* conocida como mosca tse-tse, **Figura 22**). Las transiciones entre un huésped y el otro incluyen la diferenciación previa a formas no replicativas en el huésped original pero totalmente pre-adaptadas para sobrevivir y proliferar en el nuevo huésped. *T. brucei* es un parásito extracelular que coloniza la sangre (o linfa en insectos) y los fluidos intersticiales de sus hospederos mamíferos y vectores. En el huésped vertebrado la forma tripomastigota se multiplica por fisión binaria, pero a diferencia de

Trypanosoma cruzi y *Leishmania* spp., *T. brucei* no invade células y tejidos, sino que habita en fluidos incluyendo sangre, fluido intersticial y líquido linfático y cefalorraquídeo (CDC, 2012).

Por su lado, el ciclo de vida de *T. cruzi* comprende una etapa intracelular en un huésped mamífero y otra en el insecto triatomino, involucra tres estadios: epimastigote, tripomastigote y amastigote (**Figura 22**). La forma epimastigota reside en el intestino del insecto que en la porción posterior del mismo y frente a diferentes estímulos y condiciones nutricionales se diferencia hacia la forma tripomastigota metacíclica que es altamente infectiva para mamíferos. La forma tripomastigota corresponde a la forma infectiva residente en el medio extracelular del huésped vertebrado que es incapaz de multiplicarse pero posee gran capacidad de colonizar una amplia gama de tipos celulares. Una vez internalizada, la forma tripomastigota se diferencia rápidamente (horas) a la forma amastigota en el interior de la célula hospedera. La forma amastigota es pequeña y redondeada y posee capacidad replicativa, multiplicándose en el citoplasma de la célula hasta ocasionar su lisis. Este parásito muestra tropismo por células de músculo liso y cardiomiocitos, ocasionando disfunciones a nivel de la conducción nerviosa en el tracto gastrointestinal y el corazón, y la hipertrofia de varios de los órganos afectados.

En las glándulas salivares de su vector insecto, pequeñas moscas del género *Lutzomia*, *Leishmania* spp. se transforma en promastigotas metacíclicas con capacidad de infectar al huésped mamífero (Sacks, 2001). En este último, los parásitos muestran una extraordinaria capacidad para colonizar y sobrevivir casi exclusivamente en células de la línea monocítica (por ejemplo, macrófagos), en la cual residen bajo la forma de amastigotas (**Figura 22**). A diferencia de *T. cruzi*, los amastigotas de *Leishmania* se alojan y multiplican en la vacuola parasitófora (PVs) la cual presenta características de fagolisosoma (Antoine, 1998). Los amastigotas persisten principalmente en bazo e hígado (órganos con gran carga de macrófagos) ocasionando infecciones crónicas, propagando la infección de célula a célula y a moscas no infectadas. La leishmaniasis generalmente se acompaña de inmunodeficiencia debido al compromiso de la línea monocítica por la infección parasitaria (Goto, 2004) (Rodrigues, 2022).

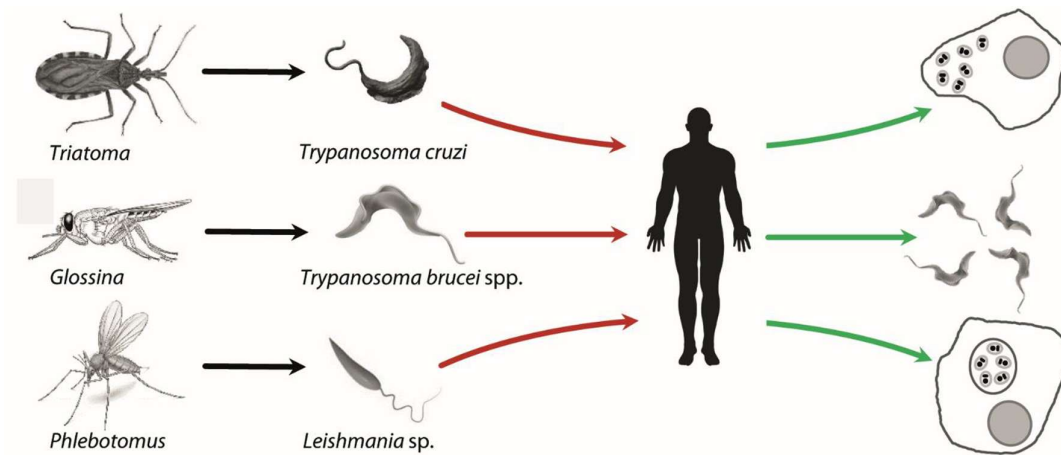


Figura 22. Ciclo de vida de los tripanosomátidos. Cada especie de tripanosomátido es capaz de sobrevivir en un insecto hematófago específico, el cual actúa como vector de transmisión de estadios altamente infectivos (flechas rojas) para mamíferos (ej. humanos, ganado). Luego de una exitosa infección en el huésped mamífero, los patógenos se diferencian a un estadio menos virulento que muestra cierto tropismo especie-específico de tejidos/células del huésped (flechas verdes). La mayoría de los estadios extracelulares de estos patógenos son capaces de infectar nuevas células del mamífero o bien al insecto vector durante la ingesta de sangre. Tomado y modificado (Specker, 2021).

L. tarentolae es un parásito que infecta habitualmente a lagartos, en su mayoría geckos de la especie *Tarentolae annulae*. Fue aislada por primera vez de la especie *Tarentola mauritanica* (Klatt, 2019). En los últimos 30 años, *L. tarentolae* se ha utilizado para una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. En un comienzo se utilizaba principalmente para estudios de edición de ARN y amplificación de genes. Posteriormente se evaluó el uso de este parásito como candidato para la vacuna contra la leishmaniasis humana en modelos animales y para detección de fármacos antiparasitarios así como producción de proteínas recombinantes (Blum, 1990) (Aphasizhev, 2011) (Basile, 2009) (Kushnir, 2005).

En cuanto a la producción de proteínas recombinantes, el sistema de *L. tarentolae* presenta varias ventajas que incluyen el fácil manejo de los cultivos, bajo requerimiento nutricional, rápida tasa de crecimiento con un tiempo de duplicación de 4-6 horas en agitación, alcanza altas densidades celulares (hasta 10^9 cel/mL), fácil adaptación a producciones a gran escala, disponibilidad de métodos para su manipulación genética y la maquinaria completa para realizar modificaciones post-traduccionales, incluyendo glicosilación la cual es muy similar a la producida por mamífero (Kushnir, 2005) (Fritsche, 2007) (Klatt, 2012) (Jørgensen, 2014) (Langer, 2017).

El ciclo de vida de *L. tarentolae* tiene dos estadios diferenciables morfológicamente, el estadio promastigote y el amastigote. En cultivo *L. tarentolae* se encuentra en su forma promastigote móvil al igual que en el insecto, su hospedador invertebrado. Los promastigotes son monoflagelados con una forma tipo de lanza de largo entre 4-12 μm y un ancho de 0,5-3 μm y los amastigotes son más pequeños con forma redondeada con un flagelo rudimentario (Klatt S. , 2019). La distribución geográfica del patógeno *Leishmania* se encuentra en cercano vínculo con la distribución del vector insecto, el cual representa cerca de 100 especies de moscas del género *Phlebotomus* (42 especies) y *Lutzomyia* (56 especies). Estas moscas habitan en zonas tropicales y subtropicales de Asia, África, Australia, sur de Europa, y las Américas, entre las latitudes 50 al norte y 40 al sur (Maroli, 2013). Moscas flebótomos y geckos (*Tarentola annularis* y *T. mauritanica*) infectados con *L. tarentolae* fueron encontradas en el sur de Europa, África del norte, y medio oriente (Elwasila, 1988); (Gomez-Eichelmann, 1988); (Dye, 1989). Sin embargo, la prevalencia de la infección en la población de geckos es desconocida.

Como se discutirá en las próximas secciones, tanto el metabolismo redox dependiente de tioles como la señalización por nucleótidos cíclicos juegan un rol importante en varios de los procesos de diferenciación, adaptación y protección de estos parásitos.

1.5.2 Metabolismo redox y señalización redox de Tripanosomas

Los tripanosomátidos poseen un sistema redox dependiente de tioles que es único al centrarse exclusivamente en el uso del tripanotión [N^1 , N^8 bisglutathionil espermidina, $T(\text{SH})_2$], un ditiol formado por dos moléculas de GSH unidas covalentemente a una molécula de espermidina, como principal cofactor redox de bajo peso molecular (**Figura 23**). El tripanotión fue identificado por primera vez en el tripanosomátido *Crithidia fasciculata* hace más de 25 años atrás (Fairlamb, 1985). Trabajos posteriores confirmaron su existencia en distintas especies de la familia *Trypanosomatidae* (citados en (Krauth-Siegel, 2008)). Confirmando las evidencias bioquímicas recogidas a lo largo de estas últimas décadas en lo que respecta a los componentes del sistema redox de los tripanosomas, los proyectos de secuenciación genómica culminados o en marcha vienen demostrando que estos organismos carecen de: i) glutatión reductasa (GR) y tioredoxina reductasa (TrxR), dos enzimas que contribuyen de manera destacada a la homeostasis redox en gran parte de los seres vivos (Krauth-Siegel, 2008); (Smith, 1992), ii) catalasa (Skodova-Sverakova, 2020), y iii) (selenocisteína) peroxidasas dependientes de GSH (Boveris, 1977); (Boveris, 1980).

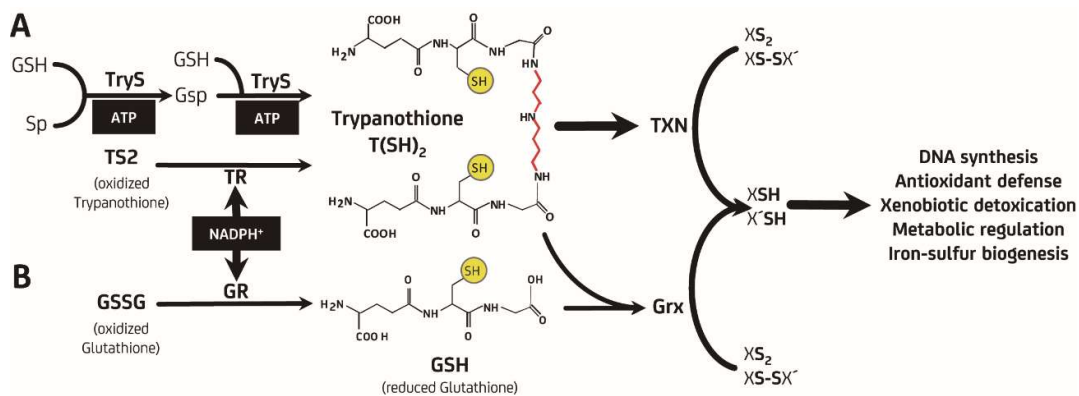


Figura 23. Representación esquemática del sistema redox dependiente de tío de bajo peso molecular en tripanosomátidos y mamíferos) El sistema redox dependiente de tioles de bajo peso molecular de tripanosomátidos depende del bisglutationilperimidina (tripanotión), el cual es sintetizado tras varios pasos por la tripanotión sintetasa (TryS) a expensas de ATP, y el sustrato glutatión (GSH), espermidina (Sp) y monoglutationilperimidina (Gsp). La enzima dependiente de NADPH⁺, la tripanotión reductasa (TR), recicla el tripanotión reducido T(SH)₂ de su forma oxidada (TS2). La oxidoreductasa triparredoxina (TXN), y la glutarredoxina (Grx) reciben equivalentes de reducción del T(SH)₂. La TXN reducida y la Grx catalizan la reducción de diferentes disulfuros proteicos y no proteicos (XS₂ y XS-SX⁻) que cumplen diferentes e indispensables funciones en la célula. B) Los mamíferos carecen de TryS, y por lo tanto de tripanotión, y su sistema redox dependiente de tío de bajo peso molecular depende del glutatión. El glutatión se mantiene en su forma reducida (GSH) por la acción de la enzima dependiente de NADPH⁺, la glutatión reductasa (GR), la cual está ausente en tripanosomátidos. La Grx utiliza GSH como cofactor redox para catalizar la oxidoreducción de diferentes proteínas involucradas en importantes procesos celulares. Modificado de (Alice, 2021).

El sistema básico con el que cuenta el parásito para mantener su equilibrio redox se completa con la enzima encargada de regenerar la forma reducida del tripanotión, la tripanotión reductasa (TR) (Krauth-Siegel, 1987) (Shames, 1986), y una oxidoreductasa multipropósito, la triparredoxina (TXN) (Gommel, 1997) (Montemartini, 1998). La TXN comparte propiedades con la Grx y la Trx, sin embargo, utiliza el T(SH)₂ como sustrato reductor (Nogoceke E., 1997) (Lüdemann, 1998), de este modo aporta control catalítico a las reacciones de oxidoreducción de diferentes blancos moleculares y dependientes del ditiol de bajo peso molecular (**Figura 23**). El hecho que los parásitos sean capaces de soportar el ataque oxidativo durante el proceso de infección y se adapten a diferentes condiciones metabólicas y ambientales durante su ciclo de vida, indica que su sistema redox es bastante robusto para la configuración minimalista que caracteriza al mismo (Krauth-Siegel R. L., 2008).

El $T(SH)_2$ reemplaza al GSH en la mayoría de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro que ocurren a nivel celular. Se ha determinado que $T(SH)_2$ presenta mayor reactividad que GSH en reacciones de oxido-reducción, una propiedad fundamentada en su naturaleza ditiólica y en el hecho que a pH fisiológico sus cisteínas se hayan en su forma desprotonada, tiolato, la cual es más reactiva para intervenir en reacciones de intercambio tiol-disulfuro (Moutiez, 1995). Por otro lado, se ha propuesto que estas propiedades del $T(SH)_2$ favorecen la formación de puentes disulfuro intramoleculares luego de oxidaciones mediadas por uno o dos electrones, previniendo la formación de radicales sulfinilo ($RSO\cdot$), una especie capaz de propagar la oxidación a otras moléculas. Los niveles de $T(SH)_2$ varían a lo largo del ciclo de vida del parásito, por ejemplo para el caso de *T. cruzi* su concentración es de 1,5 - 2,1 mM en epimastigotes, 0,5 mM en tripomastigotes y 0,12 mM en amastigotas (Ariyanayagam, 2001) (Ariyanayagam, 2003) (Maya, 1997) (Thompson, 2003) mientras que para *T. brucei* sanguíneos los valores oscilan entre 0,1 y 0,34 mM y para la forma procíclica el valor es cercano a 0,34 mM (Ariyanayagam M. R., 2001); (Comini M. A., 2007); (Shahi, 2002).

Respecto a la señalización redox, como ya fue mencionado en la **sección 1.1.1**, las principales moléculas señalizadoras son las EROs, las cuales en tripanosomátidos pueden ser producidas endógenamente (por ej. actividad metabólica) o bien por el organismo huésped como parte de su respuesta contra el agente patógeno. Las enzimas Prx y GPx se encuentran distribuidas en diferentes compartimentos subcelulares y tienen la capacidad de detectar pequeñas fluctuaciones en los niveles de H_2O_2 , ONOOH y diferentes hidroperóxidos orgánicos (Diechtierow M. , 2011); (Piacenza, 2008); (Schlecker, 2005); (Tetaud, 2001); (Wilkinson, 2000), (Wilkinson, 2003), por lo que las mismas califican como elementos sensores. En estos organismos, la principal proteína blanco de las peroxidasas es la TXN, la cual reduce con gran eficiencia los disulfuros intra o intermoleculares que se formen en las primeras producto de su reacción los peróxidos. Aún no se han identificado otras proteínas capaces de interactuar de manera covalente con las peroxidasas y que por lo tanto actuaran como efectores de esta cadena de señalización. Dado que la etapa limitante en esta vía de transferencia de electrones lo representa la reducción de TXN por parte de $T(SH)_2$ y dado que esta oxidoreductasa cumple un rol multipropósito interactuando de manera covalente con un gran número de proteínas celulares (Arias, 2015), (Piñeyro M. D., 2011), esto sugiere que en estos organismos gran parte de la señalización y regulación redox será mediada por TXN.

Por otro lado, las Grx se encuentran implicadas en promover y revertir la glutationilación de proteínas por lo que las mismas podrían participar en señalización redox dependiente del GSH (Chai, 2023). Recientemente se ha demostrado que diferentes estímulos oxidativos

fisiológicos, principalmente el H_2O_2 , inducen la glutathionilación (e incluso hasta la tripanotionilación) de un conjunto específico de proteínas de *T. brucei* (Ulrich, 2017). También se observó que en esta misma especie la Grx citosólica contribuye de manera importante a la actividad deglutathionilasa intracelular (Musunda, 2015). De hecho, tanto esta isoforma como la localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria del parásito regularían la actividad de componentes asociados a la adaptación al calor mediante una actividad que depende de sus residuos de cisteína de sitio activo (Ebersoll, 2018). Aunque aún resta identificar las proteínas efectoras de las Grx así como determinar si el mecanismo de regulación/señalización implica la S-(de) tiolación de residuos.

1.5.3 Señalización de AMPc en Tripanosomátidos.

Si bien se tiene constancia que los diferentes estadios de los tripanosomátidos producen AMPc, las vías de señalización dependiente de este segundo mensajero parecen diferir bastante de las utilizadas por los mamíferos. La ausencia de receptores acoplados a proteína G, la presencia de adenilato ciclasas estructuralmente diferentes, el escaso conocimiento sobre los efectores del AMPc, y la necesidad de una rigurosa regulación de AMPc, sugieren una vía bioquímicamente diferente.

Relativo a la AC, los dominios catalíticos de las ciclasas clase II de tripanosomátidos comparten homología con las ciclasas clase III de mamífero, pero difieren de estas en cuanto a estructura y modo de acción (Baker, 2004). Mientras que las proteínas de mamífero presentan 12 dominios transmembrana, las ACs de tripanosomátidos tienen un único dominio transmembrana, con un dominio intracelular C-terminal conservado y un dominio N-terminal extracelular variable y funcionan como dímeros, con la excepción de la recientemente descubierta AC soluble conteniendo hemo de *Leishmania major*, HemACLm, la cual cataliza la producción de AMPc en respuesta a la unión a oxígeno (**Figura 24 A**). La supresión de HemAC-Lm en promastigotes de *L. major* condujo a un aumento de la muerte celular bajo condiciones de hipoxia (Santara, 2013), sugiriendo que la HemAC-Lm tiene un rol destacado en la supervivencia del parásito en respuesta a cambios en la tensión de oxígeno del entorno (**Figura 24 A**). Por otro lado, las ACs de tripanosomátidos presentan una inserción en el dominio de unión a proteínas, que en sus homólogos de mamíferos es importante para la interacción y su activación por proteína G (Roux, 2014), lo cual impediría que tenga lugar dicho mecanismo. Sumado a esto, no se han encontrado en el genoma de los tripanosomátidos homólogos a la

proteína heterotrimérica G (Gould M. K., 2011). El dominio catalítico de las ACs de tripanosomátidos, a diferencia de las de mamíferos, no es activado por la forskolina, mientras que el dominio N-terminal extracelular largo y variable, de manera similar al receptor de la guanilil ciclasa de mamíferos (Garbers, 2006), podría funcionar como receptor directo de ligandos extracelulares (Seebeck, 2004); (Laxman, 2007). La ubicación celular de las ACs de kinetoplástidos por medio de anticuerpos antiESAG4 mostraron especificidad de unión a proteínas de superficie a lo largo del flagelo tanto en la forma sanguínea como en la procíclica (Paindavoine, 1992). Por lo que, la ausencia de proteína G y que las ACs de tripanosomátidos se ubiquen sobre la membrana celular es consistente con el hecho de que podrían tener un rol como receptor (Tagoe, 2015) (**Figura 24 C**).

El genoma de *T. brucei* codifica aproximadamente para unos 80 homólogos de AC, algunos de las cuales, por su nivel de identidad de secuencia, fueron anotados como ESAGs (del inglés *expression site-associated genes*; (Salmon, 2012). Una subfamilia de los genes ESAGs relacionados a ACs, es la ESAG4, cuyos representantes son expresados en altos niveles en la forma tripomastigota proliferativa y no así en la forma no proliferativa (Salmon, 2012). Genes relacionados a la subfamilia de las ESAG4 también fueron encontrados en *T. brucei gambiense*, *T. congolense*, *T. mega*, *T. equiperdum*, y *T. vivax*. Estos genes de AC fueron estudiados, confirmando su capacidad para efectivamente codificar enzimas AC funcionales por medio de ensayos de complementación en levaduras mutantes (Ross, 1991) (Paindavoine, 1992). Ensayos de silenciamiento post-transcripcional de esta subfamilia de genes por ARNi, derivó en parásitos con defectos en la citoquinesis, retardo en las fases del ciclo celular y proliferación celular, así como en una disminución de la virulencia en ratón ((Salmon, 2012), **Figura 24 C**). Esto sugiere que la diversidad en ACs provee de una ventaja adaptativa a los parásitos, favoreciendo la evasión y modulación del sistema inmune, y por lo tanto la supervivencia. En ese sentido, se ha postulado que el comparativamente gran número de ACs existentes en *T. brucei*, respecto de *T. cruzi* y *Leishmania* spp., está relacionado con la mayor necesidad de esta especie (de vida extracelular) por evadir componentes del sistema inmune del huésped (Gould M. K., 2011).

En el genoma de tripanosomátidos se ha identificado la presencia de un homólogo de la PKA (Huang, 2011). En *T. brucei*, se identificó y se denominó TbRSU, a una proteína de 499 aminoácidos de gran homología con las subunidades regulatorias de la PKA de eucariotas (Shalaby, 2001). Estudios posteriores mostraron que si bien TbRSU es capaz de fosforilar y ser inhibida por el péptido inhibidor de la PKA (PKI), no era estimulada por AMPc, no obstante, si era estimulada por GMPc (Shalaby, 2001). La baja conservación de ciertos motivos relevantes

para la interacción con AMPc en la proteína de *T. brucei* condujo a la hipótesis que la misma pudo haber sufrido cambios evolutivos para no depender de AMPc (Gould M. K., 2011).

Por el contrario, la PKA de *L. major* parece depender de AMPc ya que se observó una correlación entre la actividad de PKA y la producción de altos niveles de AMPc por la HemAC. Por su parte, *Trypanosoma cruzi* posee una PKA compuesta por dos subunidades regulatorias (TcPKAr) y dos subunidades catalíticas (TcPKAc) (Ochatt, 1993). Ambas subunidades muestran un mismo patrón de expresión a lo largo del ciclo de vida del parásito (Huang, 2011), lo cual indica que las mismas se encuentran asociadas in vivo. En *T. cruzi*, la inhibición de la PKA por un inhibidor codificado genéticamente provocó la muerte de epimastigotes (**Figura 24 B**) (Bao, 2008). Si bien las moléculas efectoras de esta PKA aún no han sido identificadas ni confirmadas, el estudio de Bao y col. sugirió como posibles moléculas efectoras a miembros de la superfamilia de las transialidasas. Los tripanosomátidos son incapaces de producir ácido siálico y por lo tanto recurren a estas enzimas para transferir este azúcar desde glicoproteínas del huésped hacia las propias, logrando así lo que se denomina mimetización molecular y el ocultamiento de potenciales componentes antigénicos de sus proteínas de superficie (Frasch, 2000); (Frasch, 1994); (Schenkman, 1994). Es así que las transialidasas cumplen un rol muy importante en la evasión del sistema del complemento, en la adhesión e invasión de las células huésped (**Figura 24 B**). Esta correlación entre la producción de AMPc, la actividad de PKA y la expresión de transialidasa se cree que favorece la diferenciación de epimastigotas a tripomastigotas, y por lo tanto confiere un rol destacado a la señalización por AMPc en la diferenciación e invasión de *T. cruzi* (Huang, 2011).

A pesar de que el AMPc ha estado implicado en importantes funciones celulares en los tripanosomas, aún se desconocen cuáles son las principales moléculas efectoras que median estas actividades. Como ya fue mencionado más arriba, el único posible efector identificado, PKA, no participaría como tal en *T. brucei* (Shalaby, 2001), con este objetivo se realizaron diferentes ensayos en busca de identificar nuevos posibles efectores.

Los primeros efectores de AMPc en *T. brucei* fueron identificados por Gould et al. en un ensayo de ARNi de resistencia a la inhibición de PDE (Gould, 2013). Los genes identificados como posibles efectores de AMPc fueron denominados proteínas de respuesta a AMPc 1-4 (CARP1-4). Al igual que varios otros componentes de esta vía de señalización del AMPc (como ser ACs, PDEs), CARP1 y CARP4 fueron encontrados en el proteoma flagelar (Bachmaier, 2023). Recientemente, el homólogo de CARP1 en *T. cruzi*, el TcCLB.508523 ha sido reportado de ser

capaz de unir nucleótido cíclico, utilizando AMPc y GMPc (Jäger, 2014), y validando de esta manera el rol de CARP1 como un efector de AMPc. CARP2-4 son proteínas de función aún desconocida pero alguna de ellas como CARP4, tiene ubicación flagelar, consistente con un posible rol regulando la señalización por AMPc (Gould, 2013). El flagelo se extiende desde la zona anterior, naciendo en el bolsillo flagelar (invaginación en el cuerpo del parásito, próximo a los cuerpos basales y ADN mitocondrial), a lo largo del cuerpo del parásito y por fuera de este en la zona posterior. Además de contribuir a la motilidad, adhesión celular, esta estructura cumple una función esencial en el proceso de división celular (Sun, 2018); (Ralston, 2009); (Gluenz, 2011).

Hoy en día hay escasa evidencia de producción de GMPc en tripanosomátidos, sin embargo, la actividad de guanilato ciclasa ha sido descrita en *L. donovani* (Karmakar, 2006).

Las PDEs tienen un dominio catalítico bien conservado cercano al C-terminal y pueden contener varios dominios reguladores en el N-terminal (Laxman, 2007); (Shakur, 2011), el cual puede presentar diversas extensiones (Gancedo, 2013). Las PDEs contienen, además de los sitios catalíticos, sitios de unión a nucleótido cíclico. Las fosfodiesterasas se pueden agrupar de acuerdo a sus diferencias en los dominios catalíticos en 3 clases. Las PDEs clase I se encuentran en todos los eucariotas, siendo la única forma de PDEs en eucariotas más evolucionados (Beavo, 1995) y son las únicas enzimas capaces de hidrolizar eficientemente los nucleótidos cíclicos.

Hay cuatro grupos de PDE clase I de AMPc en tripanosomátidos (PDE A-D), que son estructuralmente similares a la de los humanos (Gould M. K., 2011) y no hay PDEs de otras clases (Beavo, 1995). Como fue comentado en la **sección 1.1.2**, las PDEs son hidrolasas que convierten el AMPc o el GMPc en su correspondiente 5' monofosfato (5'-AMP y 5'-GMP; (Alonso, 2007). Esto las hace importantes actores en la vía de señalización ya que regulan la degradación de estos nucleótidos cíclicos, y por lo tanto son relevantes en determinar las concentraciones a nivel celular y subcelular (Bender, 2006). A lo largo de estos últimos años, varios grupos de investigación en el área han puesto foco en desarrollar y evaluar nuevos fármacos que tienen como blanco las PDEs de protozoarios (Makin, 2015), (Sebastián-Pérez, 2018), (Saha, 2020), (Koning H. P., 2012), (Laxman, 2007), (Seebeck, 2011), (Gould, 2013), (Blaazer, 2015).

En *T. brucei*, TbrPDEB (TbrPDEB1 y TbrPDEB2) se presenta como una pequeña familia de genes con gran homología a las PDEs de mamífero (Tagoe, 2015). Basado en estudios de

inhibición, TbrPDEB1 mostro ser esencial para la proliferación del parásito y regulación del nivel de nucleótido cíclico (Zoraghi, 2002). Sin embargo, el parásito expresa dos PDEB alelos, TbrPDEB1 y TbrPDEB2, que podrían uno compensar la función del otro. La supresión de TbrPDEB1 y TbrPDEB2 indujo severos defectos en el ciclo celular (parásitos poliflagelados y polinucleados) y muerte celular, tanto *in vitro* como *in vivo* (Oberholzer, 2007) (**Figura 24 C**). Estos parásitos presentaron una menor capacidad infectiva en ratones lo cual demuestra que la desregulación de la señalización por AMPc disminuye la virulencia *in vivo* del tripanosoma africano. De manera llamativa, estas dos isoformas presentan ubicaciones celulares diferentes, TbrPDEB1 se ubica únicamente en el flagelo (Oberholzer, 2007) mientras que TbrPDEB2 tiene ubicación flagelar y citosólica (Oberholzer, 2007), el silenciamiento únicamente de TbrPDEB2 no mostro afección de viabilidad celular, por lo que, la reducción de la actividad PDE en el flagelo sería crítica en la supervivencia del parásito (Tagoe, 2015).

Por otro lado, se han descrito tres PDE específicas de *T. cruzi*: TcrPDEB2, la primer PDE clonada y caracterizada bioquímicamente, muy asociada al flagelo (D'Angelo, 2002); TcrPDEA1, resisten a los clásicos inhibidores de PDE (Alonso, 2007); y la TcrPDEC2 que ha sido encontrada en epimastigotes de *T. cruzi* el complejo de la vacuola contráctil (CVC) a través de la unión al dominio FYVE (Schoijet, 2011). El dominio FYVE es un dominio de unión a dedo de zinc de 60-70 aminoácidos que reconoce de manera específica al 3-fosfato fosfatidil inositol (PI 3-P) y que recluta diversas proteínas a membranas ricas en PI 3-P (Kutateladze, 2007). La CVC tiene una función esencial en *T. cruzi* ya que en respuesta al estrés hiposmótico de la célula huésped esta organela incorpora eficientemente metabolitos osmóticamente activos, lo cual se acompaña de un ingreso de agua que luego será secretada por el bolsillo flagelar (Docampo, 2011). La inhibición de TcrPDEC2 desencadenó una desregulación en la respuesta a estrés osmótico (**Figura 24 B**) (Schoijet, 2011). El potencial de TcrPDEC2 como blanco en desarrollo de nuevos fármacos fue validado por un *screening* de alto rendimiento con una serie de inhibidores de PDE (Wang, 2012), el cual permitió la identificación del compuesto CpdA (tetrahidroptalazinona A; (Salmon, 2012)). Estos estudios dan un puntapié a que la vía de señalización por AMPc sea un blanco candidato para el desarrollo de nuevos fármacos (Wang, 2012).

En *Leishmania*, específicamente en *L. donovani*, se observó que ciertas condiciones (temperatura 37 °C y pH 5,5) son claves para disparar la diferenciación de promastigote a amastigote favoreciendo la adaptación al estrés oxidativo durante la invasión temprana de los macrófagos y potenciado la infectividad (Bhattacharya, 2009); (Biswas, 2017). Este proceso de

diferenciación se vio asociado con el aumento de 3-4 veces del nivel de AMPc y de la actividad PKA (Bhattacharya, 2009). Otros estudios, mostraron un rol importante del AMPc en la quimiotaxis y en la inducción de la reversión de la onda flagelar (Mukhopadhyay, 2016), sugiriendo la existencia de un mecanismo de regulación del AMPc en este parásito. De manera similar a los otros kinetoplastidos, *Leishmania spp.* codifica para al menos 7 PDEs diferentes (Saha, 2020). La estructura cristalográfica de PDEB1 y PDEB2 de *L. major* ha sido determinada, y la superposición con las PDEs de humanos reveló la presencia de un bolsillo parásito específico (p-pocket) cercano al sitio de unión al inhibidor (Wang, 2007). El p-pocket no sería accesible a inhibidores de PDEs de humanos debido a diferencias en los residuos que permiten la entrada, lo cual lo aíslan del sitio catalítico. Por esta razón, el p-pocket sería de gran relevancia para el desarrollo de inhibidores selectivos (Sebastián-Pérez, 2018).

Recientemente, el grupo de Gil (Sebastián-Pérez, 2018), evaluó una biblioteca de reposición de 30 compuestos utilizados en tratamiento anti-tripanosomátido en humanos, identificando que compuestos de imidazol con múltiples sustituciones de fenilo tenían una tendencia a inhibir el crecimiento de los parásitos. De una segunda tanda con 62 compuestos estructuralmente relacionados al imidazol, se identificaron 4 compuestos (35,45,66,78), con prometedora actividad *in vitro* anti-*L. infantum*. Por medio de simulaciones moleculares y cálculos de *docking* se evidenció que estos 4 compuestos de imidazol eran capaces de unirse al sitio activo de la enzima PDEB1 de *L. major*, por medio de puentes de hidrógeno con el residuo Gln887 e interacciones aromáticas con los residuos Phe857 y Phe890, y también estos compuestos eran capaces de interaccionar con el p-pocket a través de un enlace entre el sustituyente metoxifenilo y el residuo Asn881. Solamente el compuesto 35, mostró que el efecto anti-tripanosoma estaba efectivamente asociado a la inhibición de la PDE en el parásito, mostrando un aumento significativo en los niveles intracelulares de AMPc en promastigotes de *L. infantum* utilizando una concentración de compuesto apenas por debajo del IC50 anti-leishmania.

En base a estos estudios y otros hallazgos (Koning H. P., 2017), (Skinner-Adams, 2016), (Makin, 2015), las PDEs son considerados factores de virulencia, y prometedores blancos de fármacos.

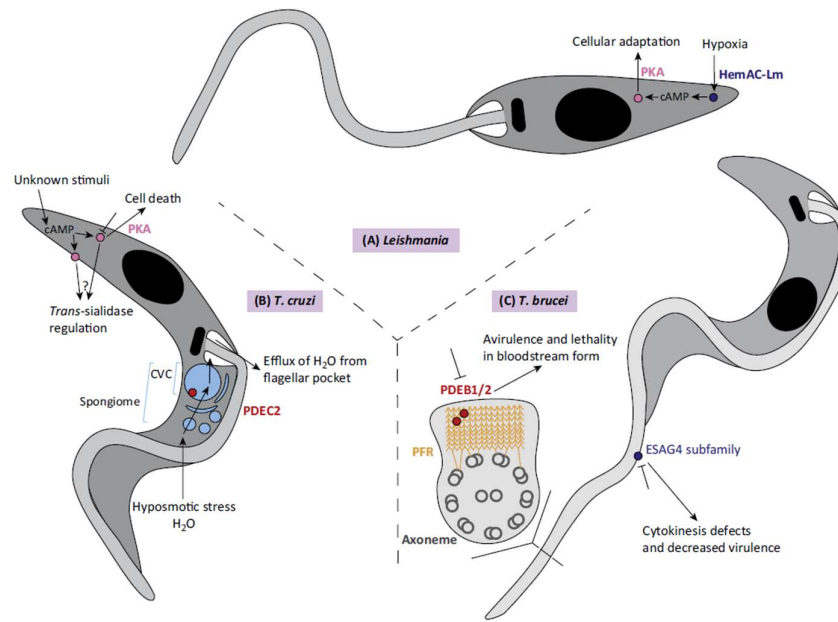


Figura 24. Resumen de los posibles blancos de fármacos en la vía de señalización por AMPc en tripanosomátidos. En círculos rellenos se indican los posibles blancos farmacológicos: en rosado, proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA); en rojo, la fosfodiesterasa (PDE); en azul oscuro, la adenilato ciclasa (AC). (A) La vía de señalización en *Leishmania* media la adaptación celular y supervivencia durante la hipoxia. (B) En *T. cruzi* la vía de señalización de AMPc regularía el proceso de muerte celular y diferenciación de epimastigotes y la evasión del sistema inmune por parte de los tripomastigotes en un mecanismo mediado por las transialidasas. La inhibición de la TcrPDEC2, induce la desregulación de la respuesta a estrés hiposmótico controlado por la vacuola contráctil (CVC). (C) La supresión simultánea de PDEB1 y 2 es letal para *T. brucei* y genera parásitos avirulentos en ratón. La supresión simultánea de miembros de la subfamilia ESAG4 (ubicados en la membrana flagelar) provoca defectos en la citoquinesis, induce la muerte celular y atenúa la capacidad infectiva del parásito en modelo ratón. Tomado y modificado de (Makin, 2015).

Entre las cardiomiopatías de mayor incidencia en Sudamérica (aproximadamente 4,5 millones de personas afectadas) es causada por *Trypanosoma cruzi* (Marin-Neto, 2007). Justamente en esta patología existe un nexo interesante entre ambas vías de señalización. Se ha demostrado que el patógeno induce una reprogramación de la expresión génica y el metabolismo mitocondrial en cardiomiocitos de pacientes chagásicos, aumentando el nivel de especies reactivas del oxígeno (Wan, 2012); por otro lado, para este modelo de infección se han reportado alteraciones en circuitos controlados por AMPc (Roman-Campos, 2013).

En el contexto de la información planteada en esta introducción, es que herramientas

capaces de disecar la complejidad de estas vías de comunicación revisten una enorme relevancia biomédica y biotecnológica, ya que la caracterización de estos mecanismos abrirá nuevas perspectivas en el diseño de fármacos altamente selectivos, mejorando la eficacia de terapias existentes contra patologías.

2. OBJETIVO

El objetivo de este plan de doctorado en Biotecnología es aplicar ingeniería de proteínas para diseñar un conjunto de biosensores capaces de detectar cambios redox y en los niveles de nucleótidos en tripanosomátidos. Dado que estos biosensores estarán basados en proteínas fluorescentes e incluirán dominios o residuos con capacidad para reaccionar de manera selectiva y reversible con sus sustratos, postulamos que estas configuraciones permitirán el monitoreo específico, dinámico y no invasivo de los metabolitos en cuestión. Para ello se utilizará información disponible en la literatura combinada con resultados preliminares obtenidos por nuestro equipo de trabajo sobre biosensores redox (proyecto FMV-2617) y la nueva arquitectura de sensor FRET para cAMP basada en la generación CUTie. Se buscará además implementar variantes fluorescentes de estos biosensores con corrimiento espectral hacia el rojo, de manera tal de expandir su aplicación a técnicas de imagenología *in vivo* y/o compatibilidad con otros fluoróforos. Esto es de particular importancia porque a la fecha de inicio de la presente tesis, no se había reportado la generación de biosensores redox y/o de cAMP con corrimiento espectral al rojo.

Además se buscará desarrollar una herramienta única en su clase combinando la detección simultánea de cambios redox y AMPc en una única molécula biosensora.

En el caso de lograrse la validación funcional de estos biosensores, se espera que estas herramientas contribuyan a expandir y profundizar el conocimiento sobre estas grandes vías de señalización celular, a estudiar la contribución de las mismas a la patogénesis e infección, a facilitar la identificación de nuevos blancos terapéuticos y asistir en el diseño de estrategias de tratamiento de estas enfermedades.

2.1 Objetivo específico 1: Desarrollo de un sensor redox con corrimiento espectral hacia el rojo.

Tomando en cuenta el reciente desarrollo de la proteína mRuby2, se propone generar un sensor redox basado en la misma. A partir de estudios bioinformáticos se identificarán los residuos adecuados a ser mutados para otorgarle a la misma sensibilidad redox y que la misma se traduzca en cambios espectrales cuantificables. Se intentará también generar un sensor con capacidad ratiométrica, similar a lo descrito para la proteína roGFP2. Una vez se cuente con los

estudios bioinformáticos se procederá a realizar la expresión y purificación de la proteína recombinante en *E. coli*. Se realizará la caracterización bioquímica de las proteínas recombinantes, evaluando características espectrales, capacidad de responder a estímulos redox y respuesta ratiométrica. Se continuará hacia la generación de líneas celulares de interés biomédica y biotecnológica.

2.2 Objetivo específico 2: Desarrollo de un sensor basado en el fenómeno de FRET capaz de detectar GMPc.

Tomando en cuenta el reciente desarrollo del sensor CUTie para detectar AMPc, se propone generar un sensor de estructura similar con un dominio de unión a GMPc y las proteínas fluorescentes CFP e YFP. Para llevar a cabo este objetivo se realizarán estudios bioinformáticos de modelado y simulaciones molecular y luego se continuará con la expresión y purificación del sensor en *E. coli*, caracterización de la especificidad de respuesta y rango dinámico de trabajo. Una vez se cuente con el biosensor de GMPc, se plantea modificar la proteína YFP a rxYFP (ya descrita) con el fin de obtener un sensor dual de FRET capaz de monitorear al mismo tiempo la vía de señalización redox y la vía de señalización por GMPc.

2.3 Objetivo específico 3: Desarrollo de un sensor dual con corrimiento al rojo basado en el fenómeno FRET capaz de detectar en simultáneo homeostasis redox y nivel de AMPc.

Se plantea el desarrollo de un sensor dual con corrimiento al rojo, que permita detectar en simultáneo la vía de señalización redox y vía de señalización por AMPc. Para llevar a cabo este objetivo, va a depender del cumplimiento del objetivo específico 1, dado que se propone utilizar como par FRET el nuevo par Clover-mRuby2, en este caso la versión redox sensible de la mRuby2. Para poder generar el sensor dual se incorporará el dominio de unión a nucleótido de cíclico utilizado previamente por el sensor CUTie.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y Fungibles

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

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Applichem (Alemania), Invitrogen o Sigma-Aldrich (en orden alfabético): ácido acético (HAc), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), albúmina sérica bovina (BSA), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de sodio (NaCl), diamida, 4,4'-ditiodipiridina (DTDPy), ditioneitol (DTT), extracto de levadura, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Forskolina (FSK), glutatión (GSH), glutatión disulfuro (GSSG), isobutilmetilxantina (IBMX), isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), lisozima de clara de huevo (linfofilizada), menadiona, β -mercaptoetanol (β ME), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), pepstatina A, trifosfato de adenosina (ATP), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), N- α -tosil-L-lisina clorometilcetone (TLCK), triptona, Tritón X-100®, sorbitan monolaurato de polioxietileno (Tween-20®). Todos los reactivos de uso general fueron de grado analítico, con la excepción de algunos solventes para usos no analíticos. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30% (v/v) fue adquirido en J.T. Baker (EUA). Los antibióticos ampicilina, tetraciclina, kanamicina, higromicina B, fleomicina, y cloranfenicol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich o Invitrogen, en diferentes presentaciones. La oxitetraciclina (oxitet) fue adquirida al Laboratorio Microsules, Uruguay (Oximic Plus). Todas las columnas usadas en la purificación de proteínas recombinantes fueron adquiridas en GE.

3.2. Métodos de biología molecular

3.2.1. Diseño y preparación de vectores de expresión de los sensores rxmRuby2 y hGrx1-rxmRuby2 en *Escherichia coli* y tripanosomátidos.

Para generar el vector de expresión de la proteína rxmRuby2, se compró a Addgene el vector pCDNA3.1 Clover-mRuby2 que permite la expresión de la forma salvaje de ambas proteínas fluorescentes en células de mamífero. Para generar la versión redox sensible del biosensor fluorescente denominado Clover-rxmRuby2, se realizaron sustituciones puntuales en la secuencia de Clover (C49T) y mRuby2 (C118S/T148C/D200C). Estas mutaciones fueron generadas por síntesis *de novo* de la secuencia de interés, y el producto fue luego clonado en el plásmido pUC57. Estos trabajos fueron encargados a la empresa Biobasic (**Figura 25 A**).

Las construcciones de ADN que permiten expresar la forma recombinante de rxmRuby2 (**Figura 25 B**) y la hGrx1-rxmRuby2 (fusión del biosensor rxmRuby2 a la glutarredoxina 1 humana, **Figura 25 C**) fueron generadas por diferentes estrategias, las cuales se describen a continuación.

Para la primera de ellas, la secuencia de rxmRuby2 fue amplificada por PCR a partir de la construcción pUC57 Clover-rxmRuby2, utilizando los siguientes oligonucleótidos: Fwd 5'-GGATCCTATGGTGAGCAAAGGTGAAGAACTGATC-3' y Rev 5'-AAGCTTTTATACAGTTCGTCCATACCACCGCC-3'. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µL que consistió de: 10 ng del plásmido pUC57 Clover-rxmRuby2, 1 µM de cada oligonucleótido, 0,2 mM dNTPS, 1,5 mM Mg²⁺, 1x Taq Buffer y 1U Taq ADN polimerasa (Invitrogen). El programa de amplificación consistió de los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95°C/30 s, 55°C/30 s y 72°C/2 min, y un paso de extensión final a 72°C durante 10 min. Se empleó el termociclador LabNet MultiGene Optimax. La reacción de PCR fue analizada mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% (p/v) corrido en buffer TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA pH 8,0) a 100 mV en un equipo PowerPac™ HC de BioRad. El gel fue luego teñido con solución de bromuro de etidio 1 ng/mL durante 10 min y las bandas resultantes se visualizaron en transiluminador o cámara G-Box (Syngene, EUA). El amplicon fue purificado del gel con el sistema PCR Clean-up (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y clonado en un vector TOPO TA (Invitrogen). La secuencia codificante de rxmRuby2 fue escindida de este vector por restricción enzimática con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III, y posteriormente ligada al vector pET22b (Novagen), previamente digerido con estas mismas enzimas utilizando protocolos estándares de digestión y ligación (Guo, 2002). La correcta identidad de la secuencia clonada fue verificada por secuenciación de ambas hebras empleando oligonucleótidos que hibridan secuencias flanqueantes a la secuencia de interés: promotor de ARN polimerasa de fago T7 y secuencia terminadora (Macrogen, Korea).

Para la generación del sensor hGrx-rxmRuby2, en primer lugar, se procedió a su diseño *in silico* utilizando el Software Vector NTI y los datos de secuencias de ADN de la proteína hGrx1 y el *linker* adyacente (obtenida de la construcción pQE60-hGrx-roGFP2; (Meyer, 2010)) y el de la proteína rxmRuby2 (**Figura 25 C**). La síntesis e inserción de esta secuencia nucleotídica en los vectores de expresión pHD1700 (para *T. brucei*) y pLexsy-Hyg2 (para *Leishmania* sp.) fue encargada a la empresa Genscript.

El vector pHD1700 (gentilmente provisto por la Dra. Christine Clayton, Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, Alemania), brevemente se encuentra conformado por (orden 5'-3'): a) una secuencia de integración al locus de la secuencia de *splicing* del RNA ribosomal (spRRNA), b) una secuencia promotora de la expresión de la proteína de superficie prociclina 1 (EP1) seguida de un operón de tetraciclina que permite la expresión inducible del gen de interés (tOp), c) la secuencia codificante para hGrx-rxmRuby2, d) la secuencia no traducible 3'(3'UTR) de la actina de *T. brucei* y e) un casete de selección para el antibiótico higromicina (Hyg).

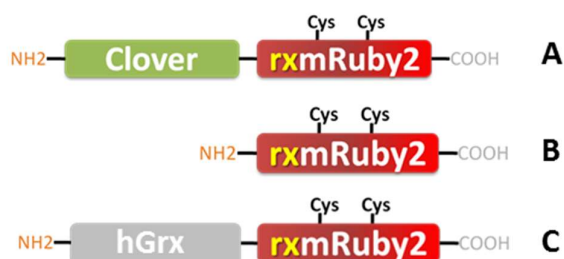


Figura 25. Esquema representativo del orden de los módulos que conforman los sensores: A. Clover-rxmRuby2; B. rxmRuby2; C. hGrx-rxmRuby2.

3.2.2. Diseño y preparación de vectores de expresión del sensor FRET (CFP/YFP) de GMPc y su variante redox sensible.

El sensor FRET de GMPc, denominado CUTie2, fue diseñado *in silico* mediante análisis computacional de secuencias y de estudios de dinámica molecular (Klein, 2021), teniendo en cuenta algunos de los módulos moleculares que componen al sensor de AMPc CUTie (Surdo, 2017). En base a estos estudios, se identificó el *loop* 4-5 del dominio GMPc-CNBD como sitio apto para la inserción de la secuencia codificante de la proteína YFP. Esta inserción sustituye los aminoácidos originales Asp₂₈₆-Ser-Pro-Ser-Glu₂₈₂ del *loop* 4-5 de GMPc-CNBD. Al extremo C-terminal de la secuencia del GMPc-CNBD se agrega una secuencia puente que conecta este dominio con la secuencia codificante de la proteína CFP (**Figura 26**).

Por otro lado, se diseñó el sensor dual para detectar GMPc por FRET (par CFP/YFP) y cambios redox por variaciones en la intensidad de fluorescencia de una proteína YFP redox sensible, el cual se denominó rxCUTie2. Para su generación, fue necesario realizar cuatro mutaciones puntuales en la secuencia nucleotídica del sensor CUTie2 descrito en el párrafo anterior. Estas incluyeron: i) dos sustituciones en la secuencia codificante para YFP (Asn228Cys y Ser281Cys) de manera de convertirla en una versión redox sensible (rxYFP), tal como fuera reportado anteriormente (Østergaard, 2004), y ii) sustituciones de residuos de cisteínas por serina en la secuencia de la YFP (Cys127Ser) y CFP (Cys445Ser) para evitar la posible formación indeseada de puentes disulfuro inter- o intra-moleculares.

A la empresa Genscript se le ordenó la síntesis e inserción de las secuencias de ADN de CUTie2 y de rxCUTie2 en los vectores pET28a (+), pHD1700 y pTcINDEX (gentilmente cedido por el Dr. John Kelly de la London School of Hygiene and Tropical Medicine, Reino Unido) que permiten la expresión inducible de proteínas en *E. coli*, *T. brucei* y *T. cruzi*, respectivamente.

El plásmido pTcINDEX- rxCUTie2 presenta en el siguiente orden 5'-3': (a) secuencia de ADN para el ARN ribosomal no traducible (R-NTS/P) que media su integración al genoma de los parásitos, (b) un casete de selección para el antibiótico higromicina (Higro: gen de resistencia a higromicina) bajo el control de un promotor de fago T7 (pT7), (c) un pT7 que guía la expresión del gen de interés, (d) secuencia del operón de tetraciclina (tOp) que permite el control inducible de la expresión inducible del gen ectópico, (e) la secuencia codificante para rxCUTie2, (f) la secuencia epítipo myc (Myc) y la secuencia del terminador de la transcripción (T).

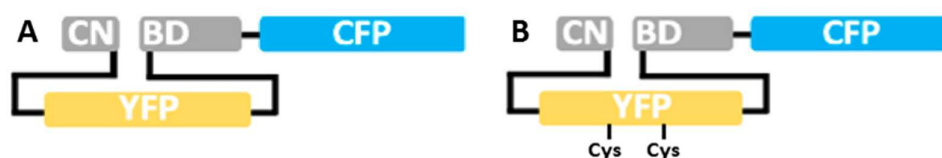


Figura 26. Esquema del orden de los módulos que conforman los sensores: A. CUTie2; B. rxCUTie2

3.2.3. Diseño y preparación de vectores de expresión del sensor FRET (Clover/mRuby2) de AMPc y su variante redox sensible.

Para la generación del sensor dual FRET y redox Clover-AMPc-rxmRuby2, se utilizó la secuencia preparada en la sección 3.2.1 (Clover-rxmRuby2) y el sensor de FRET para AMPc reportado por (Surdo, 2017), CUTie (CFP-AMPc-YFP).

Para el sensor Clover-AMPC-rxmRuby2, a diferencia del sensor CUTie, la secuencia nucleotídica de la proteína Clover es insertada en el dominio AMPc-CNBD acorde a lo descrito (Surdo, 2017), mientras que la proteína rxmRuby2 se encuentra fusionada en el extremo C-terminal del AMPc-CNBD. (**Figura 27**).

La secuencia de ADN fue sintetizada por Genscript y clonada en vector de expresión de procariotas, pET28a (+), en los sitios y en vectores de expresión en tripanosomas, pTcINDEX y pLexsy-Hyg2, previamente enviados a Genscript.

El vector pLEXSY-hyg 2.1 de Jena Bioscience está diseñado para promover la expresión constitutiva de la proteína blanco luego de la integración del cassette de expresión en el locus del cromosoma 18S rARN (*ssu*-locus, 5' *ssu* y 3' *ssu*) haciendo uso de los altos niveles de transcripción de la ARN polimerasa I endógena. El vector pLEXSY presenta regiones no traducibles que flanquean el sitio de inserción del gen de la proteína blanco y provee las señales de *splicing* para el procesamiento post-transcripcional del ARNm.

La expresión del vector pLEXSY-hyg2.1 tiene como gen marcador a la higromicina (codifica para la enzima Higromicina fosfotransferasa, HPT) permitiendo la selección de los parásitos recombinante mediante el agregado del antibiótico higromicina.

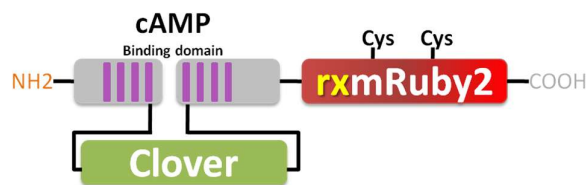


Figura 27. Esquema del sensor dual (redox y FRET, INF-RXM): Clover-AMPC-rxmRuby2.

3.2.4. Amplificación, purificación y secuenciación de plásmidos y vectores

Todos los plásmidos y vectores de expresión utilizados en esta tesis fueron aislados de bacterias *Escherichia coli* cepa XL1 quimiocompetentes (Invitrogen) que fueron transformadas con 3-5 μ L de las construcciones de ADN mediante shock térmico siguiendo las indicaciones del proveedor. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB agar (5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 15 g/L de agar) suplementadas con ampicilina 100 μ g/mL (vectores pHD1700, pTcINDEX y pLEXSY) o kanamicina 50 μ g/mL [vectores pET28 (+)] y se incubaron durante 16 - 20 horas a 37°C. Colonias aisladas de estas

placas fueron inoculadas y crecidas en medio LB líquido (5 o 50 mL) a 37°C y 120 rpm durante aproximadamente 18 horas. A partir de estos cultivos se extrajo y purificó el ADN plasmídico empleando *kits* de maxiprep y miniprep (GenElute Plasmid DNA maxiprep kit y GenElute Plasmid DNA miniprep kit, Sigma-Aldrich).

Tabla 2. Secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados para secuenciación de las diferentes construcciones. Todos los oligonucleótidos fueron preparados a una concentración *stock* de 100 pmol/μL.

Nombres	Secuencias de los oligonucleótidos	Construcciones secuenciadas
T7 promotor	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'	pET22b hGrx-rxmRuby2
T7 terminador	5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'	
Fo_pHD1700	5'- TGGCAGTGATGGGGTTGT-3'	pHD1700 hGrx-rxmRuby2
Rv_pH1700	5'- TTGCAAATAAGGCATAGGGCT – 3'	pHD1700 rxCUTie2
Fo_pTcINDEX	5'- ATTGCTCAGCGGGCTAGCA - 3'	pTcINDEX INF-RXM
Rv_pTcINDEX	5'- ACGGTAAGCCCACGGAAGA – 3'	pTcINDEX rxCUTie2
Fo_pET28a	5'- ATGCGTCCGGCGTAGA-3'	pET28a (+) INF-RXM
Rv_pET28a	5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG – 3'	pET28a (+) CUTie2 pET28a (+) rxCUTie2

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

3.3.1. rxmRuby2

Entre 30-50 ng de la construcción plasmídica pET22b (+) rxmRuby2 se incorporó a células *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes mediante shock térmico a 42°C durante 2 minutos. Las células transformadas se incubaron a 37°C por 1 hora a 200 rpm, y luego se sembraron sobre placas de LB agar suplementadas con ampicilina 200 μg/mL y se incubaron toda la noche a 37°C.

Se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante a partir de un inóculo de varias colonias provenientes de las placas de agar en 5 mL de medio LB líquido-2x ampicilina. Luego, este cultivo se diluyó 1/5 en medio LB líquido fresco con ampicilina 200 μg/mL final. Este cultivo

se incubó a 37°C y 220 rpm durante 3-4 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) $\approx$ 0,8. En este punto se realizó la inducción de la expresión con 0,5 mM IPTG (Euromedex, preparado fresco) y cultivando las bacterias a 25°C y 200 rpm durante 16 horas aproximadamente.

A continuación, se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 5.000 *g* y 4°C durante 20 minutos. El *pellet* se pesó y luego se resuspendió completamente en amortiguador A (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0) en una relación de 5 mL de amortiguador A por cada gramo de *pellet* húmedo. Para iniciar la lisis celular, se agregó 0,33 mg/ml lisozima y una tableta de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Sigma Aldrich, AEBSF, Bestatin, E-64, Pepstatina A, Phosphoramidon). La muestra se incubó en hielo durante 1 hora luego de la cual se procedió a la sonicación (Branson Sonifier Cell Disruptor 200 V) utilizando los siguientes parámetros: 3 ciclos, tiempo total de 1 minuto con un impulso *on* de 2 segundos, un impulso *off* de 2 segundos y una amplitud de 45%. Los restos celulares se removieron por centrifugación (Thermo Scientific™ Sorvall™ RC 6 Plus) a 16.000 *g* durante 60 minutos a 4°C. Previo al pasaje por la columna de afinidad y para eliminar partículas insolubles, el sobrenadante del lisado se clarificó mediante filtración en filtros de 0,45 μ m (Minisart, Sartorius).

rxmRuby2 con etiqueta N-terminal de seis residuos de histidina fue purificada por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC; del inglés *immobilized metal affinity chromatography*) empleando una columna *HisTrap Fast Flow* (GE healthcare) de 1 mL y una bomba peristáltica (TRIS Teledyne ISCO). La columna fue pre-equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador A y luego se aplicó el extracto soluble filtrado a la columna. A continuación, se realizó 2 lavados sucesivos, ambos con 10 volúmenes del mismo amortiguador agregado de 10 mM de imidazol. La elución de la proteína se realizó con gradiente, mezclando diferentes volúmenes de amortiguador A y amortiguador B (imidazol 500 mM en amortiguador A pH 8,0) a modo de ir incrementando la concentración de imidazol. Las proteínas eluyeron a una concentración de imidazol de 200 mM. Todos los pasos de esta cromatografía se realizaron a un flujo de 1 mL/min y a una temperatura de trabajo de 4 – 8 °C.

Las fracciones obtenidas de la IMAC conteniendo rxmRuby2 fueron juntadas y concentradas por centrifugación (5.000 *g* a 4°C) en un filtro Vivaspin-20 (punto de corte 5 kDa). Esta muestra fue filtrada por 0,22 μ m (Millex GV filter, Millipore) e inyectada (500 μ L)

en una columna Superdex G-75 10/300 GL previamente equilibrada con PBS (pH 7,4) 1 mM EDTA. La cromatografía de gel filtración fue realizada a temperatura ambiente utilizando un sistema AKTA-FPLC (Unidad de proteínas recombinantes, Institut Pasteur de Montevideo), a un flujo de 0,8 ml/min, monitoreando la absorbancia a 280 nm y 560 nm y colectando fracciones de 500 µL. Todas las fracciones que mostraron un grado de pureza de rxmRuby2 mayor a 90% (estimado por SDS-PAGE; ver sección 3.4.1) se combinaron y almacenaron a 4°C hasta posterior uso.

3.3.2. Sensor FRET de GMPc: CFP-GMPc-YFP (CUTie2) y sensor dual CFP-GMPc-rxYFP (rxCUTie2)

E. coli BL21 (DE3), o BL21 (DE3), Rosetta (DE3) y C41 (DE3) (Lucigen) quimiocompetentes fueron transformadas mediante shock térmico a 42°C durante 2 minutos con los vectores pET28a(+) CUTie2 y pET28a(+) rxCUTie2, y luego del agregado de medio S.O.C. (Super Optimal Broth, 20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 0,5 g/L Cloruro de sodio y 0,186 g/L Cloruro de potasio) fueron inmediatamente incubadas a 37°C por 1 hora a 200 rpm. Este cultivo fue sembrado sobre placas de LB agar suplementadas con kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL o kanamicina 50 µg/mL final, respectivamente, y se incubó toda la noche a 37°C.

Se realizó un pre-cultivo de las cepas transformantes pET28a (+) CUTie2 y rxCUTie2 a partir de un inóculo de varias colonias provenientes de placas LB-kanamicina. Luego, se realizó una dilución 1/5 en medio 2YT (extracto de levadura 10 g/L, triptona 16 g/L, NaCl 5g/L) con kanamicina 50 µg/mL o kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL final, según corresponda. Estos cultivos se incubaron a 37°C y 220 rpm durante 3 horas hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0,6$. En este punto se realizó la inducción de la expresión con 0,5 mM IPTG (Euromedex, preparado fresco) o 0,1mM IPTG (Euromedex) y se cultivó a 20°C y 160 rpm durante 16 horas aproximadamente.

A continuación, las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 6.000g y 4°C durante 30 minutos. El *pellet* se pesó y luego se resuspendió completamente en amortiguador A (NaCl 300 mM, Tris-HCl 50 mM, 20mM imidazol, pH 8,0) en una relación de 5 mL de amortiguador A por cada gramo de *pellet* húmedo. Para iniciar la lisis celular, se agregó 1 mg/ml final de lisozima y una tableta de inhibidores de proteasas libre de EDTA (ROCHE). La muestra se incubó en hielo durante 1 hora luego de la cual se procedió a la lisis por sonicación (Branson Sonifier Cell Disruptor 200V) utilizando los siguientes parámetros: 3 ciclos, tiempo total de 1 minuto con un impulso *on* de 2 segundos, un impulso *off* de 2 segundos y una amplitud de 45%. Para la proteína pET28a(+) rxCUTie2 se realizó una lisis mecánica por medio de la prensa francesa a

una presión entre 7000 - 10000 psi (Unidad de Cristalografía de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo) En ambos casos, los restos celulares se removieron por centrifugación (Thermo Scientific™ Sorvall™ RC 6 Plus) a 16.000g durante 60 minutos a 4°C. Previo al pasaje por la columna de afinidad y para eliminar partículas insolubles, el sobrenadante de la lisis fue clarificado utilizando filtros de 0,45 µm (Minisart, Sartorius).

CUTie2 y rxCUTie2 con etiqueta N-terminal de seis residuos de histidina fueron purificadas por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) empleando una columna *HisTrap Fast Flow* (GE healthcare) de 1 mL y una bomba peristáltica (TRIS Teledyne ISCO). La columna fue pre-equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador A y luego se aplicó el extracto soluble filtrado a la columna. A continuación, se realizaron 2 lavados sucesivos, ambos con 10 volúmenes del mismo amortiguador. La elución de la proteína se realizó con gradiente, mezclando diferentes volúmenes de amortiguador A y amortiguador B (imidazol 500 mM en amortiguador A pH 8,0) a modo de ir incrementando la concentración de imidazol. Las proteínas eluyeron a una concentración de imidazol de 250 mM. Todos los pasos de esta cromatografía se realizaron a un flujo de 1 mL /min y a 4 - 8°C.

Las fracciones de la IMAC ricas en CUTie2 o rxCUTie2 se juntaron por separado y se concentraron por centrifugación (5.000 g a 4°C) en un filtro Vivaspin-20 (punto de corte 30 kDa). Estas muestras fueron luego filtradas por 0,22 µm (Milex GV filter, Millipore) e inyectadas (500 µL) en una columna Superdex G-200 10/30 previamente equilibrada con Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM. La cromatografía de gel filtración fue realizada a temperatura ambiente utilizando un sistema AKTA-FPLC (Unidad de proteínas recombinantes, Institut Pasteur de Montevideo), a un flujo de 0,5 ml/min y monitoreando la absorbancia a 280 nm y a 510 nm. De acuerdo al análisis por SDS-PAGE (sección 3.4.1), las fracciones conteniendo las proteínas de interés mostraron un grado de pureza mayor a 80%.

3.3.3. Sensor dual FRET y redox: Clover-AMPc-rxmRuby2 (INF-RXM)

Bacterias *E. coli* BL21 (DE3) y C41 quimiocompetentes se transformaron con el plásmido pET28a (+) INF-RXM mediante shock térmico a 42°C durante 2 minutos o 45 segundos, respectivamente. Las células transformadas se incubaron a 37°C por 1 hora a 200 rpm, y luego se sembraron sobre placas de LB agar suplementadas con kanamicina 50 µg/mL y se incubaron toda la noche a 37°C.

Colonias aisladas de la placa de transformación se inocularon en medio LB líquido agregado de kanamicina (50 µg/mL). Este cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm, y al día siguiente se diluyó 1/5 en medio 2YT con kanamicina 50 µg/mL e incubó a 37°C y 220 rpm durante 3 horas hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0,6$. En este punto se realizó la inducción de la expresión con 0,1 – 0,5 mM IPTG (Euromedex) y extendiendo el cultivo por 16 horas a 17 – 20 °C y 160 rpm.

La cosecha, lisis enzimática y mecánica, así como la clarificación y purificación de la forma recombinante de este sensor etiquetada con cola de histidinas en el N-terminal se realizó de manera similar a la descrita en la sección anterior para el sensor rxCUTie2.

3.4. Técnicas analíticas

3.4.1. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida/poliacrilamida

Las muestras correspondientes a diferentes etapas del proceso de purificación de la forma recombinante de los diferentes biosensores se analizaron mediante electroforesis en gel de acrilamida/poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras o no reductoras. La proporción de acrilamida fue del 2% mientras que la de poliacrilamida fue del 10% al 15% dependiendo del peso molecular de la especie de interés. Las muestras se mezclaron con buffer de carga 6X (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, glicerol 20% v/v, SDS 1% p/v y azul de bromofenol 0,05% p/v con β-mercaptoetanol 5% v/v), calentadas a 95°C en baño de agua por 3 minutos luego cargadas (10 - 20 µL) en el gel. La electroforesis se realizó en buffer de corrida Tris base 0,25 M, glicina 0,52 M y SDS 35 mM, pH 8,3 con un equipo BioRad aplicando una corriente de 30 mA y voltaje 150 V a temperatura ambiente. La electroforesis se detuvo inmediatamente al escape del frente de corrida. Luego el gel se sumergió en azul de Coomassie [0,1% p/v brilliant blue R350, metanol 20% v/v y ácido acético 10% v/v] durante un par de horas y seguidamente se destiñe con una solución de etanol: agua 7:10 y ácido acético 10% v/v.

3.4.2. Cuantificación de proteínas

Las proteínas recombinantes purificadas se cuantificaron espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de absorción molar teórico para 280 nm calculado por el servidor (Gasteiger, 2005) luego de cargar los datos de la secuencia aminoacídica de interés.

La cuantificación experimental de proteínas en muestras de interés se realizó por medio del ensayo del ácido bicinonínico (BCA) adaptado para la lectura en microplaca de 96 pocillos según instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich), usando BSA como estándar. Se usaron placas de adsorción de 96 pocillos (Greiner) y el lector de microplacas con filtro de 550 nm (PR 4100 BioRad).

3.4.3. Cuantificación de tioles

La determinación de tioles se realizó mediante el método propuesto por Grassetti utilizando la 4,4'-ditiodipiridina (Grassetti, 1967). El stock de 4,4'-ditiodipiridina se preparó a 4 mM en amortiguador fosfato 100 mM, EDTA 0,2 mM, pH 6,8 y se almacenó a 4°C.

Para determinar la concentración de tioles en una muestra, una fracción de esta se incubó (generalmente en una relación 1:4) con 0,16 mM final de 4,4'-ditiodipiridina durante 5 minutos a 4°C y a continuación se midió la Abs 324 nm en un espectrofotómetro Cary (Variant). La concentración de tioles totales en la muestra se calculó haciendo uso de la Ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$) con un coeficiente de extinción molar para la 4-tiopiridona a 324 nm de $21.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a pH < 7,0 y en caso de corresponder, este valor se afectó por el factor de dilución.

3.4.4. Titulación de pH

Para evaluar la influencia del pH sobre la fluorescencia de la forma totalmente reducida y totalmente oxidada de rxmRuby2 se utilizaron condiciones de fuerza iónica constante ($I=0,15 \text{ M}$) utilizando diferentes sistemas buffers (Sardi, 2013). La titulación del pH en la forma reducida y oxidada de rxmRuby2 se llevó a cabo a 25°C en una solución con Tris 6,2 mM, etanolamina 6,2 mM, ácido acético 12 mM, DTPA 100 μM , NaCl 138 μM , NaOH 5 mM, a un pH inicial de 9,0. El pH del medio se acidificó por el agregado acumulativo de volúmenes fijos de 0,4 M HCl hasta un pH final de 4,0. La proteína se diluyó en una solución buffer a una concentración final de 1 μM y luego de 5 minutos, se midió la fluorescencia de excitación a 560 nm en un espectrofluorímetro (Cary Eclipse). El pH de la solución se midió de manera inmediata después de la reacción a la misma temperatura que el experimento (25°C). Valores de pH por debajo y por encima de 4 y 9 no se pudieron medir debido a la inestabilidad del biosensor (desnaturalización y formación de agregados). El pKa aparente del cromóforo se obtuvo a partir del ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann (curva sigmoidea).

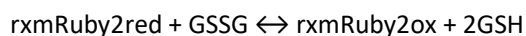
3.4.5. Determinación del potencial redox

El valor medio del potencial redox medio ($E^{\circ'}$) de la rxmRuby2 se determinó a partir de la constante de equilibrio obtenida luego de la incubación (4 horas) del biosensor reducido con diferentes relaciones GSSG/GSH en una atmósfera libre de oxígeno. El ensayo de la enzima glutatión reductasa (Carlberg, 1985) se utilizó para estimar y remover trazas de GSSG presente en el reactivo comercial de GSH previo al ensayo de titulación redox.

La proteína rxmRuby2 reducida (ver punto **3.5.1**) se diluyó a una concentración final de 5 μM al ser agregada a una placa negra de 96 pocillos (GREINER Bio ONE) que contenía 100 mM de PBS (pH 7,0), 1 mM EDTA (previamente purgado con Argón), y variadas concentraciones de glutatión oxidado (0 - 100 μM) y de glutatión reducido (0 – 10 mM). Se incluyó en el ensayo una muestra control incubada con 1 mM DTT (condición de reducción completa de biosensor) y una muestra control incubada con 10 mM de GSSG (condición de oxidación completa de biosensor). Esta placa se incubó en una atmósfera de argón por 4 horas a 25°C, para permitir que se alcance el equilibrio, y luego se evalúa el estado redox de la proteína por lectura de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 560/600 nm) en espectrofluorímetro (Cary Eclipse).

El $E^{\circ'}$ de la rxmRuby2 se calculó de acuerdo con el tratamiento matemático descrito a continuación.

La reacción de equilibrio para la oxidación de rxmRuby2 por GSSG es:



y la constante de equilibrio está dada por la siguiente ecuación (1):

$$K_{eq} = [\text{rxmRuby2ox}][\text{GSH}] / [\text{rxmRuby2red}][\text{GSSG}] \quad (1)$$

La fracción de rxmRuby2 reducida (R) en presencia de diferentes relaciones GSH/GSSG se midió a través de la absorción de fluorescencia (560 nm) o de la emisión de fluorescencia (600 nm) del cromóforo de la proteína, y se calculó de acuerdo a la ecuación (2):

$$R = (F - F_{ox}) / (F_{red} - F_{ox}) \quad (2)$$

Donde F es la absorción/emisión de fluorescencia de rxmRuby2 para una relación determinada de GSH/GSSG, F_{red} y F_{ox} es la absorción/emisión de fluorescencia de rxmRuby2 totalmente reducida o totalmente oxidada, respectivamente.

Además, R puede relacionarse con la K_{eq} , a través de la siguiente ecuación (3):

$$R = (([\text{GSH}f][\text{GSH}f]) / [\text{GSSG}f]) / (K_{eq} + ([\text{GSH}f][\text{GSH}f]) / [\text{GSSG}f]) \quad (3)$$

Donde f indica la concentración de cada especie en el equilibrio determinada a partir de la cantidad inicial (i) de los reactivos y R:

$$[\text{GSH}f] = [\text{GSH}i] - R[\text{rxmRuby2}i]$$

$$[\text{GSSG}f] = [\text{GSSG}i] - R[\text{rxmRuby2}i]$$

Por medio de la ecuación de Nernst (4), las diferentes relaciones $[GSHf]^2/[GSSGf]$ se convirtieron en su correspondiente $E^{\circ'}$:

$$E^{\circ'}([GSHf][GSHf])/[GSSGf] = E^{\circ}GSH - (RT/nF) \times \ln K_{eq} \quad (4)$$

Donde E° es el potencial estándar de GSH ($E^{\circ}_{GSH} = -240\text{mV}$ a pH 7,0 y 25°C) (Rost, 1964), R es la constante de los gases ($8,315 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta ($303,15 \text{ K}$), n es el número de electrones transferidos (2), y F es la constante Faraday ($9,649 \times 10^4 \text{ Cmol}^{-1}$).

El valor medio del potencial redox de rxmRuby2 a pH 7,0 y a 25°C ($E^{\circ'}\text{rxmRuby2}$) se calculó del gráfico R vs. $E^{\circ'} \text{ GSH/GSSG}$ ajustado a la ecuación de Boltzmann mostrando un valor de r^2 de 0,98.

3.5. Espectrofluorimetría

3.5.1. Sensor rxmRuby2

La forma recombinante de rxmRuby2 ($10 \mu\text{M}$) fue reducida u oxidada por completo mediante incubación con DTT (20 mM , 1 hora) o GSSG (2 mM , 2 horas), respectivamente, en buffer PBS (pH 7,4) con 1 mM EDTA y a temperatura ambiente. El exceso de los agentes de bajo peso molecular se removió por gel filtración en una columna Sefadex G25 (columna PD10, GE-Healthcare), equilibrada con PBS (pH 7,4) con 1 mM EDTA. La concentración de proteína eluida de la columna PD10 se cuantificó por medida de absorción a 280 nm , donde $\epsilon_{280} = 24.410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para rxmRuby2, mientras que el contenido de residuos de cisteína libre se cuantificó mediante reacción con 4,4'-ditiodipiridina (DTDPy, ver **punto 3.4.3**). El espectro de excitación ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ $400\text{-}590/600 \text{ nm}$) y el espectro de emisión ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ $580\text{-}700/560 \text{ nm}$) de la proteína totalmente reducida ($5 \mu\text{M}$) o totalmente oxidada ($5 \mu\text{M}$) se registró en el equipo Cary Eclipse fijando un ancho de banda de 5 nm .

Los ensayos redox se realizaron en una microplaca de fluorescencia de 96 pocillos (Fluotrack, Greiner Bio One), con PBS (pH 7,4) como medio buffer, en un volumen final de $200 \mu\text{L}$ y por triplicado. Por pocillo se agregó la proteína reducida (concentración final de $5 \mu\text{M}$) y ninguno (control) o distintos agentes oxidantes a diferentes concentraciones: $100 \mu\text{M}$ de peroxinitrito (ONOOH), $250 \mu\text{M}$ de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), de diamida o de GSSG, tanto en presencia como en ausencia de hGrx (cedida por el Dr. Bruno Manta; (Padilla, 1996)) (concentración final $5 \mu\text{M}$). La fluorescencia de la rxmRuby2 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ $560/600\text{nm}$) se registró cada 2 minutos en un espectrofluorímetro Cary Eclipse. Luego de 45 minutos, a los pocillos de la placa se le agregó 5 mM DTT y se registró la fluorescencia por otros 46 minutos.

Otras condiciones ensayadas correspondieron al tratamiento de 1 μ M de rxmRuby2 oxidada con 250 μ M de NADPH, 5 mM DTT o 10 μ M de la forma reducida de la Trx de *E. coli* (cedida por el Dr. Bruno Manta; (Holmgren, 1985); (Lunn, 1984)) en presencia o ausencia de 5 mM DTT. Estos ensayos también se realizaron en placa negra de 96 pocillas, en un volumen final de reacción de 200 μ L y PBS (pH 7,4), e incluyendo una muestra control sin tratar. La fluorescencia se monitoreó durante 1 hora tal como fue descrito en el párrafo anterior.

El porcentaje de proteína rxmRuby2 reducida se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$rxmRuby2\ red\ (\%) = [(FA - FAox) / Fared - FAox] \times 100$$

donde, *FA*: absorción de fluorescencia de rxmRuby2 a 560 nm en la muestra en estudio; *FAox*: absorción de fluorescencia a 560 nm de rxmRuby2 totalmente oxidada; *Fared*: absorción de fluorescencia a 560 nm de rxmRuby2 totalmente reducida.

Los valores obtenidos fueron procesados y analizados con el software GraphPad Prism 8.0

3.5.2. Sensor CUTie2

El sensor CUTie2 recombinante (100 nM) se trató con diferentes concentraciones de GMPc o AMPc (0 nM - 10 mM) en buffer PBS (pH 7,0) con 1 mM EDTA, en cubeta de fluorescencia Hellma®, en un volumen final de reacción de 120 μ L. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Luego del agregado de GMPc o AMPc, el espectro de emisión ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 435/460-600 nm) de CUTie se registró en un fluorímetro Cary Eclipse cada minuto por un total de 10 minutos, utilizando un ancho de banda de 5 nm y una PMT de 780. Los valores de intensidad de fluorescencia (IF) correspondientes a CFP (485 nm) e YFP (527 nm) en ausencia (C0) o presencia de diferentes concentraciones de los correspondientes nucleótidos cíclicos (Cx) se utilizaron para calcular el porcentaje de FRET, según la siguiente fórmula:

$$FRET = \left[\left(\frac{FI_{Cx}^{527nm}}{FI_{Cx}^{485nm}} \right) - \left(\frac{FI_{C0}^{527nm}}{FI_{C0}^{485nm}} \right) \right] \times 100$$

El gráfico % FRET vs Log [cNMP] se ajustó a una ecuación de regresión no lineal y analizado estadísticamente con el software GraphPad Prism. Tres ensayos independientes se realizaron con tres diferentes lotes del biosensor recombinante.

3.5.3. Sensor rxCUTie2

La forma recombinante de rxCUTie2 (5 μ M) fue totalmente reducida con DTT (5 mM) u totalmente oxidada con GSSG (2 mM) en buffer PBS (pH 7,4) con 1mM EDTA por 1 hora o 2 horas, respectivamente, a temperatura ambiente. El exceso de los agentes de bajo peso molecular se removió por gel filtración en una columna Sefadex G25 (columna PD10, GE-Healthcare), equilibrada con PBS (pH 7,4) con 1mM EDTA. La concentración de proteína eluída de la columna PD10 se cuantificó por medida de absorción a 280 nm, donde $\epsilon_{280} = 60.170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para rxCUTie2, mientras que el contenido de residuos de cisteína libre se cuantificó mediante reacción con 4,4'-ditiodipiridina (DTDPy, ver sección 3.4.3). El espectro de emisión ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 456/466-600 nm) de la proteína totalmente reducida (5 μ M) o totalmente oxidada (5 μ M) se registró en el equipo Cary Eclipse con un ancho de banda de 10 nm.

Para los ensayos de FRET, en una microplaca de fluorescencia para 96 pocillos (Fluotrack, Greiner Bio One), 5 μ M del sensor se expuso a diferentes concentraciones de GMPc. Los valores de intensidad de fluorescencia (IF) correspondientes a CFP (485 nm) y rxYFP (527 nm) en ausencia (C0) o presencia de diferentes concentraciones de GMPc (Cx) se utilizaron para calcular el porcentaje de FRET, según la siguiente fórmula:

$$\text{FRET} = \left[\left(\frac{FI_{Cx}^{527nm}}{FI_{Cx}^{485nm}} \right) - \left(\frac{FI_{C0}^{527nm}}{FI_{C0}^{485nm}} \right) \right] \times 100$$

El gráfico % FRET vs Log [cNMP] se ajustó a una ecuación de regresión no lineal (ecuación de Boltzmann) y analizado estadísticamente con el software GraphPad Prism.

Los valores de intensidad de fluorescencia (IF) del módulo rxYFP ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 510/525 nm) totalmente reducida (5 μ M) o totalmente oxidada (5 μ M) se registró en el equipo Cary Eclipse con un ancho de banda de 10 nm para el monocromador de excitación y 5 nm para el monocromador de emisión. El porcentaje de proteína rxYFP reducida se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$rxYFP (\%) = [(FA - FA_{ox}) / FA_{red} - FA_{ox}] \times 100$$

donde, FA: emisión de fluorescencia de rxYFP a 525nm bajo condiciones del ensayo; FA_{ox} : emisión de fluorescencia a 525 nm de rxYFP totalmente oxidada; FA_{red} : emisión de fluorescencia a 525 nm de rxYFP totalmente reducida. Los valores obtenidos fueron procesados y analizados con el software GraphPad Prism 8.0.

3.6. Cultivos Celulares

3.6.1. Cultivo de *T. cruzi*

En este trabajo se utilizó *T. cruzi* de la cepa CL-Brener en su forma silvestre o bien transfectada establemente con el vector pLew13 (Taylor, 2006), gentilmente cedida por el Dr. Esteban Serra (Universidad Nacional de Rosario, Argentina). Esta última línea celular contiene integrado en su genoma secuencias codificantes para la T7-ARN polimerasa y la proteína represora de tetraciclina, lo cual permite la expresión inducible de secuencias exógenas (ver secciones **3.2.1** y **3.6.2**).

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

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

3.6.2. Nucleofección de la forma epimastigota de CL-Brener *T. cruzi*

Epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL-Brener pLew13 previamente sincronizados con 20 mM de hidroxIUrea por 24 horas a 28°C se cosecharon en fase de crecimiento exponencial tardía (4×10^7 parásitos/mL) a 2.000g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con 10 mL de PBS para remover la hidroxIUrea, luego se resuspendieron en 5 ml de BHI con 250 µg/ml de gentamicina (antibiótico de selección del vector pLew13) y se incubaron a 28°C por 1 hora. Los parásitos fueron centrifugados a 2.000g durante 5 minutos a temperatura ambiente, lavados dos veces con PBS y resuspendidos a una densidad de 10^8 células/mL en 100 µl de solución Amaxa Basic Parasite (Lonza) compuesta por 81,8 µl de la solución 1 y 18,2 µl del suplemento. A esta suspensión celular se le agregó 5 µL de una solución acuosa conteniendo 20 µg de la construcción pTcINDEX-INF-RXM o pTcINDEX rxCUTie2 linealizada (para favorecer su integración por recombinación homóloga) mediante tratamiento con 200 U de la enzima *SpeI* (New England Biolabs) durante la noche a 37°C,

esterilizada por precipitación con etanol absoluto (C. Erba) y disuelta en agua estéril. La mezcla ADN/células se colocó en cubetas de electroporación de 0,2 mm (Lonza) y se aplicó el programa de electroporación X-014 del equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). De la misma manera, 100 μ L de la suspensión celular fue electroporada con 5 μ L de H₂O estéril (control negativo). A las células electroporadas se le adicionaron 500 μ L de medio BHI completo fresco que se transfirieron a una botella de cultivo de 25 cm² conteniendo 2 mL de medio de cultivo BHI completo con 250 μ g/mL G418. El cultivo se incubó a 28°C durante 24 horas, luego de lo cual el medio se sustituyó por 2 mL de BHI completo fresco conteniendo 50 μ g/mL de higromicina (antibiótico de selección del vector pTcINDEX). A las 72 horas post-transfección la concentración de higromicina se incrementó a 200 μ g/mL (concentración final de selección). Cada 2-3 días se monitoreó el crecimiento del cultivo transfectado y del control negativo, y en caso de observar proliferación celular se realizaron diluciones al medio con medio fresco suplementado con higromicina (200 μ g/mL) y gentamicina (250 μ g/mL). A partir de la tercera semana, no se observaron parásitos vivos tanto en el control negativo de transfección como en aquella realizada con el plásmido pTcINDEX rxCUTle2, mientras que aquellos transfectados con el plásmido pTcINDEX INF-RXM presentaron resistencia a higromicina y lograron proliferar. Los estudios posteriores se realizaron sobre la población de parásitos pTcINDEX INF-RXM ya que la selección clonal en *T. cruzi* es poco eficiente porque este organismo presenta un crecimiento densidad-celular dependiente. El acondicionamiento de las células para su criopreservación se realizó por cosecha de 2 - 8 x10⁷ parásitos en fase de crecimiento exponencial mediante centrifugación a 2.000g a temperatura ambiente y posterior resuspensión en 1 mL de medio de cultivo BHI con concentración de antibióticos apropiados y glicerol 10% v/v. Los criotubos se almacenaron a -80°C.

3.6.3. Cultivo de *Leishmania tarentolae*.

En este trabajo se utilizaron parásitos de la cepa *L. tarentolae* LEXSY-Host-P10 (Jena Bioscience), cepa utilizada para vectores LEXSY de expresión constitutiva, como pLEXSYhyg 2.1.

Los parásitos en estadio promastigota se cultivaron a 26 - 28°C (botella acostada) en medio BHI completo (*brain heart infusion* 33 g/L, triptosa 3 g/L, KCl 0,4 g/L, NaH₂PO₄ 4 g/L con el agregado de hemina 0,02 g/L, penicilina/estreptomina 10.000 U/L, Hepes 1M) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino libre de tetraciclina (SFB - PAA).

Los recuentos de células se realizaron en cámara de Neubauer (Precicolor HBG, Germany) siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.1.

3.6.4. Nucleofección de la forma promastigota de *L. tarentolae*.

Promastigotas de *L. tarentolae* LEXSY-Host-P10 se cosecharon en fase exponencial tardía a una densidad $2 - 3 \times 10^7$ cel/mL, a 2.000g por 5 minutos, a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con un volumen de Cytomix (120 mM KCl, 0,2 mM CaCl₂, 2 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, 5 mM K₂HPO₄, 5 mM KH₂PO₄; pH 7,6) que duplica el valor inicial del cultivo cosechado, y finalmente se resuspendieron a una densidad de 3×10^7 parásitos/mL en 100 µl de solución Amaxa Basic Parasite (Lonza) compuesta por 81,8 µl de la solución 1 y 18,2 µl del suplemento. A esta suspensión se agregaron 15 µL de una solución acuosa conteniendo 25 µg de la construcción pLexsyHyg2-INF-RXM o pLexsyHyg2 hGrx-rxmRuby2, ambos plásmidos en su forma circular (no linearizada). La mezcla ADN/células se colocó en cubetas de electroporación de 0,2 mm (Lonza) y se aplicó el programa de electroporación U-003 del equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). De la misma manera, 100 µL de la suspensión celular fueron electroporadas con 10 µL de H₂O estéril (control negativo). Luego de la transfección, se transfirieron las cubetas a hielo por 10 minutos. Las células electroporadas se resuspendieron en 500 µL de medio BHI completo fresco (sin higromicina) y se transfirieron a una botella de cultivo de 25 cm² conteniendo 4,5 mL de medio de cultivo BHI completo (sin higromicina). El cultivo se incubó a 26 – 28 °C durante 24 horas, luego de lo cual 3 mL del mismo fue centrifugado a 2.000 g, 3 minutos, a temperatura ambiente. El pellet celular se resuspendió en 200 µl de medio residual y se distribuyó en membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (30 µl/membrana) que se colocó sobre placas de Petri (6 de 30 mm de radio) conteniendo medio BHI 2X-agar (200 ml de BHI 2X-agar 2%: 2 g en 100 ml H₂O, autoclavado + 70 ml de BHI 2X: 5,18 g en 70 ml H₂O, autoclavado, + 20 ml de FCS inactivado, + 8 ml de HEPES 1 M, pH 7,4 autoclavado, + 2 ml de Pen/Strep, + 400 µl de Hemina + higromicina 100 µg/ml). Las placas se incuban a 26 – 28 °C por 5 - 7 días hasta la aparición de colonias discretas sobre la membrana de nitrocelulosa. Las colonias luego se transfieren con un tip de micropipeta a 1 mL de medio suplementado con 100 µg/ml del antibiótico higromicina en una placa de 24 pocillos (pre-screening). Esto debe realizarse en un plazo no mayor a 3 semanas luego del plaqueo. Estas placas de cultivo se incubaron a 26 – 28 °C sin agitación por 48 horas. Para el screening de dichos clones, sobre una placa de cultivo de 24 pocillos conteniendo 1 mL/pocillo de medio BHI completo con 100 µg/ml de higromicina se inoculó 0,1 mL/pocillo de cultivo de cada clon de interés. Las placas se incubaron a 26 – 28 °C, sin agitación, durante 2 - 3 días, luego de lo cual la intensidad de fluorescencia de las células fue medida por citometría de flujo o por microscopía de fluorescencia como se detalla en las secciones 3.8 y 3.9, respectivamente.

3.6.5. Cultivo de *T. brucei*

En este trabajo se emplearon las líneas celulares 449 y 514-1313 de la forma sanguínea de *T. brucei brucei* cepa 427. La primera de ellas contiene integrado en su genoma una copia de la secuencia codificante para la proteína represora de tetraciclina, mientras que la segunda contiene dos copias de ésta y una copia de la secuencia codificante para la T7-ARN polimerasa.

Las células se cultivaron en medio HMI-9 completo (Isocove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen), conteniendo 10% v/v de SFB libre de tetraciclina (PAA o Invitrogen) y suplementado por litro con: 3,02 g de NaHCO₃, 28,2 mg batocuproína, 39 mg timidina, 136 mg hipoxantina, 182 mg L-cisteína, 0,2 mM β-mercaptoetanol, 10 U penicilina/estreptomicina (Gibco). Además, para retener la expresión de las proteínas heterólogas (TR y T7-ARN pol), este medio de cultivo se suplementó con 0,2 mg fleomicina (Invitrogen; línea celular 449) y adicionalmente con 0,5 mg geneticina (Invitrogen; línea celular 514-1313), respectivamente. Higromicina (Invitrogen), agente de selección para la construcción pHD1700-hGrx-rxmRuby2 y pHD1700 rxCUTie2, se empleó a una concentración final de 5 µg/mL. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de crecimiento aeróbicas con 5% de CO₂, en atmósfera húmeda y a 37°C.

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

3.6.6. Nucleofección de la forma infectiva de *T. brucei brucei*

Para realizar la transfección de las líneas celulares 449 y 514-1313 de *T. brucei brucei* con la construcción pHD1700-hGrx-rxmRuby2 o pHD1700-rxCUTie2, se cosecharon 30 millones de células en fase de crecimiento exponencial media (0,8 - 1 x 10⁶ parásitos/mL) a 2.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y luego se resuspendieron en 100 µl de solución Amaxa Basic Parasite (Lonza) compuesta por 81,8 µl de la solución 1 y 18,2 µl del suplemento. A ésta se le agregó 10 µg de la construcción pHD1700-hGrx-rxmRuby2 o pHD1700 rxCUTie2 en un volumen de 5 µL, las cuales fueron previamente linealizadas (para favorecer su integración por recombinación homóloga) con 10 U de enzima *NotI* (New England Biolabs) durante toda la noche y recuperadas por precipitación con etanol absoluto (C. Erba) y centrifugación a 10.000 g, 4°C por 10 minutos. La mezcla ADN/células se colocó en cubetas de electroporación de 0,2 mm (Lonza) y se aplicó el programa de electroporación X-001 del equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). A continuación, los parásitos

transfectados se transfirieron a 30 mL de medio de cultivo HMI-9 completo conteniendo fleomicina (línea celular 449) o fleomicina y geneticina (línea celular 514-1313), y luego se realizaron dos diluciones seriadas 1:10 en un volumen final de 30 mL con el mismo medio de cultivo fresco. Al cabo de 24 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂, a cada pocillo de las placas se le agregó 1 mL de medio de cultivo fresco (conteniendo los correspondientes antibióticos) suplementado con 10 µg/mL de higromicina de manera tal que la concentración final de este antibiótico fuera de 5 µg/mL. A partir del cuarto o quinto día se comenzaron a detectar parásitos resistentes a higromicina en la línea celular 449 transfectada con ambas construcciones. Los clones de interés se criopreservaron de acuerdo al siguiente protocolo: 1 - 5 x10⁷ parásitos en fase exponencial de crecimiento se cosecharon por centrifugación a 2.000 g a temperatura ambiente y se resuspendieron en 1mL de medio de cultivo HMI-9 completo fresco suplementado con los correspondientes antibióticos y glicerol 10% v/v. Los criotubos se almacenaron a -80°C.

3.7. Ensayos de FRET en parásitos promastigotes *L. tarentolae* INF-RXM

Promastigotes de *L. tarentolae* pLexsyHyg2 INF-RXM cosechados en fase exponencial (2 - 3 x10⁷ células/mL) se diluyeron al tercio en PBS pH 7,4 a temperatura ambiente y se analizaron en citómetro Fusion (ver **punto 3.9**) para verificar el estado redox y FRET basal. Para estimular la producción de AMPc endógeno, los parásitos se incubaron durante 1 hora a 37°C en PBS pH 5,5 (Bhattacharya, 2009). Como condición control, otra muestra de parásitos se incubó en PBS pH 7,4 a la misma temperatura y tiempo. Durante esta incubación se tomaron muestras de células las cuales se analizaron por citometría de flujo previo o posterior a la incubación con DTT 10 mM por 30 minutos. La inhibición de las fosfodiesterasas de *L. tarentolae* (Lt PDEs) mediante incubación por 3 horas o 18 horas con diferentes concentraciones de un compuesto derivado del imidazol (compuesto 35, gentilmente cedido por la Dra. Carmen Gil, (Sebastián-Pérez, 2018)) previo a la inducción de AMPc. Por otro lado, la capacidad de respuesta del biosensor rxmRuby2 fue evaluada mediante exposición de las células a diferentes concentraciones de diamida (0 - 200 µM) y de 1 mM de H₂O₂ por 30 - 40 minutos. En todos los experimentos, se incorporó como control de la expresión del sensor a parásitos promastigotes de la línea salvaje.

3.8. Citometría de flujo

Las mediciones de intensidad de fluorescencia de la hGrx-rxmRuby2, INF-RXM y rxCUTie2 expresada por las líneas transgénicas de *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania* se realizaron en un

citómetro Attune NxT (ThermoFisher), BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) o FACS Aria FUSION (BD Biosciences). Este último equipo está integrado a una cabina de bioseguridad, lo cual permite analizar muestras de riesgo biológico.

El día del ensayo, los parásitos en distintas fases de crecimiento, estadio o provenientes de animales infectados se resuspendieron a una densidad final de 1×10^6 células/mL en PBS-glucosa 1% p/v, luego de haber sido centrifugados a 2.000 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los parásitos se trataron con distintas concentraciones de agentes oxidantes, compuestos químicos y reductor (DTT), y durante diferentes tiempos, tal como se detalla en distintas partes de la sección Resultados. Previo al análisis por citometría, a las suspensiones celulares con sensor rxCUTie2 se les agregó ioduro de propidio (PI, agente intercalante de ácidos nucleicos no permeable que empleamos como marcador de pérdida de integridad de membrana y por lo tanto de viabilidad celular) a una concentración final de 2 $\mu\text{g/mL}$, mientras que por superposición espectral con la proteína rxmRuby2, no fue posible su uso en ensayos con parásitos expresantes de hGrx-rxmRuby2 o INF-RXM. Para estos casos, se tuvo en cuenta la distribución de la población celular en la gráfica de dispersión lateral (Side Scatter o SSC) *versus* dispersión frontal (Forward Scatter o FSC) de la luz, como se detalla en el próximo párrafo.

Durante las adquisiciones de las muestras en los citómetros, las células se excitaron con láseres de 488 y/o 561 nm. Midiendo la señal de SSC en función de la señal FSC adquirida con un $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm es posible discriminar las células de los detritos celulares en un gráfico de puntos SSC vs. FSC (ambos en escala logarítmica). Los eventos que presentan un tamaño y granularidad inferior al punto de corte, el cual es variable dependiendo la especie y estadio del parásito, se excluyeron de los análisis posteriores de fluorescencia de cada biosensor.

Para la rxYFP se empleó el láser con $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm y se colectó la emisión de fluorescencia con filtros de 530 ± 30 nm en el equipo Attune o Accuri. Las líneas celulares transgénicas que expresaron el biosensor INF-RXM con par FRET Clover/rxmRuby2 se analizaron en citómetro FUSION empleando láser con $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm y filtros de emisión para 530 ± 30 nm y 610 ± 20 nm. La señal de la rxmRuby2 se excitó con el láser 561 nm y la emisión de fluorescencia se colectó con filtro de 620 ± 15 nm o 610 ± 20 nm, presentes en los equipos Attune o FUSION, respectivamente.

Los datos obtenidos se graficaron en histogramas de eventos vs. Log intensidad de fluorescencia de las proteínas fluorescentes de interés y se analizaron con los programas indicados en la sección **3.13.2**.

3.9. Microscopía de fluorescencia

La expresión de los biosensores (rxmRuby2, Clover-AMPC-rxmRuby2, CFP-GMPc-rxYFP e IFN-RXM) se evaluó por técnica de microscopía de fluorescencia sobre muestras frescas y fijadas de *E. coli* y distintas especies de tripanosomátidos, respectivamente.

Para la preparación de las muestras frescas, una gota del cultivo inducido (diluído 1/5 en PBS) se montó sobre un portaobjetos y cubreobjetos previamente lavados con isopropanol, y luego sellado con esmalte de uñas transparente. La preparación de las muestras fijadas se realizó como se describe a continuación. Se centrifugaron 10 mL de cultivo de parásitos inducidos por 24 horas con 1 µg/ml de oxitetraciclina conteniendo aproximadamente 10 millones de células/mL a 2.000 *g* durante 10 minutos. Luego las células se lavaron dos veces con PBS y se repitió la centrifugación. El pellet se resuspendió de manera homogénea en *p*-formaldehído 4% p/v en PBS (50 µL por cada millón de células) e incubó en hielo durante al menos 20 minutos para permitir el proceso de fijación de las estructuras celulares. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS intercalados con centrifugaciones a 2.000 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los parásitos se resuspendieron en PBS de forma tal de obtener 2 millones de células / 50 µL (una gota). Se colocaron dos gotas en portaobjetos recubiertos con poli L-lisina (Starfrost) que luego se incubaron durante toda la noche a 4°C para facilitar la adhesión celular a la superficie. Los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS y luego se montaron con una gota de la solución de montaje Fluoroshield (Abcam) la cual contiene el fluoróforo DAPI para teñir ácidos nucleicos.

Dependiendo el grado de resolución buscado, las muestras se analizaron en microscopio de epifluorescencia o confocal disponibles en la Unidad de Microscopía, Instituto Pasteur de Montevideo, como se detalla a continuación.

Las imágenes de epifluorescencia fueron adquiridas en un microscopio invertido Olympus IX81 equipado con una cámara CCD (HAMAMATSU ORCA-ER) con lente objetivo de inmersión en aceite UPlanSapo 100X 1.40 Oil para la visualización de las bacterias y el lente objetivo LUCPlan FLN 40X 1.40 para visualización de los tripanosomátidos. Se utilizó campo claro para obtener información sobre la morfología general de las bacterias y parásitos, el filtro de fluorescencia para λ_{ex} 426-446 nm / λ_{em} 460-500 nm para la detección de la señal de la CFP, el filtro de fluorescencia λ_{ex} 470-495 nm / λ_{em} 510-550 nm para la detección de la señal de la Clover o rxYFP, y el filtro de fluorescencia λ_{ex} 530-550 nm / λ_{em} 570 nm para la detección de la señal de la rxmRuby2.

Las imágenes de fluorescencia confocal se obtuvieron en un microscopio láser confocal espectral invertido Zeiss LSM 880 con lente objetivo de inmersión en aceite 63X (Plan-APOCHROMAT, 1.4 na) empleando los siguientes pares de láseres y filtros: UV $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 355/455-500, Argón $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ de 488/510-550 y Argón $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 561/LP 615 para detectar la señal del DAPI, de la Clover y de la rxmRuby2, respectivamente. Se capturaron imágenes de campo claro para obtener información sobre la cantidad y morfología general de los parásitos. Las imágenes fueron adquiridas sobre habitáculo termostatzado a 28°C empleando el software Zen.

3.10. Infección de ratones BALB/cJ con *T. brucei brucei* hGrx-rxmRuby2

Los procedimientos de manipulación animal aquí descritos fueron previamente aprobados por la Comisión de Ética de Uso Animal del Instituto Pasteur de Montevideo (CEUA; Protocolo 004-11), se ajustan a las normas de éticas vigentes según la Ley Nacional 18.611 y fueron realizados en dependencias de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del IP-Montevideo.

Se empleó un total de cuatro ratones hembras de la cepa BALB/cJ y de 6 - 8 semanas de vida (peso promedio = 19 gramos). Dos de estos animales (grupo problema) se alimentaron con agua suplementada con 1 mg/mL oxitetraciclina 72 horas previas y durante la infección, con recambio de la misma cada 48 horas. Otros dos animales (grupo control) se alimentaron con agua común. Los animales se inocularon por vía intraperitoneal con 300 μL de PBS-glucosa 1% p/v conteniendo 10^4 *T. brucei brucei* hGrx-rxmRuby2 en fase de crecimiento exponencial. El grupo problema se infectó con parásitos crecidos durante 24 horas en medio de cultivo con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oxitetraciclina y el grupo control se infectó con parásitos cultivados en ausencia de oxitetraciclina.

Cada 72 - 96 horas se controló el peso de los animales y se extrajeron muestras de sangre (~ 50 μL) mediante punción de la vena submandibular colectando las mismas en tubos con 5 μL EDTA tripotasio (3K-EDTA, 360 μL de anticoagulante 3K EDTA Deltalab + 840 μL PBS 1X - EDTA 2 mM, filtrado en esterilidad con filtro de 0,22 μm). La sangre anticoagulada se homogenizó por agitación suave y se diluyó 20 veces en solución de lisis de glóbulos rojos estéril 1X (preparada en agua a partir de *stock* 10X, detallada como 0,8% p/v NH_4Cl , 0,084% p/v NaHCO_3 y 0,038% p/v $\text{Na}_2\text{-EDTA}$). Estas muestras se emplearon para determinar parasitemia mediante recuento en cámara de Neubauer (sección 3.6.5) y para análisis por citometría de flujo como se describió en la sección 3.8.

Por razones éticas, aquellos animales con una parasitemia $\geq 10^8$ parásitos/mL o que presentaran un estado de salud deteriorado se sacrificaron por dislocación cervical.

Para los ensayos de imagenología, los ratones fueron anestesiados con 2.5% de isoflurano: 95% oxígeno. Posteriormente, la emisión de luz fue registrada a temperatura ambiente utilizando el equipo In Vivo Xtreme II (Bruker), retroiluminado con un detector de dispositivo de carga acoplada de 4 megapixels, y el programa Molecular Imaging Software “MI” 7,5 que permite la adquisición de imágenes en dos modalidades: fluorescencia y rayos-X. Durante la adquisición de imágenes, los animales se ubicaron en posición ventral o dorsal y se mantuvieron anestesiados con un flujo constante de 2,5% isoflurano en oxígeno. Se utilizó para la modalidad de fluorescencia: Modo de sensibilidad alta, 4 x 4 pixels, tiempo de exposición de 1, 10, 30 o 60 segundos / intervalo de 60 segundos, campo de observación de 190 mm, f-Stop 1,1, plano focal 0 y referencia focal de bandeja. La intensidad de fluorescencia fue colectada mediante una lámpara de Xenón con filtro de excitación a 540 ± 10 nm y un filtro de emisión a 600 ± 20 nm. Se utilizó para la modalidad rayos-X: Modo de sensibilidad de alta velocidad, tiempo exposición de 4 segundos, campo de observación 190 mm, f-Stop 5,60, plano focal 0 y referencia focal de rayos-X. Las imágenes de fluorescencia y de rayos-X fueron analizadas y superpuestas utilizando el software libre de Fiji (Schindelin, 2012).

3.11. Programas computacionales

3.11.1. Base de datos

Se recurrió a la información disponible en el *National Center for Biothechnology Information* (Sayers, 2023) y la base de datos que reúne información genómica y proteómica sobre distintas especies de tripanosomátidos (TriTryp, (Shanmugasundram, 2023)). Las secuencias de los módulos CNBD de las proteínas se encuentran disponible en la base de datos UniProt (UniProt, 2025).

3.11.2. Procesamiento de datos e imágenes

El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas fue realizado con el software Chromas y Vector NTI. De manera similar, las construcciones enviadas a sintetizar por Genscript, identificación de sitios de corte, clonado y ORF correctos se analizaron en el software SnapGene y VectorNTI. El alineamiento de secuencias múltiples se realizó con el servidor ClustalW en la MPI Bioinformatics Toolkit (Bioinformatics Toolkit, 2020).

Los datos obtenidos con el equipo Attune y FUSION se procesaron con el software FlowJo 10 (Tree Star, Inc.), mientras que los datos obtenidos con el equipo Accuri se procesaron con el programa BD Accuri C6 software.

El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia y confocal se realizó con el programa Image J (Schneider, 2012).

Todos los esquemas se crearon en Power Point® (Microsoft) y en Biorender (BioRender.com)

Las gráficas y los test estadísticos de los diferentes experimentos se realizaron con el programa GraphPad Prism version 10.0.0 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com.

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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Objetivo específico 1: Sensor redox rxmRuby2

4.1.1. Diseño molecular y generación de la proteína rxmRuby2.

Para generar la versión redox sensible de la proteína mRuby2, se realizó una comparación de alineamientos estructurales entre varias proteínas fluorescentes con corrimiento al rojo (mCherry, PDB id: 2H5Q; Scarlet, PDB id: 5LK4; mRuby1, PDB id: 3U0L; mRuby2 and mRuby3) (Bajar, 2016) y las proteínas redox sensible derivadas de GFP (roGFP2: PDB 1JC0) (Hanson, 2004) y de YFP (rxYFP: PDB 1H6R) (Ostergaard, 2001). El análisis realizado sugiere que las posiciones ocupadas por los residuos Thr148 (Hoja β -8) y Asp200 (Hoja β -11) son óptimas para incluir dos residuos de cisteína cuyos grupos tiólicos se encontrarían expuestos al solvente y a una distancia apropiada para formar un enlace disulfuro reversible. Tomando como referencia la estructura, el alineamiento y el entorno electrostático de la proteína rxYFP (Hansen, 2006), se seleccionó a la proteína fluorescente con corrimiento al rojo que más favoreciera la polarización de este par de tioles (ej. reduciendo el valor de pKa) y la interacción con su sustrato redox, el glutatión (carga neta -1). Como se muestra en la **Figura 28** mRuby y mRuby2 presentan el entorno con mayor distribución de cargas positivas en la proximidad de estas cisteínas debido a la presencia de los residuos Arg202 y Lys 224 (**Figura 28 A**). Estos residuos están ausentes en las otras proteínas fluorescentes. Por otro lado, el análisis computacional por técnica de dinámica molecular indicó que la oxido-reducción de las cisteínas conllevaría a cambios conformacionales en el cromóforo que deberían modificar el espectro de absorción y emisión de la proteína. (**Figura 28 A**). Por estas razones y porque mRuby2 presenta mayor brillo y fotoestabilidad que el resto de proteínas fluorescentes candidato, es que la misma fue seleccionada para generar un sensor redox con corrimiento al rojo.

Es importante señalar que a pesar que bajo condiciones no-reductoras mRuby2 adopta una conformación monomérica (Kredel, 2009), (Lam, 2012), optamos por mutar el residuo Cys118 (expuesto al solvente) por una serina, de manera de evitar la posible formación de puentes disulfuros no específicos. Esta versión redox sensible de mRuby2 fue denominada rxmRuby2 y el clonado de su secuencia en los distintos vectores de expresión se detalla en la **sección 3.2.1** de Materiales y Métodos.

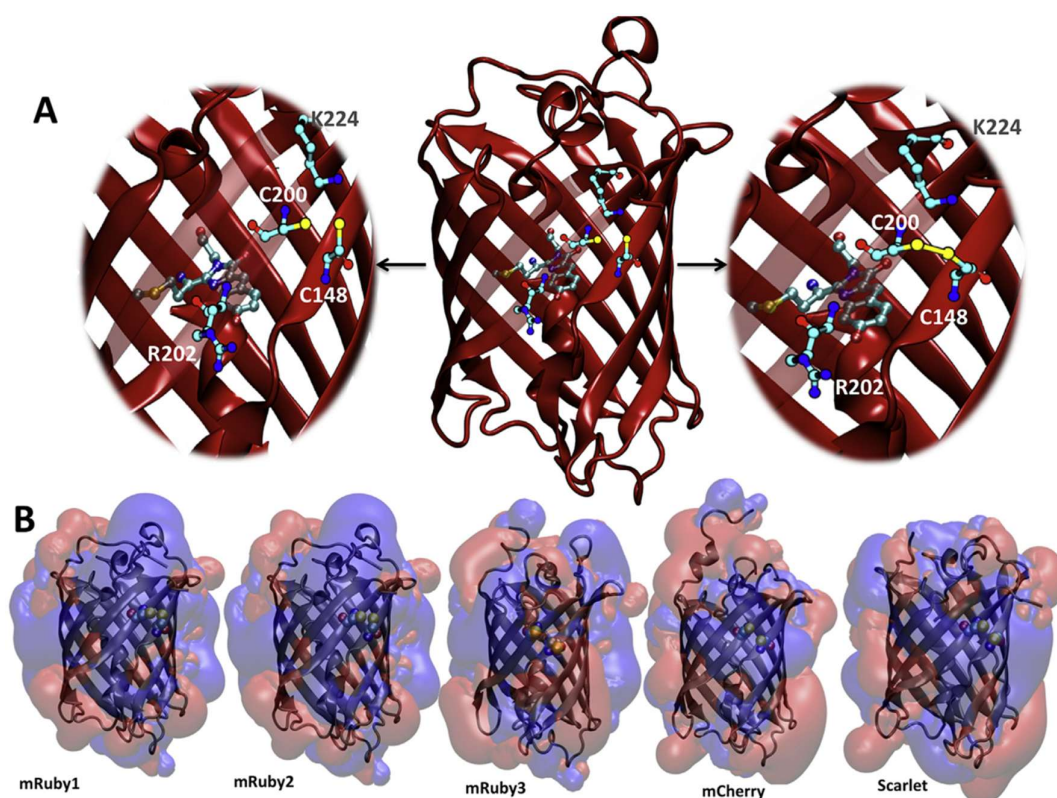


Figura 28. Modelo 3D de rxmRuby2 y otras proteínas fluorescentes con corrimiento al rojo. A) Representación de rxmRuby2 generada a partir de la estructura cristalográfica de mRuby2 (Protein Data Bank code 3U0L). Los residuos discutidos en el texto son mostrados como esferas y palillos en colores llamativos, mientras que el cromóforo se encuentra representado en un gris lustroso. El estado reducido y el estado oxidado de la proteína se muestran como ampliaciones a la izquierda y a la derecha, respectivamente. B) Superficie de potencial electrostático sobre el esqueleto de diferentes proteínas con corrimiento al rojo. Las superficies están dibujadas como +25 mV (azul) y -25 mV (rojo), y los residuos de cisteínas se muestran como esferas y palillos.

4.1.2. Expresión y purificación de la proteína rxmRuby2

Se procedió a la expresión y purificación de la forma recombinante del rxmRuby2 a partir de bacterias *E. coli* BL21 (Figura 29) tal como fue descrito en la sección 3.3.1.

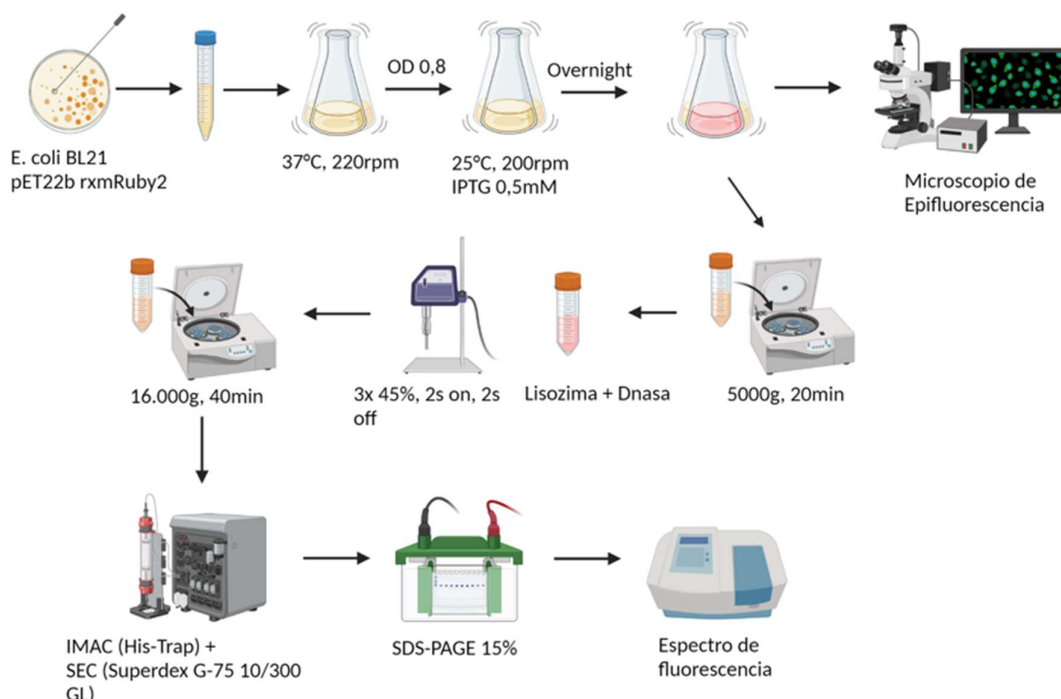


Figura 29. Esquema del proceso de expresión, purificación y análisis del sensor rxmRuby2.

En primer lugar, la producción y correcta maduración del cromóforo de la rxmRuby2 en bacterias inducidas para expresar el biosensor fue confirmada mediante microscopia de fluorescencia (**Figura 30 A**). El análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes de muestras de estas bacterias mostró la presencia de una banda predominante cercana a los 29 kDa en la fracción soluble del lisado celular (**Figura 30 B**). Este peso molecular es compatible con el estimado para la rxmRuby2 recombinante (27,4 KDa), lo cual sugiere que la proteína de interés fue expresada en forma soluble. Además, esto fue confirmado macroscópicamente por la tinción roja adquirida por la columna de IMAC (**Figura 30 B**). Durante el proceso de purificación la banda de interés representó una proporción minoritaria en muestras de fracción no unida (FNU), lo cual indica una retención eficiente de la proteína etiquetada a la resina de níquel. Por otro lado, el lavado con imidazol 10 mM (L) logró eliminar una gran cantidad de proteínas contaminantes que se unieron de manera inespecífica y con menor afinidad a la columna HisTrap. La elución completa de la proteína recombinante se logró a concentraciones de imidazol de 250 mM, fracciones E2A - E2D (**Figura 30 B**). Las fracciones con mayor contenido de rxmRuby2 (E2A - E2C) fueron recolectadas (**Figura 30 C**) y, luego de realizarles un cambio de buffer, sometidas a cromatografía de exclusión molecular para mejorar la pureza y estimar el estado oligomérico

de la proteína. A partir de la preparación de más de 10 lotes, estimamos un rendimiento promedio de rxmRuby2 de 5 mg por litro de medio de cultivo, con un nivel de pureza > 90%.

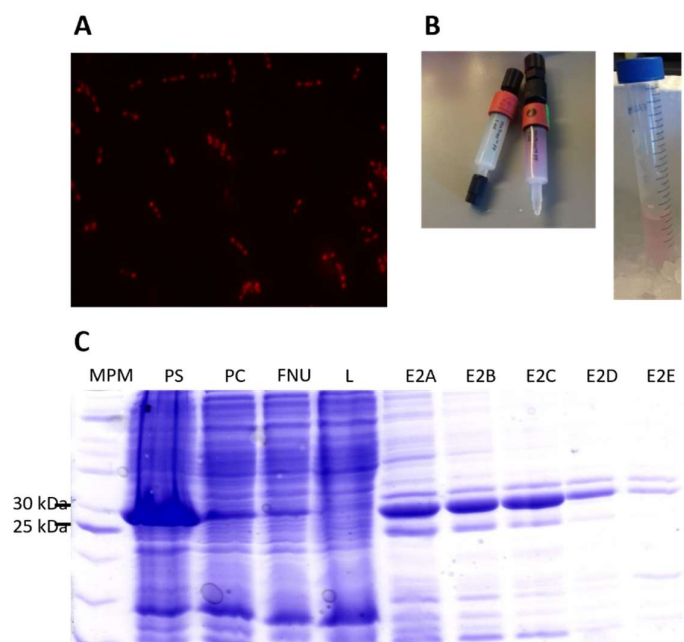


Figura 30. Expresión y purificación de rxmRuby2 recombinante. A. Imagen tomada en el microscopio de epifluorescencia de bacterias *E. coli* BL21 crecidas en presencia de IPTG 500 μ M durante 18 horas. B. Fotografías de columna de IMAC cargada o no con muestra conteniendo 6xHis-rxmRuby2 y de tubo Falcon con muestra de proteína recombinante proveniente de cromatografía de exclusión molecular (SEC). C. Análisis por electroforesis en gel (SDS-PAGE 15%) del proceso de purificación por cromatografía de afinidad a metales (IMAC). MPM: marcador de peso molecular (Benchmark Protein Ladder); PS: lisado celular total; PC: fracción soluble de lisado celular (pre-columna); FNU: fracción no unida a la IMAC; L: lavado; E2A -E2E: fracciones de percolado.

Por cromatografía de exclusión molecular se observó que la proteína rxmRuby2 oxidada eluye con un volumen de retención correspondiente al de la especie monomérica (masa molecular aparente vs teórica, 28,3 kDa vs 27,4 kDa, respectivamente; **Figura 31 A**). Esta cromatografía también permitió eliminar de la muestra a un contaminante de alto peso molecular que eluye con un volumen de retención cercano a los 8 mL y no presenta absorción a 560 nm.

En un gel de SDS-PAGE 15% (m/v) realizado bajo condiciones desnaturalizantes, la forma reducida y oxidada de la rxmRuby2 muestran un patrón de migración similar (**Figura 31 B**). Esto difiere del comportamiento descrito para los biosensores redox basados en las proteínas GFP e YFP, cuya forma reducida y oxidada (disulfuro) presentan diferente movilidad electroforética (Ostergaard, 2001) (Kojer, 2012).

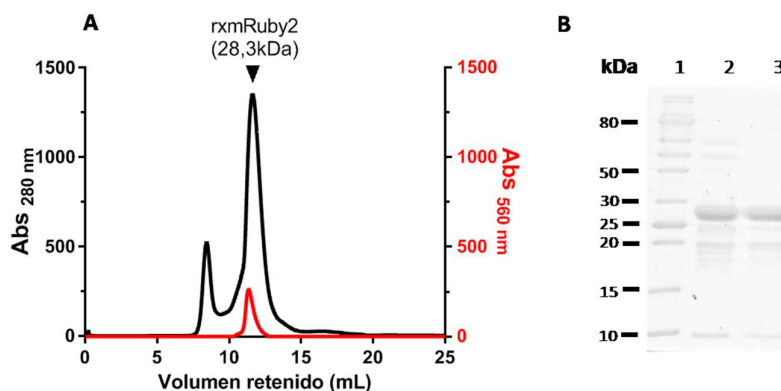


Figura 31. Análisis cromatográfico y electroforético de rxmRuby2. A. Cromatografía de exclusión molecular. Los ejes Y indican las unidades de absorbancia a 280 nm (leyenda negra) y 560 nm (leyenda roja). B. Gel SDS-PAGE 15% (m/v) correspondiente a rxmRuby2 en forma reducida (carril 2, muestra tratada con DTT 2 mM) y oxidada (carril 3, muestra tratada con GSSG 1 mM). Carril 1, MPM.

4.1.3. Caracterización *in vitro* del sensor rxmRuby2 a diferentes estímulos redox.

Todos los ensayos bioquímicos descritos en esta sección fueron realizados con muestras de H6-rxmRuby2 que presentaban alto grado de homogeneidad (> 90%) luego de cromatografía de exclusión molecular.

Un barrido espectral mostró que a pH fisiológico (pH 7,0) el espectro de excitación y emisión tanto de la forma reducida como oxidada de la rxmRuby2 es idéntico al reportado para la mRuby2 (Lam, 2012), (Bajar, 2016) (**Figura 32**). rxmRuby2 presenta un máximo de excitación y emisión a 560 y 600 nm, respectivamente, así como un pico de excitación a menor intensidad a 520 nm. Además, la intensidad de los picos de excitación y emisión de la forma oxidada de rxmRuby2 fue notoriamente inferior a la de su forma reducida (**Figura 32**). Por lo tanto, de manera similar a la rxYFP (Ostergaard, 2001) y a la rxRFP (Fan, 2015), (Fan Y. , 2016), pero opuesto a la roGFP2 (Dooley, 2004), los cambios redox-dependientes del espectro de fluorescencia de la rxmRuby2 son de carácter intensiométrico y no ratiométrico.

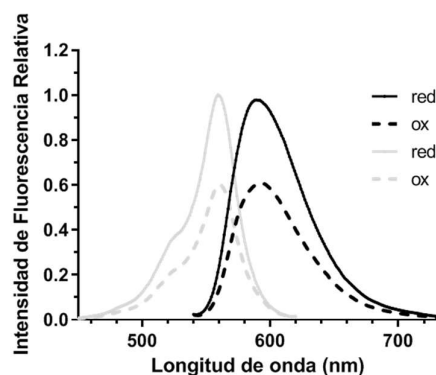


Figura 32. Caracterización espectral del biosensor rxmRuby2. Cambios redox-dependientes en el espectro de excitación (trazo gris) y emisión (trazo negro) de rxmRuby2 en estado reducido (línea entera) y oxidado (línea punteada).

Para determinar la especificidad de la rxmRuby2 por oxidantes, la proteína previamente pre-reducida fue tratada con un exceso (50 veces) de peróxido de hidrógeno, diamida, y GSSG, o (20 veces) de ONOOH. Aunque con diferentes cinéticas e intensidad, todas estas moléculas produjeron una disminución tiempo-dependiente y reversible en la intensidad de fluorescencia de la proteína, y por lo tanto una oxidación de la misma (**Figura 33 A**). Para estos oxidantes se distinguen al menos dos fases de oxidación, una rápida que tiene lugar al cabo de la primera medición (2 min) e implicaría condiciones de estado estacionario, y otra más lenta a partir de los 2 minutos (2 a 46 min), donde se alcanzarían condiciones de equilibrio entre algunas de las especies formadas durante la primera fase. Tomando como referencia los valores de velocidad inicial de oxidación (estado estacionario), los compuestos muestran el siguiente orden de capacidad oxidativa de rxmRuby2, o, dicho de otra forma, rxmRuby2 muestra el siguiente orden de sensibilidad por estos oxidantes: GSSG (19,8% ox/min) > diamida (14,7% ox/min) > H_2O_2 (11,1% ox/min) ~ ONOOH (10,6% ox/min).

Más allá que para algunos oxidantes la segunda fase (2 - 46 min) podría descomponerse en sub-fases con distintas velocidades de oxidación, durante esta fase la cinética de oxidación del biosensor se enlenteció 21 (GSSG), 17 (Diamida), 24 (H_2O_2) y 46 (ONOOH) -veces, aunque mantuvo las mismas tendencias oxidante-específicas observadas en la primera fase (GSSG 0,96% ox/min > diamida 0,90% ox/min > H_2O_2 0,46% ox/min ~ ONOOH 0,23% ox/min). En un contexto celular las glutarredoxinas catalizan la oxidorreducción de tioles proteicos por GSH/GSSG (Chai, 2023).

Teniendo eso en cuenta y que rxmRuby2 mostró preferencia por GSSG como sustrato oxidante, decidimos poner a prueba esa hipótesis incubando el biosensor pre-reducido con una concentración equimolar de hGrx (5 μ M) en ausencia o presencia de un exceso de GSSG (250 μ M). En presencia de hGrx y GSSG la velocidad inicial de oxidación del biosensor (45,9% ox/min) fue al menos 2,3-veces superior respecto a la reacción espontánea entre rxmRuby2 y GSSG (19,8% ox/min). Bajo estas condiciones, se logró un 90% de oxidación del biosensor en los primeros 2 minutos, alcanzando niveles mínimos de reducción al cabo de 10 minutos. Por otro lado, en ausencia de GSSG, la oxidación directa de rxmRuby2 por hGrx es insignificante (2,1% ox/min), lo cual confirma que el proceso de oxidación del biosensor es mediado por un tiol de bajo peso molecular. Esto demuestra que la redoxina cataliza eficientemente la oxidación de rxmRuby2 dependiente de GSSG, como ya ha sido reportado para otros biosensores. (Björnberg, 2006), (Muller, 2017).

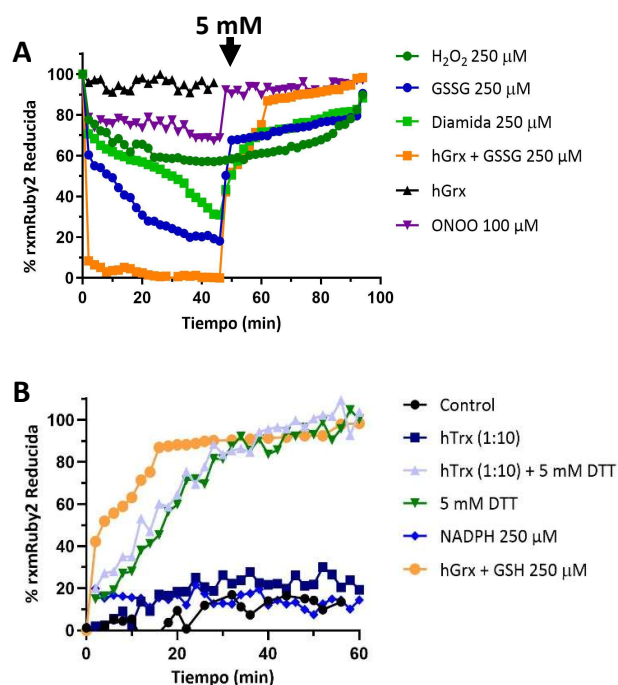


Figura 33. Oxidoreducción del biosensor rxmRuby2. A. Cursos temporales de oxidoreducción de rxmRuby2 (5 μ M) pre-reducida con DTT y tratada con 100 μ M peroxinitrito (ONOOH), o 250 μ M H_2O_2 diamida o GSSG, o 5 μ M hGrx en ausencia o presencia de GSSG (250 μ M). Una muestra de rxmRuby2 reducida (5 μ M) y sin tratar se incluye como control. Luego de 46 min, a todas las muestras se les agrega DTT (5mM, flecha negra). B. Cursos temporales de reducción de rxmRuby2 oxidada (1 μ M) no tratada

(control), o tratada con GSH (250 μ M) y hGrx1 (1 μ M), NADPH (250 μ M), DTT (5 mM), o con *E. coli* Trx reducida (10 μ M) en ausencia (cuadrado azul) o presencia de 5 mM DTT (triángulo celeste).

Transcurridos 46 minutos de incubación, la reversibilidad del fenómeno de pérdida de fluorescencia del biosensor ocasionado por los distintos oxidantes fue estudiado mediante el agregado de un exceso de agente reductor (DTT, 1000 X respecto a rxmRuby2; **Figura 33 A**). En todos los casos se pudo apreciar una recuperación casi completa de la fluorescencia basal, aunque con cinéticas diferentes dependiendo del oxidante. Este resultado es de suma relevancia porque confirma que el cambio en intensidad de fluorescencia del biosensor inducido por los oxidantes (varios de ellos fisiológicos) es de origen redox. Para las muestras tratadas con GSSG y diamida, y de manera similar a lo observado en la fase de oxidación, se distinguió un comportamiento bifásico (estado estacionario seguido de equilibrio) de reducción del biosensor. Durante la primera fase, la velocidad de reducción del biosensor en la muestra que contenía GSSG (16,1% red/min) fue al menos 2,5 veces superior a la de la muestra con diamida (6,20% red/min). En la segunda fase, la velocidad de reducción del biosensor fue similar para ambas muestras. (0,92% red/min). Para la condición con GSSG, cuando la hGrx forma parte del sistema, también se aprecian al menos dos fases de reducción con cinéticas (1^{ra} fase: 21,1% red/min y 2^{da} fase: 1,22% red/min) similares a las descritas anteriormente para GSSG y diamida. No obstante, la magnitud de los cambios redox en rxmRuby2 en presencia de la oxidorreductasa (ej. 90% reducción de rxmRuby2 en 20 min) es notoriamente superior a la registrada en su ausencia (ej. 56% - 45% de reducción en el mismo lapso de tiempo para GSSG y diamida).

Por otro lado, la reducción del biosensor oxidado con ONOOH fue casi completa (68% a 92%) al cabo de 2 minutos de exposición a DTT, y con una velocidad (11,8% red/min) equiparable a la observada en la primera fase de reducción de las muestras tratadas con diamida o GSSG. A diferencia de las muestras expuestas a los demás oxidantes, la cinética de reducción del biosensor oxidado por H₂O₂ mostró una primera fase lenta (0,43% red/min, de los 46 - 85 min) y una segunda con una marcada aceleración (2,1% red/min, de los 85 - 95 min). Para la condición con H₂O₂, la lenta cinética de oxidación del biosensor estaría indicando una reacción no favorable entre los tioles de rxmRuby2 y este oxidante. Mientras que la igualmente lenta reducción del mismo por DTT sugiere la formación de una especie intermediaria que nos es fácilmente reducible. La reacción de un tiol proteico con H₂O₂ da lugar a la formación de un ácido sulfénico (y H₂O), el cual a su vez podría reaccionar con un segundo tiol para producir un

disulfuro (y H_2O) o bien con una segunda o tercera molécula de peróxido para dar lugar a una especie sobreoxidada del tiol, un ácido sulfínico y un ácido sulfónico, respectivamente (Alvarez, 2022). Mientras que el ácido sulfénico es reducible por DTT, el sulfínico y el sulfónico no lo son. Solo en ciertas peroxidasas del tipo peroxirredoxina, las sulfirredoxinas catalizan la lenta reversión al estadio tiol del ácido sulfínico (Woo, 2003). En principio, cualquiera de los dos tioles de la rxmRuby2 podría reaccionar indistintamente con H_2O_2 . Se desconoce si la formación de uno o dos ácidos sulfénicos en rxmRuby2 es capaz de inducir los cambios conformacionales en la proteína que modifican sus propiedades espectrales como cuando se forma el disulfuro intramolecular. Pero asumiendo que ello fuera así, claramente la formación y reducción de alguna de estas especies es el cuello de botella cinético.

Al igual que H_2O_2 , ONOOH es capaz de inducir la sobreoxidación de tioles (Reddie, 2008). Esta reacción generalmente se ve favorecida en exceso de oxidante. En caso de tener lugar una sobreoxidación del biosensor, éste se volvería insensible a la reducción, lo cual afectaría su capacidad de detección dinámica de las especies de interés. Por lo tanto, en condiciones biológicas la restauración de la fracción reducida del mismo dependería exclusivamente de su tasa de recambio traduccional. Como lo muestran los resultados de la **Figura 33 A**, el tratamiento con DTT logra revertir de manera casi completa (90 - 97%) la oxidación generada por exposición a un exceso de ONOOH (20 X) y H_2O_2 (50 X) durante un total de 92 minutos. Esto indica que rxmRuby2 no es susceptible a sobreoxidación por estos oxidantes y podría ser aplicado en modelos biológicos exigentes.

Finalmente, para determinar los sistemas que podrían reducir a rxmRuby2, la forma oxidada del biosensor (1 μM) fue incubada con un exceso de GSH (250 μM) en presencia de una concentración estequiométrica de hGrx1, con un exceso de tioredoxina (10 X) o de NADPH (250 X) en presencia o ausencia de DTT (5 mM). Como se aprecia en la **Figura 33 B**, solo cuando la dupla GSH/hGrx1 o DTT formaban parte de la muestra se logró un curso temporal de reducción completa del biosensor. De hecho, a pesar que la concentración de tiol de bajo peso molecular libre en la muestra con GSH (250 μM de tiol libre) / hGrx1 era 40 veces inferior a la presente en la que contenía DTT (10 mM de tiol libre), la cinética de reducción del biosensor fue 2 veces superior durante la fase inicial (estado estacionario) y rápida de la reacción.

Este conjunto de datos demuestra que, al igual que para otros biosensores basados en proteínas fluorescentes como la rxYFP (Østergaard, 2004), (Ostergaard, 2001), (Björnberg, 2006) y la roGFP2 (Gutscher, 2008), (Muller, 2017), el sistema Grx/GSSG-GSH cataliza

eficientemente la oxido-reducción de rxmRuby2. Además de la selectividad de rxmRuby2 por GSSG/GSH, se destaca su insensibilidad a la super-oxidación por oxidantes fisiológicos.

El control catalítico ejercido por Grx sobre la oxido-reducción de la rxmRuby2 sugiere que la detección en tiempo real de cambios en la relación GSH/GSSG debería ser llevada a cabo en células o compartimentos intracelulares donde esta oxidoreductasa esté presente.

Otras propiedades que consideramos importante estudiar del biosensor fueron su potencial redox respecto al par redox con el cual este se equilibrará (GSH/GSSG; **Figura 34**) y la sensibilidad al pH de su cromóforo (**Figura 35**).

Para determinar su potencial redox, el biosensor fue incubado con distintas relaciones de GSH/GSSG bajo condiciones de semi anaerobiosis y a pH 7,0, por un tiempo suficiente (4 h) para que se alcancen condiciones de equilibrio. Como se puede observar en la **Figura 34**, bajo estas condiciones no fue posible obtener el biosensor 100% reducido para la mayor relación GSH/GSSG testada, pudiendo explicarse esto por una oxidación espontánea de una pequeña fracción de GSH a pH fisiológico.

No obstante, a partir de los resultados de esta titulación se obtuvo un valor de potencial redox estándar (E°) de -275 ± 22 mV para rxmRuby2 (**Figura 34**), el cual se asemeja al reportado para la proteína rxYFP (-261 mV) (Ostergaard, 2001), y es apenas menos negativo que el determinado para roGFP2 (-272 mV (Hanson, 2004)). Dado que el potencial redox del GSH en el citosol de células eucariotas varía en el rango de -240 mV a -320 mV (Meyer, 2010), (Schwarzländer, 2016), rxmRuby2 resulta apto para detectar variaciones en la relación GSH/GSSG en estas células.

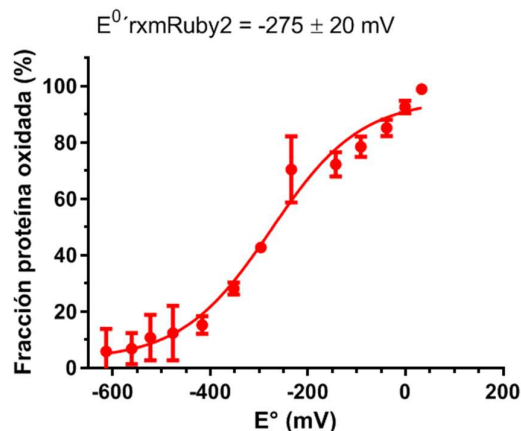


Figura 34. Potencial redox del biosensor rxmRuby2. Titulación de rxmRuby2 (5 μ M) con diferentes relaciones de [GSH]/[GSSG] en PBS pH 7,0 a 25°C. La fracción de proteína oxidada fue calculada como se describe en Materiales y métodos (**sección 3.4.4**). Se muestra el valor del potencial redox estándar experimental.

Para determinar la sensibilidad del cromóforo de la rxmRuby2 al pH y establecer su rango de aplicabilidad, el biosensor (100% reducido u oxidado) fue incubado en soluciones a diferentes pHs y fuerza iónica constante. A partir del análisis de los datos mostrados en la **Figura 35**, se obtuvo un valor de pKa para el cromóforo de 5,8 y 6,95, para la forma reducida y oxidada, respectivamente de rxmRuby2. El pKa de la forma reducida de rxmRuby2 es menos ácido que el reportado para su congénere mRuby (pKa 4,4) o mRuby2 (pKa 5,3), lo cual sugiere que las mutaciones introducidas alteraron el entorno electrostático del cromóforo favoreciendo su desprotonación en el rango de pH fisiológico (7,0 - 7,4). Por otro lado, la formación del puente disulfuro estaría favoreciendo la protonación del cromóforo acompañado de una pérdida en la intensidad de fluorescencia.

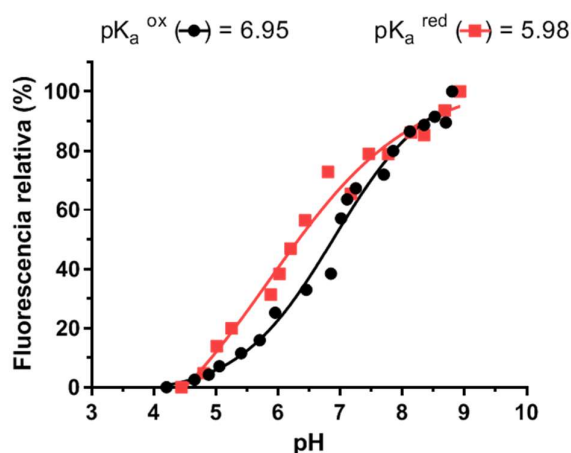


Figura 35. Curva de titulación de pH del biosensor rxmRuby2. Fluorescencia relativa de rxmRuby2 (1 μ M) totalmente reducida (■) y oxidada (●) en función del pH y los correspondientes valores de pKa determinados para el cromóforo (detalles metodológicos y análisis en la **sección 3.4.3**).

De todos modos, y no menos importante, este estudio muestra que independientemente de su estado redox la intensidad de fluorescencia de rxmRuby2 es $\geq 75\%$ en un rango fisiológico de pH (7,0 - 7,4) que prevalece a nivel del citosol de células eucariotas.

4.1.4. Generación de una línea celular de *T. brucei* reportera del estado redox de tioles de bajo peso molecular.

Como lo mostraron los resultados de la caracterización funcional de la forma recombinante de rxmRuby2, la Grx acelera la oxidorreducción del biosensor por la dupla GSH/GSSG. Para no depender de la biodisponibilidad de la Grx endógena y asegurar una proximidad espacial entre el traductor de la señal (Grx) y el módulo sensor (proteína fluorescente redox sensible), y teniendo en cuenta que la concentración intracelular de la isoforma citosólica de la Grx de *T. brucei* es relativamente baja ($\sim 2 \mu\text{M}$; Ceylan, 2010)). Se propuso generar un biosensor con corrimiento al rojo (rxmRuby2) fusionado a la glutarredoxina 1 humana, ya varios estudios validaron la funcionalidad del biosensor roGFP2 fusionado a la hGrx1 (Gutscher, 2008) (Meyer, 2010) (Meyer A. , 2007).

Luego de la nucleofección (sistema Amaxa) de la forma infectiva de *T. b. brucei* (cepa 427, línea celular 449) con el plásmido pHD1700-hGrx-rxmRuby2 y del proceso de selección mediante técnica de dilución límite, se obtuvo un total de 7 clones resistentes al antibiótico de selección (higromicina). Estos clones fueron crecidos en ausencia y en presencia de oxitetraciclina (**Figura 36**) con el fin de inducir la expresión de rxmRuby2 y analizados por microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo. En ninguna de las muestras analizadas por la técnica de microscopía se detectó señal de fluorescencia del biosensor. Por el contrario, el análisis por citometría de flujo reveló que todos los clones crecidos en presencia del inductor expresan la rxmRuby2 (**Figura 36**). Tomando como referencia la señal de fluorescencia basal que presentan tanto los clones no inducidos como parásitos que no fueron transfectados con el vector de expresión, el nivel de intensidad de fluorescencia de la rxmRuby2 en los 7 clones inducidos es alrededor de 10 veces superior.

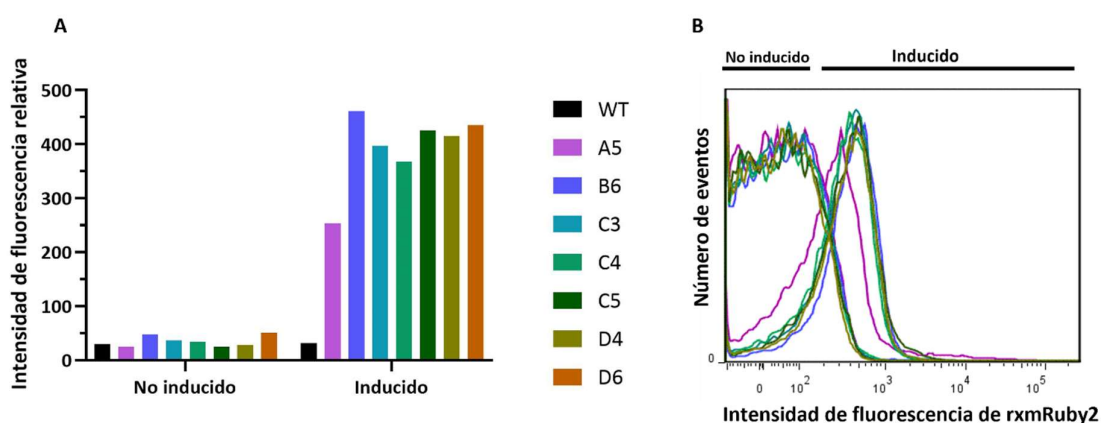


Figura 36. Expresión de hGrx-rxmRuby2 en la forma sanguínea de *T. brucei*. A) Análisis por citometría de flujo (Exc 561 nm, Em 610/20 nm) de 7 clones incubados durante 24 h en ausencia (No inducido) o presencia (Inducido) de oxitetraciclina (1 $\mu\text{g/ml}$). La línea no transfectada (WT) se incluye como control.

B) Gráfica de histograma (número de eventos vs. intensidad de fluorescencia de rxmRuby2) para los 7 clones inducidos y la línea celular no transfectada. Se utiliza la misma referencia de colores para los 7 clones y para la línea no transfectada en el panel A y en el B.

Como se puede apreciar en la **Figura 36 B**, los 7 clones mostraron un nivel de expresión homogéneo de rxmRuby2 con el 90% de la población celular presentando niveles de intensidad de fluorescencia similares. Esto podría explicarse por la característica clonal de estas líneas celulares. En concordancia con esto, una población no clonal de *T. cruzi* mostró niveles sumamente heterogéneos de expresión del biosensor hGrx-roGFP2 empleando un vector integrativo e inducible por tetraciclina (Sardi, 2016). Para esta línea celular reportera se identificaron tres subpoblaciones con niveles de expresión del biosensor nulos, bajos y medios, y altos, las cuales representaban un 20%, 20% y 60% de la población celular, respectivamente.

4.1.5. Caracterización de la línea reportera hGrx-rxmRuby2 de *T. brucei*.

Para 5 de los 7 clones de la línea *T. brucei* hGrx-rxmRuby2 (clon B6, C3, C4, D4 y D6), se evaluó la respuesta del biosensor luego de un tratamiento por 10 minutos con diamida y/o DTT (**Figura 37**). En primer lugar, se observa que en todos estos clones, el biosensor presenta un nivel basal de oxidación que va del 30 al 55%. La incubación con el agente reductor revierte este estado, lográndose obtener en todos los casos máximos de intensidad de fluorescencia, y por lo tanto, de reducción del biosensor. También en todos los clones, la exposición al agente oxidante produce un descenso marcado de la fluorescencia, y por lo tanto del nivel de reducción, del biosensor. Estos resultados indican que en estas cinco líneas reporteras, el biosensor responde de manera eficiente y cuantitativa a los estímulos redox. Llamativamente, el agregado de DTT (5 mM) a muestras que previamente habían sido tratadas con diamida (250 μ M, 0% rxmRuby2 reducida) logró una reversión parcial de la oxidación (8 - 28% rxmRuby2 reducida) o directamente no tuvo efecto (clon C4). Los clones que mostraron mayor nivel de reversión fueron el B6 (22%) y D6 (28%). Dado que durante el tratamiento con DTT la diamida no fue eliminada del medio, esta capacidad parcial de recuperar el estado reducido de rxmRuby2 podría deberse a una competencia entre oxidante y reductor que en el lapso de tiempo de la medición (30 min) aún no llegó a un equilibrio. En condiciones de equilibrio, el exceso (20 veces) de DTT por sobre diamida debería favorecer la reducción completa del biosensor. Los ensayos que se describen a continuación avalan esta hipótesis.

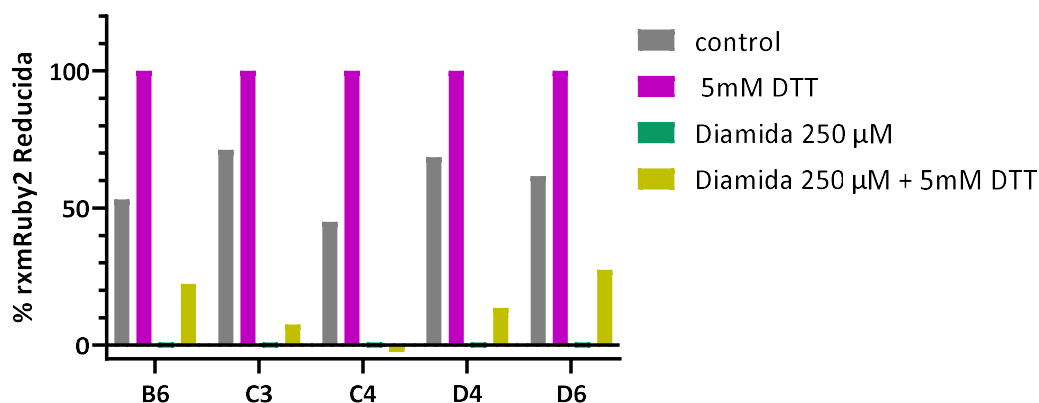


Figura 37. Respuesta a estímulos redox de la línea reportera hGrx-rxmRuby2 de *T. brucei*. Parásitos de diferentes clones, en fase exponencial de crecimiento y pre-inducidos con 1 µg/mL tet durante 24 h fueron expuestos a diamida (250 µM) o DTT (5 mM) durante 20 minutos. La condición “control” refiere a células no tratadas. La condición “diamida 250 µM + DTT 5mM” refiere a muestras que fueron expuestas por 20 minutos a diamida con un posterior agregado de DTT por 10 minutos previo a su análisis. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (FACS Aria Fusion BD) empleando λ Ex/Em 561/ (610/20) nm. Los valores se expresan como unidad porcentual de reducción de rxmRuby2 normalizada a condiciones que producen una reducción máxima (DTT 5 mM) y mínima (diamida 250 µM) del biosensor. Ver ecuación en la **sección 3.5.1**.

Las líneas reporteras B6 y D6 fueron seleccionadas para realizar una caracterización más detallada de la funcionalidad del biosensor. Con ese objetivo, parásitos cultivados en presencia de tetraciclina fueron estimulados con distintos oxidantes (diamida y menadiona) y/o DTT, y los cambios en la fluorescencia del biosensor se monitorearon en el curso del tiempo (total de 70 min) mediante citometría de flujo. Estos agentes oxidantes fueron seleccionados intencionalmente porque difieren en el modo por el cual generan estrés oxidativo: la diamida reacciona directamente con tioles e induce la formación de disulfuros (Kosower, 1969) mientras que menadiona (al ser un cicladoredox) debe ser metabolizada para poder generar especies reactivas del oxígeno ($O_2^{\cdot-}$, el cual luego dismuta a H_2O_2 por acción de superóxido dismutasas) y consumir equivalentes de reducción como NADPH y tioles (Criddle, 2006).

En primer lugar y reproduciendo lo observado en ensayos anteriores (**Figura 37**), en ausencia de estímulo, ambos clones presentan un nivel basal de oxidación del biosensor de alrededor del 40 - 45% que permanece relativamente estable en el lapso de 30 minutos (Control; **Figura 38**). Solo para el clon D6 se observa una ligera tendencia decreciente. El agregado de 2 mM DTT revierte este estado de oxidación con una cinética lenta, ya que se precisan 30 minutos de incubación para aproximarse al 100% de reducción del biosensor (**Figura 38 A**). La respuesta

del biosensor frente a los estímulos oxidativos fue similar en ambos clones, observándose que, a idénticas concentraciones (250 μ M), la diamida causa una oxidación mucho más marcada y sostenida que la inducida por menadiona. Por ejemplo, con diamida, el nivel de reducción de hGrx-rxmRuby2 es mínimo (0%) al cabo de 30 o 20 minutos en el clon B6 y D6, respectivamente (**Figura 38 A y 38 B**). Para este último clon, este estado de oxidación persiste por los siguientes 10 minutos. Además, la oxidación del biosensor durante los primeros 10 minutos es más marcada en el clon D6 (delta de oxidación 51%) que en el clon B6 (delta de oxidación 40%).

A diferencia de diamida, menadiona produjo un máximo de oxidación del biosensor significativamente menor (en torno al 30 y 40%), el cual se alcanza al cabo de 20 o 10 minutos en el clon B6 y D6, respectivamente. En el caso de esta última línea reportera, ese estado de oxidación se mantiene relativamente estable durante los siguientes 20 minutos, mientras que, para la primera línea reportera, éste inicia un proceso de reversión espontánea en los siguientes 10 minutos (**Figura 38**).

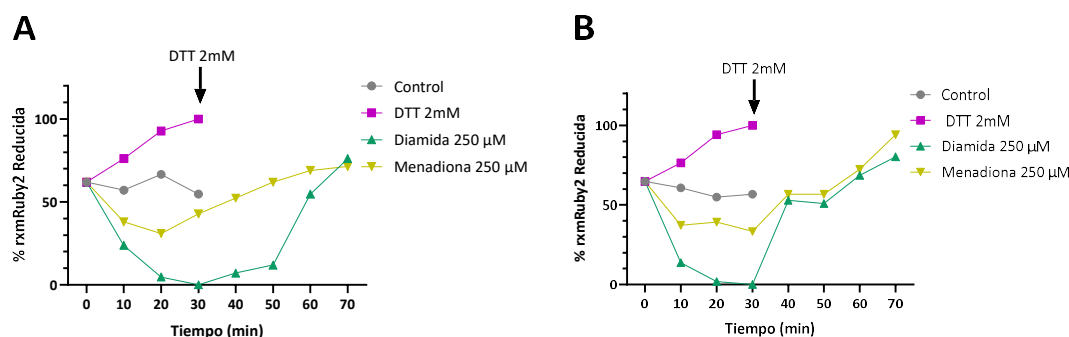


Figura 38. Cinética de respuesta de hGrx-rxmRuby2 en líneas reporteras de *T. b. brucei*. Parásitos del clon B6 (A) y del clon D6 (B) de la forma sanguínea de *T. brucei*-hGrx-rxmRuby2 en fase exponencial de crecimiento y pre-inducidos con 1 μ g/mL tetraciclina durante 24 h fueron expuestos a 2 mM de DTT, a Diamida y a menadiona durante 30 minutos. Las células (1×10^6 eventos/muestra) fueron analizadas por citometría de flujo (FACSaria Fusion BD) empleando λ Ex/Em 561/ (610/20) nm. Los valores se expresan como unidad porcentual de la intensidad de fluorescencia relativa al tratamiento con DTT 2 mM y al tratamiento con diamida para cada caso, de acuerdo a la ecuación de la sección 3.5.1.

Al agregar DTT (2 mM) a las muestras tratadas con estos oxidantes durante 30 minutos, para ambos clones se observa una reducción del biosensor que difiere en magnitud y cinética.

En el clon B6, la cinética de reducción del biosensor se compone de dos o una única fase para las muestras pre-tratadas con diamida y menadiona, respectivamente. Para la primera

condición, entre los 30-50 minutos, se observa una primera fase lenta (0,60% reducción/min) que en los siguientes 20 minutos se acelera notoriamente (1,29% reducción/min). En cambio, la adición de DTT no alteró significativamente la cinética de reducción espontánea que se registró entre los minutos 20 y 30 del ensayo en el cultivo expuesto a menadiona (1% reducción/min). Para ambas condiciones, al finalizar el ensayo (minuto 70) se alcanza un máximo de reducción del biosensor del 71 - 76%, el cual es un 10% superior al nivel basal registrado a tiempo 0 y significativamente inferior al 100% de reducción que se obtiene al tratar esta misma línea reportera solo con DTT durante 30 minutos (**Figura 38 A**).

En la línea reportera D6, a los 10 minutos de agregado el DTT se observa una rápida reducción del biosensor en parásitos tratados con diamida (5,2% reducción/min) y menadiona (2,35% reducción/min) que luego de un estancamiento transitorio en los siguientes 10 minutos recupera una cinética algo más lenta y similar para ambas condiciones (1,08% reducción/min). Al finalizar el ensayo (minuto 70) se alcanza un 80 y 94% de reducción del biosensor en las muestras previamente tratadas con diamida y menadiona, respectivamente, siendo ambos valores significativamente superiores a los registrados al inicio del mismo (65% reducción, **Figura 38 B**).

Al comparar la capacidad de respuesta a estímulos redox del biosensor en ambas líneas reporteras, se nota una mayor sensibilidad a la oxido-reducción por parte del clon D6. Dado que ambas líneas reporteras presentaban niveles de expresión similares del biosensor (**Figura 38**), este comportamiento podría deberse a diferencias en el contenido de algunos componentes del sistema antioxidante del parásito. Independientemente de estas diferencias, la funcionalidad del biosensor para detectar perturbaciones en la relación tiol/disulfuro del contenido de tioles de bajo peso molecular del citosol de la forma infectiva de *T. brucei* quedó demostrada. Por otro lado, los resultados obtenidos con ambos oxidantes, otro dato importante que revelaron estos ensayos, es la capacidad que tuvo el biosensor de discriminar la potencia oxidante de diamida y menadiona, la cual está estrechamente ligada a los distintos mecanismos de acción mediante los cuales perturban la homeostasis del metabolismo redox dependiente de tioles.

4.1.6 Análisis comparativo de respuesta a diamida de líneas reporteras hGrx-roGFP2 y TXN-roGFP2 de *T. brucei*.

Tal como se discutiera anteriormente, la cinética de oxido-reducción diferencial con la cual hGrx-rxmRuby2 respondió en los clones B6 y D6 podría deberse a diferencias en la concentración intracelular de alguno de los componentes claves del sistema antioxidante dependiente de tioles de este organismo. TXN, es una oxidoreductasa que cumple un rol fundamental al catalizar la transferencia de equivalentes de reducción a distintas proteínas blanco a partir del tripanotión (Lüdemann, 1998). Además, la isoforma citosólica de esta proteína respalda la función de la glutarredoxina 1 en mantener el pool de GSH a expensas del poder reductor del tripanotión (Manta, 2019).

Por lo tanto con el fin de explorar la hipótesis anterior y a la vez determinar si el biosensor rxmRuby2 es en parte responsable de dicho comportamiento, realizamos un estudio comparativo de la respuesta a diamida y DTT de líneas reporteras cuyo biosensor redox se compone de la ampliamente caracterizada proteína fluorescente roGFP2 fusionada a la hGrx1 o a la TXN. En *T. brucei*, estos sensores mostraron responder a perturbaciones en la relación tiol:disulfuro preferentemente del glutatión y tripanotión, respectivamente (Ebersoll S. , 2020), (Sardi, 2016). Estas líneas reporteras fueron generadas sobre la misma cepa de la forma infectiva de *T. brucei* en la cual se expresó rxmRuby2, y la selección clonal se llevó a cabo tal como se describe en (Sardi, 2016) y en la **sección 3.6.6**.

Los clones D3 y 2D5 de hGrx1-roGFP2 y TXN-roGFP2, respectivamente, fueron tratados con diamida (250 μ M) y/o DTT (2 mM) y tanto la citotoxicidad como los cambios en intensidad de fluorescencia del biosensor fueron analizados cada 5 minutos mediante Citometría de flujo (**Figura 39**).

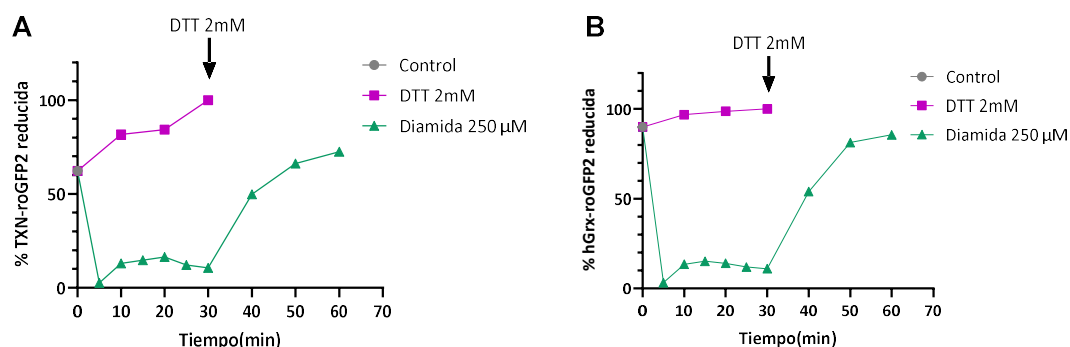


Figura 39. Cinética de respuesta redox de las líneas reporteras TXN-roGFP2 y hGrx-roGFP2 de *T. brucei*. Parásitos de la forma sanguínea de *T. brucei* que expresan el biosensor **A)** TXN-roGFP2 (clon 2D5) y **B)** hGrx-roGFP2 (clon D3) en fase exponencial de crecimiento y pre-inducidos con 1 μ g/mL tet durante 24 horas fueron expuestos a diamida (250 μ M) y/o DTT (2 mM). Se analizaron 1×10^6 eventos/muestra por

citometría de flujo (Accuri C6 BD) empleando λ Ex/Em 488/ (510/20) nm. Los valores se expresan como unidad porcentual del nivel de reducción de los biosensores relativo a las condiciones de tratamiento con DTT y diamida que indujeron máxima y mínima reducción de la roGFP2, respectivamente, en cada línea reportera (sección 3.5.1.)

En primer lugar se nota una diferencia en el estado basal de reducción de los biosensores, siendo éste de 60% para TXN-roGFP2 (**Figura 39A**) y 90% para hGrx1-roGFP2 (**Figura 39B**). El nivel de oxidación basal del primer biosensor es similar al que hemos observado en las líneas reporteras B6 y D6 de hGrx1-rxmRuby2 (**Figura 37 y 38**). DTT logró revertir este estado alcanzándose niveles máximos de reducción de los biosensores a los 30 minutos. No obstante la cinética de ese proceso difiere entre ambas líneas reporteras, siendo 3,7 veces más rápido el biosensor TXN-roGFP2 (1,25% reducción/min) que para el hGrx1-roGFP2 (0,33% reducción/min). Probablemente, esta diferencia es consecuencia de los distintos estados basales de oxidación del biosensor más que a reactividades diferenciales de los mismos, como se discutirá a continuación.

En segundo lugar, al cabo de 5 minutos de exposición a diamida, el nivel de reducción de ambos biosensores alcanza valores mínimos (0%) para luego estabilizarse en valores en torno al 10 - 20% durante los próximos 25 minutos de incubación. La cinética de oxidación de las líneas reporteras TXN-roGFP2 (11,9% oxidación/min) y hGrx1-roGFP2 (17,4% oxidación/min) es 3,3 veces superior a la registrada para hGrx1-rxmRuby2 en los clones B6 y D6 (4,4% oxidación/min). Al agregar DTT a estas muestras, ambos biosensores incrementan su estado de reducción con cinéticas gobernadas por una función hiperbólica que al cabo de 60 minutos tiende a alcanzar un valor *plateau* (73% reducción TXN-roGFP2 y 85% reducción hGrx1-roGFP2) que supera o se aproxima a los niveles basales (tiempo 0). Las velocidades de reducción fueron de 2,06 % reducción/min para TXN-roGFP2 y de 2,49 % reducción/min hGrx1-roGFP2, lo cual las hace 2 veces más rápidas que las registradas para hGrx1-rxmRuby2 en los clones B6 y D6.

La respuesta similar de las líneas reporteras que expresan el biosensor roGFP2 fusionado a las oxidorreductasas hGrx1 o TXN sugiere que no existirían componentes endógenos que estuvieran limitando la reactividad de los mismos a los estímulos redox. Por lo tanto, la menor capacidad de respuesta de hGrx1-rxmRuby2 probablemente se explique por una cinética más lenta de intercambio tiol-disulfuro entre los módulos que componen dicho biosensor, respecto de aquellos basados en roGFP2. Si bien los ensayos con proteína recombinante muestran claramente que hGrx1 acelera la oxido-reducción de rxmRuby2 mediada por GSH/GSSG (**Figura 32**), debe recordarse que los mismos fueron realizados con proteínas libres, es decir no

fusionadas. Por lo tanto para verificar que en la configuración de biosensor elegida, donde la hGrx1 se ubica N-terminal a la rxmRuby2, la cual emula a la de los biosensores de fusión a roGFP2, la interacción entre la oxidorreductasa y la rxmRuby2 no se ve limitada o desfavorecida, trabajos futuros deberían abordar la caracterización de una nueva fusión invertida de sus módulos (ej. rxmRuby2-hGrx1) así como la generación de una línea celular reportera que solo exprese rxmRuby2 y/o rxmRuby2-hGrx1 para el estudio de su funcionalidad en un contexto fisiológico.

4.1.7. Desempeño *in vivo* de la línea reportera *T. brucei* hGrx-rxmRuby2

Con el fin de explorar el desempeño del nuevo biosensor bajo condiciones *in vivo*, ratones de la cepa BalbC/J (n=2) fueron infectados con parásitos de la línea redox reportera hGrx-rxmRuby2 (clon D6) y el progreso de la infección fue monitoreado ex vivo (análisis de muestras de sangre por citometría de flujo; **Figura 40**) e *in vivo* (imagenología de cuerpo completo; **Figura 41**).

T. b. brucei es un patógeno extracelular que reside principalmente en la sangre y otros fluidos del huésped mamífero. La variante monomórfica de la cepa sobre la cual se generó la línea reportera produce una infección aguda en ratones, la cual se caracteriza por alcanzar altos niveles de parasitemia y desencadenar la muerte de los animales en un corto tiempo (2 semanas aproximadamente) debido a sepsis y colapso funcional (MacGregor, 2013). En este modelo de infección, no se observa colonización del sistema nervioso central (Benítez, 2024) como sucede en la etapa crónica de la enfermedad (McLatchie, 2013).

Si bien no se realizó seguimiento de la parasitemia durante la infección, hubiera sido de esperar que la parasitemia mostrara el típico perfil reportado en estudios anteriores con esta cepa (Manta, 2013); (Hiller, 2014); (Musunda, 2015), destacándose valores elevados al día 4 para luego caer a valores mínimos al día 8 y finalmente ascender significativamente en los días posteriores. Con respecto al estado redox del biosensor en muestras de parásitos aislados de sangre (**Figura 40 B**), en ambos animales se nota una marcada oxidación de hGrx1-rxmRuby2 que alcanza niveles de reducción del 20 – 30 % al día 4 post-infección. La tendencia a una mayor oxidación del biosensor persiste durante los próximos días alcanzando un máximo al día 11 post-infección (3 - 10 % reducción). La significativa oxidación del biosensor en parásitos que infectan ratones, la cual en magnitud sería equiparable a la observada en exposiciones cortas a 250 μ M diamida (**Figura 38**), podría tener diferentes orígenes: (1) un fenómeno redox originado por la respuesta oxidativa montada por el sistema inmune del animal, o (2) niveles

sub-óptimos de expresión del biosensor por baja concentración efectiva (o biodisponibilidad) de oxitetraciclina a nivel *in vivo* o por pérdida o silenciamiento del gen de la hGrx-rxmRuby2 ya que no es posible mantener la presión selectiva que retenga su integración genómica en el curso de la infección (ej. por administración de higromicina a los animales). Esta última opción quedó descartada por los siguientes motivos: 1) cada día las muestras de sangre eran fraccionadas y tratadas con DTT (y diamida) con el fin de normalizar los valores de intensidad de fluorescencia; observándose siempre una recuperación de la IF o reducción del biosensor, y 2) la recuperación total (animal 2, 95 % reducción) o parcial (animal 1, 30 % reducción) de la intensidad de fluorescencia que tiene lugar el día 13 post-infección, coincidente con la recaída y la exacerbación de la infección, demuestra que la capacidad de expresión del biosensor está prácticamente intacta en los parásitos.

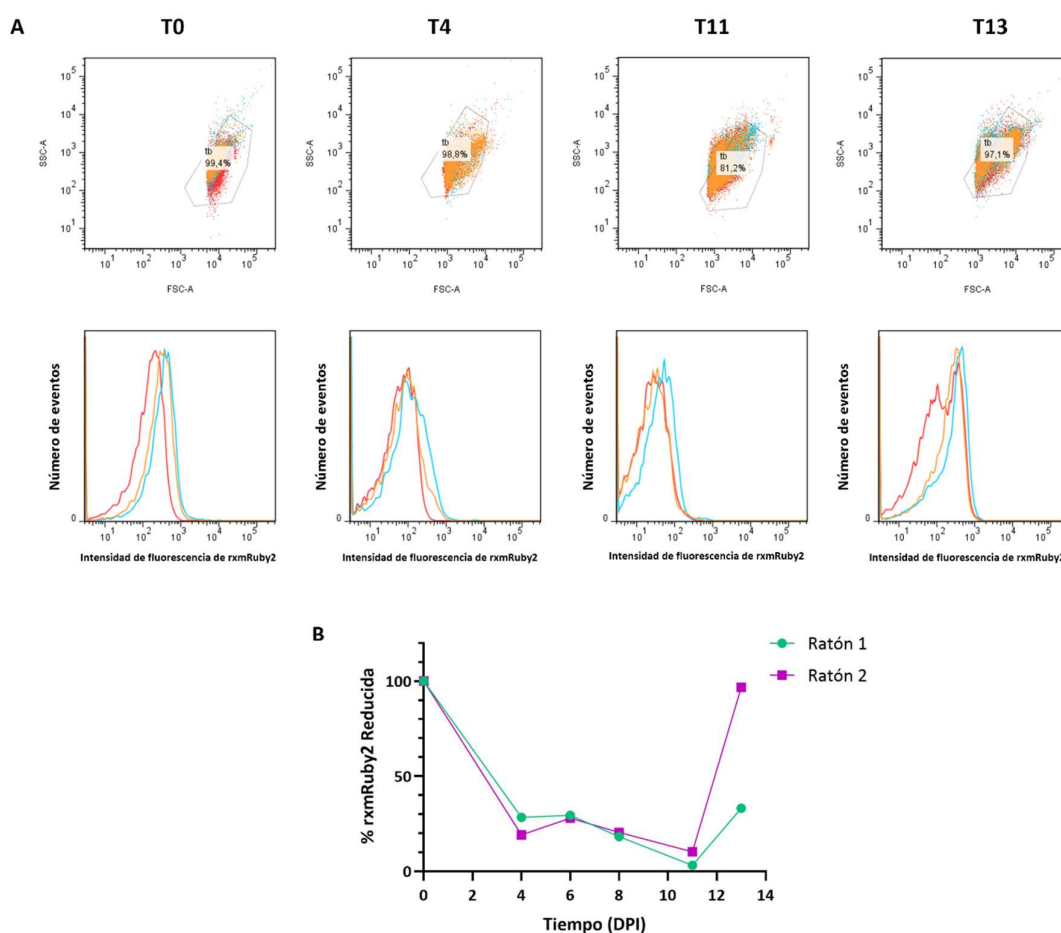


Figura 40. Monitoreo de estado redox de *T. brucei* hGrx-rxmRuby2 durante la infección animal. Para inducir la expresión del biosensor antes y durante la infección, se administró oxitetraciclina al cultivo de *T. brucei* hGrx-rxmRuby2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y a los animales infectados (1 mg/mL en agua de bebida). A diferentes días post-infección (DPI) se extrajeron muestras de sangre en las cuales se analizó el estado

redox del biosensor por citometría de flujo. A) *Dot plots* (FSC vs SSC) y gráficas de histograma (IF rxmRuby2 vs eventos) de parásitos aislados al día 0, 4, 11 y 13 post-infección (T0, T4, T11 y T13, respectivamente) a modo representativo. B) Gráfica del estado redox del biosensor hGrx1-rxmRuby2. Los glóbulos rojos de las muestras de sangre fueron lisados previos al análisis por citometría y lavado con PBS. Para normalizar los valores de intensidad de fluorescencia de cada muestra (T0, T4, T11 y T13; línea naranja), una fracción de las mismas fue tratada con DTT (IF_{max}, línea celeste) y diamida (IF_{min}, línea roja). Se grafica el % de reducción de rxmRuby2 respecto al valor obtenido a tiempo 0.

Además, vale la pena resaltar que resultados casi idénticos a los descritos arriba para la línea reportera hGrx1-rxmRuby2 fueron obtenidos en ensayos de infección realizados con parásitos de la línea reportera hGrx1-roGFP2 (Sardi, 2016). Por lo tanto, podemos inferir que, en este contexto biológico, el patógeno estaría sometido a estrés oxidativo lo cual desencadena la disminución de la fluorescencia u oxidación de hGrx1-rxmRuby2 (y de hGrx1-roGFP2).

Con respecto a los eventos moleculares y biológicos que ocurren en el huésped durante la infección por *T. brucei*, la fase aguda de la misma se caracteriza por una marcada activación de linfocitos T-independientes y T-dependientes de células B como respuesta a las altamente antigénicas glicoproteínas de superficie (Variable Surface Glycoprotein) que envuelven la membrana plasmática del parásito (Stockdale, 2008). Los linfocitos T activados liberan IFN- γ , una citoquina que activa a los macrófagos circulantes o residentes en diferentes tejidos a producir una gran cantidad y variedad de factores tripanocidas como son las especies reactivas del nitrógeno y el oxígeno, y citoquinas como el TNF- α . Todas estas moléculas son citotóxicas y contribuyen al control de la infección mediante la eliminación de parásitos. Los macrófagos son la primera línea de defensa junto con las células dendríticas, donde la activación mediada por receptor representa uno de los primeros eventos de la respuesta inmune innata, provocando liberación de citoquinas pro-inflamatorias que inicia la respuesta inflamatoria (Mansfield, 2005). Diversos estudios del modelo de infección murino por tripanosoma africano han reportado que el pico de la respuesta inmune innata ocurre aproximadamente al día 7 post-infección (Namangala, 2011), (Nishimura, 2011), (Salmon, 2012) y se sostiene por al menos una semana, lo cual temporalmente coincide con el máximo nivel de oxidación observado para hGrx1-rxmRuby2 (**Figura 40 B**).

La reversión espontánea en el estado de oxidación del biosensor que se observa sobre el final del experimento (interrumpido por razones éticas, día 13), podría deberse a una mayor activación de células monocíticas con perfil de expresión de citoquinas tipo-II que predomina por sobre el perfil de expresión de citoquinas tipo-I (Namangala, 2011). Las citoquinas de tipo

II (IL-4,IL-10, IL-13) inducen un perfil de respuesta anti-inflamatorio, que a la vez activa a la arginina sintasa. Esta enzima contrarresta la síntesis de óxido nítrico ya que compite con la Óxido Nítrico sintasa por el sustrato, L-arginina (Namangala, 2011). Una menor disponibilidad de óxido nítrico desfavorecería la formación de de peroxinitrito, el cual es un potente oxidante. Estas condiciones más favorables podrían estar contribuyendo a recomponer la homeostasis redox intracelular de los tioles de bajo peso molecular y explicarían la recuperación del estado reducido de la hGrx-rxmRuby2.

Como se mencionara anteriormente, uno de los motivos por el cual decidimos generar un biosensor redox con corrimiento espectral hacia el rojo fue con la finalidad de poder emplearlo en estudios de imagenología *in vivo*. De ser funcional, esto posibilitaría el monitoreo en tiempo real y no invasivo del estado redox de los tioles de bajo peso molecular en los parásitos en los diferentes sitios donde la infección va teniendo lugar. Para confirmar si esto es posible, a los 4 y 14 días post-infección dos animales (infectado con *T. brucei* hGrx1-rxmRuby2 y no infectado) fueron anestesiados y se les tomaron imágenes de fluorescencia y rayos X. Al día 4 post-infección no fue posible detectar señal de fluorescencia diferencial entre ambos animales (no mostrado), probablemente por los bajos niveles de parasitemia en el animal infectado (1 millón de parásitos/mL). Sin embargo al día 14, cuando la parasitemia alcanza valores de 116 millones de parásitos/mL sangre, se logra observar señal en la zona abdominal inferior del animal infectado luego de 1 minuto de exposición. Esta señal de fluorescencia no solo es superior a la fluorescencia basal detectada en el animal no infectado, sino que abarca una superficie mucho mayor (**Figura 41**). Vale la pena destacar que en estados avanzados de la infección aguda, y empleando parásitos bioluminiscentes, esa zona presenta niveles altos de señal que están asociados a la presencia de parásitos en el intersticio del tejido graso abdominal (Trindade, 2016) (Benítez, 2024). A pesar de estos resultados promisorios, el nivel de señal obtenido es extremadamente bajo, si se lo compara con sistemas reporteros de mayor sensibilidad como la bioluminiscencia, y limitaría el uso de esta herramienta a estadios avanzados de la infección. Este condicionamiento podría superarse con sistemas de expresión del transgen más potentes. Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico, niveles elevados de expresión de proteínas redox activas podría alterar la fisiología intracelular del parásito, conduciendo a una interpretación sesgada de los resultados.

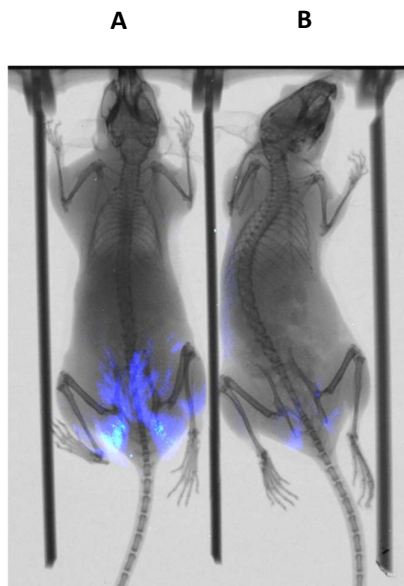


Figura 41. Imagenología *in vivo* de ratones infectados con línea reportera hGrx-rxmRuby2 de *T. brucei*.

Superposición de imágenes de fluorescencia ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ 540 nm/600 nm) y rayos X de animales en posición ventral anestesiados e infectado (A; día 14 post-infección) o no (B) con la forma sanguínea de *T. b. brucei* hGrx1-rxmRuby2. Las imágenes fueron adquiridas en un equipo Bruker In-Vivo Xtreme II System. La inducción de la expresión de hGrx1-rxmRuby2 fue inducida 24 horas previo a la infección (1 μ g/mL oxitetraciclina en el medio de cultivo) y el animal infectado fue alimentado con agua con 1 mg/mL oxitetraciclina durante el curso del experimento.

4.1.8. Conclusiones objetivo específico 1

Los ensayos realizados *in vitro* indican que el potencial redox y la especificidad de sustrato hacen a rxmRuby2 ideal para detectar perturbaciones en la relación GSH/GSSG en compartimentos subcelulares con altas concentraciones de GSH (al menos 3 dígitos μ M) y predominantemente reductor. Como se discutirá más adelante, si bien no ampliamos los ensayos de oxidación a otros disulfuros fisiológicos como el TS₂, resultados indirectos podrían indicar que esta especie también podría estar siendo detectada por rxmRuby2.

La oxidorreductasa Grx acelera el intercambio tiol/disulfuro entre la rxmRuby2 y el par GSH/GSSG, por lo tanto, para realizar determinaciones cinéticas confiables el biosensor debe expresarse en células y/o compartimentos subcelulares que contengan glutarredoxina. Para independizarse de los niveles endógenos de Grx, es factible expresar esta oxidorreductasa fusionada a la proteína rxmRuby2, lo cual proporciona un control cinético de la óxido-reducción del biosensor.

La sensibilidad que tiene la rxmRuby2 al pH (pKa del cromóforo oxidado y reducido es de 7 y 6, respectivamente) limita su uso a organelos con pHs $\geq 7,0$ (ej. citosol, núcleo, matriz mitocondrial), en donde se garantiza un máximo de intensidad de fluorescencia ($\geq 75\%$) del biosensor.

Se generó y se caracterizó con éxito una línea celular transgénica de la forma infectiva de *T. brucei*, la cual posee integrado en su genoma de manera estable el gen de hGrx1-rxmRuby2. La expresión del biosensor en los parásitos *T. b. brucei* fue inferior a la necesaria para poder observar la fluorescencia por microscopía, y si bien esto no impidió la realización de diversos ensayos, estos estuvieron limitados a lecturas por técnica de citometría de flujo. La línea reportera fue capaz de detectar cambios redox intracelulares de manera rápida (min) y reversible, sea esta espontánea o inducida por tratamiento con un agente reductor. En conjunto con ensayos realizados con líneas reporteras basadas en otros biosensores (TXN-roGFP2 y hGrx1-roGFP2), la hGrx1-rxmRuby2 nos permitió explorar de manera preliminar la forma en la que la forma infectiva de *T. brucei* responde a estímulos redox. Pudimos observar diferencias marcadas en la cinética de respuesta a la oxidación-reducción por la fusión de hGrx1 a rxmRuby2 o a roGFP2 y/o de TXN a roGFP2, siendo estos últimos biosensores sensiblemente más rápidos que el primero. Una conclusión interesante que emergió de esos datos experimentales es que en condiciones basales, la relación $TS_2/T(SH)_2$ es mayor a la de GSSG/GSH en la forma sanguínea de *T. brucei*. Un nivel casi idéntico de oxidación basal de hGrx1-rxmRuby2 fue observada en diferentes clones de *T. brucei*, lo cual podría estar sugiriendo que este biosensor se equilibra con el par $TS_2/T(SH)_2$ a expensas de la TXN endógena, la cual está presente a concentraciones intracelulares elevadas en este estadio del parásito ($\geq 50 \mu M$; (Comini M. A., 2007)). No obstante, para confirmar esta especulación debería estudiarse la reactividad de rxmRuby2 con $TS_2/T(SH)_2$ y la respuesta de líneas reporteras que expresen rxmRuby2 no fusionada o fusionada a TXN.

Un resultado de gran relevancia fue el poder demostrar la aplicabilidad de la línea reportera de *T. b. brucei* para llevar a cabo estudios *in vivo* en un modelo de infección murino. Esta subespecie es no patógena para humanos pero teniendo en cuenta que es un muy buen modelo de estudio de la infección aguda provocada por *T. b. rhodesiense* en humanos. El modelo murino de tripanosomiasis africana por *T. b. brucei* se ha utilizado con diferentes objetivos y en diversos proyectos en el laboratorio de biología redox de tripanosomátidos (Manta, 2013), (Hiller, 2014), (Musunda, 2015), (Bonilla, 2016). Logramos detectar la expresión del biosensor bajo condiciones fisiológicas (ex vivo, parásitos aislados de animales infectados)

y comprobamos que la misma no altera la infectividad y virulencia del patógeno. Totalmente compatible con el curso del proceso infeccioso y los mecanismos de defensa montados por el huésped, el biosensor indicó que el patógeno aislado de sangre está sometido a estrés oxidativo. Estos resultados son de gran relevancia dado que posibilitan la realización de estudios de monitoreo de cambios redox intracelulares tendientes a entender el proceso de interacción huésped-patógeno así como la evaluación de compuestos y terapias en modelos de infección complejos.

Debido a que el cromóforo de la rxmRuby2 carece de un espectro ratiométrico, determinaciones cuantitativas requieren de una calibración *in situ* del máximo y mínimo de intensidad de fluorescencia del biosensor en el medio fisiológico y al ser tratado con un reductor de disulfuros y un oxidante de tioles, respectivamente. El DTT y la diamida, respectivamente, pueden ser utilizados para calibrar *in situ* el biosensor así como para verificar que los cambios en la intensidad de fluorescencia reportados por la rxmRuby2 son de base redox. Tanto para los ensayos en líneas celulares de mamífero (Piattoni & Sardi, 2019), como los obtenidos en esta tesis con *T. brucei* y los ensayos *in vivo* en ratones, fue necesario calibrar el biosensor con el fin de obtener un valor intensidad de fluorescencia asignable a una cierta respuesta. Esto a su vez permite convertir los niveles de intensidad de fluorescencia en % de reducción (u oxidación) del biosensor. De alguna forma, esto representa una limitación de la aplicabilidad de rxmRuby2 en ensayos de tejido profundo o imagenología *in vivo*, ya que la calibración se volvería inviable. Se exploró la posibilidad de generar un biosensor rxmRuby2 ratiométrico, basado en las modificaciones realizadas sobre la proteína fluorescente verde Clover (roClover1; (Campbell, 2018)). Estos resultados preliminares (no mostrados) dejaron en evidencia que la estrategia de diseño no es directamente transferible, al menos para rxmRuby2. La fluorescencia con corrimiento al rojo de rxmRuby2, es compatible con el uso simultáneo de otros fluoróforos o proteínas fluorescentes que no tengan solapamiento espectral. Si bien esa posibilidad no fue explorada en esta tesis sobre el modelo tripanosomático, la factibilidad de esta aplicación fue demostrada en (Piattoni & Sardi, 2019) al co-expresar el biosensor redox rxYFP o al agregar una sonda fluorescente química (RealThiol (RT) (Jiang X. , 2017)) a células que expresan rxmRuby2.

En resumen, los estudios realizados en este objetivo específico permitieron el desarrollo del biosensor redox hGrx-rxmRuby2 con corrimiento al rojo que es capaz de medir cambios redox intracelulares en tripanosomátidos. Por otro lado, se generó una herramienta de trabajo (líneas reportera redox) con gran potencial de aplicación tanto en estudios de investigación

básica de la biología de tripanosomátidos, incluyendo la interacción con el hospedero a nivel celular y de organismo, así como al descubrimiento y caracterización de fármacos contra especies patogénicas. Por lo pronto, y en el modelo *T. brucei* vemos inviable su aplicación en imagenología de tejido profundo.

4.2 Objetivo específico 2: Biosensor dual redox y de GMPc, CFP-GMPc-rxYFP (rxCUTie2)

4.2.1 Diseño molecular y generación del biosensor CUTie2

Recientemente se reportó el desarrollo y validación de funcionalidad biológica del biosensor FRET de AMPc, denominado CUTie, empleando modelado computacional (Surdo, 2017). Aplicando una estrategia de diseño similar, aquí procedimos a diseñar y caracterizar un nuevo biosensor con alta especificidad y sensibilidad por el segundo mensajero GMPc.

Como dominio de reconocimiento de cGMP sobre el cual construir el nuevo sensor de cGMP seleccionamos al dominio β de la proteína quinasa G humana (PKG), isoforma I, (secuencia 1 de la **Figura 42 A**; (Butt, 1993), (Hofmann, 2009), (Huang, 2014) por presentar buena afinidad y selectividad por cGMP y poseer la misma arquitectura y organización del CNBD del biosensor CUTie (Vaandrager, 2005) (Campbell J. C., 2016). Al igual que sus homólogos, el CNBD de la PKG-I se compone de un barril de 8 hojas β , rodeado por dos alfa hélices (la hélice A y la hélice B) y una hélice C-terminal (hélice C) que sufre cambios conformacionales que impiden (cuando une al ligando) o facilitan (en ausencia de ligando) la exposición del sitio activo al solvente (Berman, 2004); **Figura 42 B**). Esta hélice actúa como una tapa que cuando la PKG-I pasa del estado *apo* al *holo* (unión de cGMP) se cierra sobre el sitio activo del CNBD, impidiendo que el cGMP escape al solvente. En la forma apo de la enzima, la hélice C es altamente móvil lo cual explica porque su estructura no ha podido ser resuelta por cristalografía de rayos X en ausencia de ligando. Este tipo de comportamiento alostérico fue explotado en CUTie para facilitar la aproximación de los módulos fluorescentes mediada por unión a ligando.

Con el fin de identificar los sitios de CNBD de PKG-I más adecuados para incorporar las proteínas fluorescentes del par FRET CFP/YFP, se realizó un alineamiento múltiple de diferentes secuencias de proteínas con dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBDs) de diferentes organismos (mamíferos, insectos, arácnidos, crustáceos, anélidos, entre otros) (**Figura 42 A**). Las secuencias fueron tomadas de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org>) y alineadas utilizando ClustalW con las herramientas bioinformáticas MPI Bioinformatics Toolkit (Bioinformatics Toolkit, 2020). Al igual que lo reportado por (Surdo, 2017), encontramos que el loop que conecta las hojas β 4-5 (denominado loop 4-5) del CNBD sería un sitio apto para la inserción de una de las proteínas fluorescentes (YFP) ya que es muy poco conservado entre diferentes especies y suele contener

inserciones (**Figura 42 A**). Más precisamente, planteamos sustituir los aminoácidos Asp286-Ser-Pro-Ser-Glu 282 del loop 4-5 por la secuencia de la YFP flanqueada por las mismas secuencias espaciadoras empleadas en CUTie. Al no ser estructuradas, estas secuencias permiten que no haya interferencia mutua en el correcto plegamiento de la YFP y las regiones vecinas al loop 4-5. Con respecto al sitio de inserción de la segunda proteína fluorescente (CFP), también de manera similar a la aproximación utilizada por (Surdo, 2017) optamos por insertar la secuencia de la CFP a continuación de la hélice C-terminal del CNBD, de manera tal que este elemento estructural dirija el desplazamiento de la proteína fluorescente hacia las hojas β 4-5, es decir donde se encuentra inserta la YFP, cuando tenga lugar la unión de cGMP al sitio activo del CNBD.

Una representación esquemática del sensor CUTie2 y su secuencia primaria se pueden observar en la **Figura 42 B y 42 C**, respectivamente.

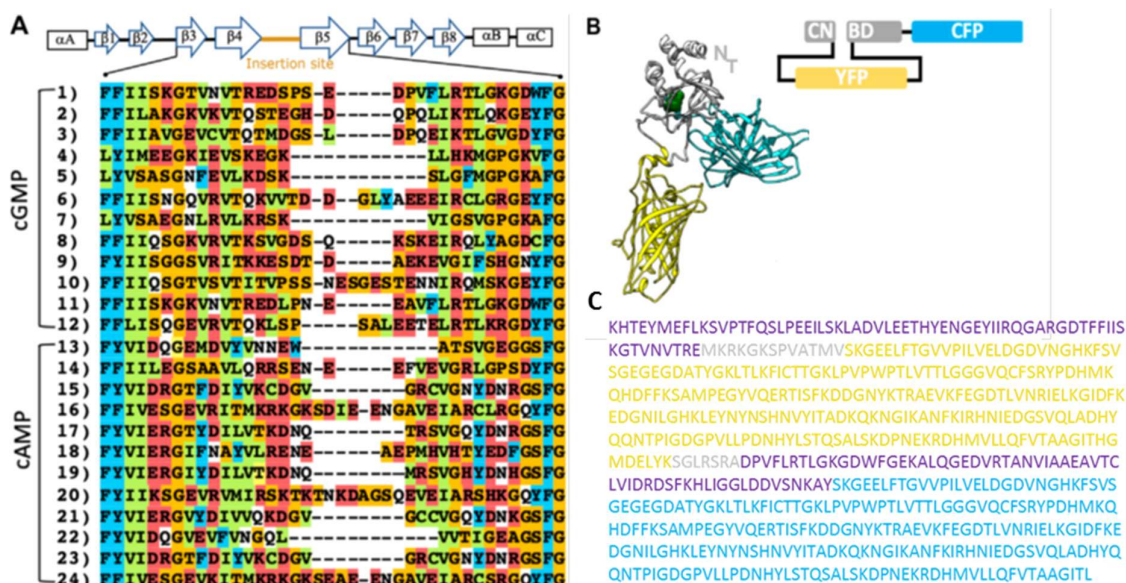


Figura 42. Diseño del sensor CUTie2. (A) Estructura secundaria general de un CNBD y alineamiento de secuencias múltiples de dominios relacionados. Los rectángulos y flechas indican α -hélices y cadenas- β . Las secuencias del 1 al 12, y las del 13 al 24 corresponden a dominios de unión para GMPc y AMPc, respectivamente. Los códigos de UNIPROT para los dominios de unión a GMPc son: 1) Q13976, 2) Q13237, 3) A0A444U9Q8, 4) A0A443SJC3, 5) B0X970, 6) A0A4Y2N1F1, 7) A0A4Y2BIM3, 8) A0A419PY19, 9) A0A2P8Y1R0, 10) A0A3R7JPE0, 11) A0A444UAH2, 12) A0A0M4ENX8 y para los dominios de unión a AMPc son: 13 y 14) P00514, 15 y 16) P12369, 17) A0A2J8TG41, 18) E0VRT6, 19 y 20) A0A091CJC2, 21) A0A556UFG6, 22) A9QQ52, 23 y 24) A0A384A0R8. Los aminoácidos están coloreados de acuerdo a sus características fisicoquímicas según CLUSTAL. (B) Esquema y estructura tridimensional representativas del sensor CUTie2 generado en esta tesis. El N-terminal de la proteína admite su fusión a otros dominios

o péptidos de señalización. (C) Secuencia aminoacídica de CUTie2. Cada dominio del sensor se encuentra identificado con diferente color: CNBD (violeta), linkers (gris), YFP (Amarillo) y CFP (celeste). Tomado y modificado de (Klein, 2021).

4.2.2 Expresión y purificación del sensor CUTie2

La forma recombinante del sensor CUTie2 con etiqueta N-terminal de seis residuos de histidina fue producida en bacterias *E. coli* BL21 y purificada tal como se describió en el punto 3.3.2. La expresión del biosensor fue detectada mediante microscopia de epifluorescencia en muestras de cultivo de bacteria inducidos con IPTG (**Figura 43 A**). Este análisis preliminar también permitió confirmar la funcionalidad de ambos módulos fluorescentes dado que se pudo observar fluorescencia a λ_{em} 460-500 nm (CFP) y λ_{em} 510-550 nm (YFP) luego de excitar con filtros de λ_{ex} 426-446 nm y λ_{ex} 470-495 nm, respectivamente. El análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes de la fracción soluble del lisado de bacterias inducidas muestra la presencia de una banda prominente cercana a los 70 kDa (**Figura 43 B**) que es compatible con el peso molecular estimado para el sensor CUTie2 recombinante (72 kDa). Durante el proceso de purificación por IMAC, esta misma banda se encuentra en una proporción minoritaria en muestras de fracción no unida (FNU), lo cual indica una retención eficiente de la proteína etiquetada a la resina de níquel. En la primera fracción del lavado con imidazol 10 mM (L1) se puede apreciar la remoción de proteínas contaminantes que se unieron de manera inespecífica y con menor afinidad a la columna HisTrap. La elución completa de la proteína recombinante se logra a concentraciones de imidazol mayores a 250 mM, fracciones E2 – E4. Del análisis de las fracciones (**Figura 43 B**), se observa que la mayor parte de la proteína eluyó principalmente en las fracciones E2A - E2B y E3 - E4. En todas estas fracciones, el nivel de pureza del biosensor es bajo, por lo que se procedió a un segundo paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular (SEC). Para ello, estas fracciones fueron concentradas e inyectadas a una columna Superdex200 previamente equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7,4 con 150 mM NaCl. Tal cual lo refleja el resultado de la electroforesis en gel (**Figura 43 C**), el monitoreo de absorción de luz a 510 nm durante la cromatografía de SEC confirmó que la fracción F4 (**Figura 43 D**) contiene mayoritariamente al biosensor recombinante con una pureza cercana al 90%. Además de incrementar su nivel de pureza, este paso cromatográfico permitió determinar que CUTie2 eluye con un volumen de retención compatible con el de la especie monomérica (masa molecular aparente vs teórica, 74,2 kDa vs 72 kDa, respectivamente; **Figura 43 D**). Esta ligera diferencia en masa molecular se explicaría

por un mayor radio hidrodinámico del biosensor en solución, el cual posiblemente no adopte una conformación estrictamente globular (como la ilustrada en la **Figura 42 B**). Finalmente, el análisis del espectro de fluorescencia de la fracción F6 confirmó la presencia de picos de emisión a 475 nm y 527 nm, y por lo tanto la correcta maduración y funcionalidad de los grupos cromóforos de cada proteína fluorescente del biosensor (**Figura 43 E**).

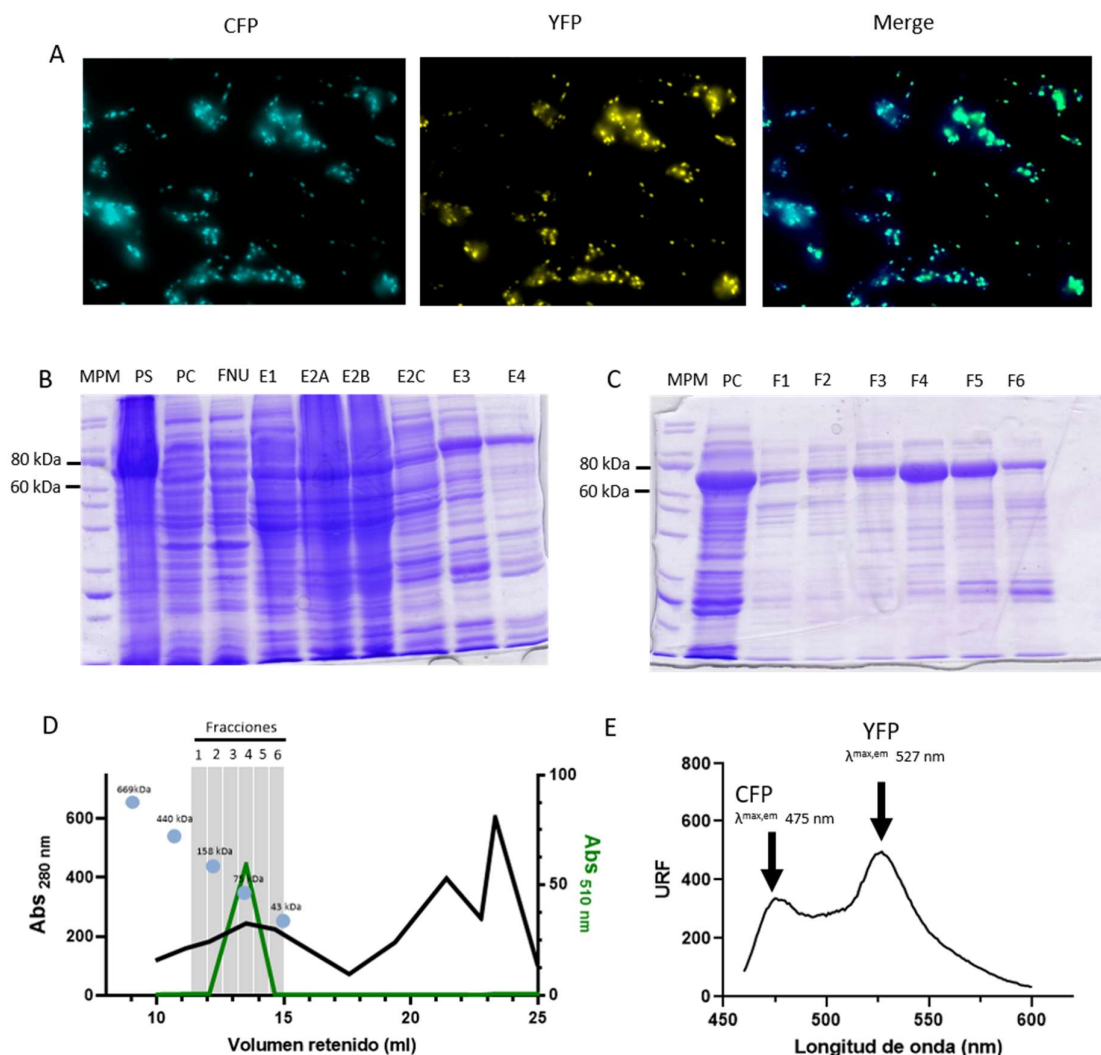


Figura 43. Expresión y purificación del biosensor CUTie2. (A) Imagen tomada en el microscopio de epifluorescencia de bacterias *E. coli* BL21 inducidas 18 horas con IPTG 500 μ M, utilizando el objetivo 100x de inmersión en aceite y los filtros ECFP y FITC para visualizar la fluorescencia de la proteína CFP e YFP, respectivamente. (B) SDS-PAGE 10 % de muestras de las diferentes etapas de la IMAC. MPM: marcador de peso molecular (Benchmark Protein Ladder); PS: lisado celular; PC: pre-columna; FNU: fracción no unida; E1: eluido 1 (50 mM imidazol); E2A-E2C: eluido 2, fracción A-C (100 mM imidazol); E3: eluido 3 (250 mM imidazol) y E4: eluido 4 (400 mM imidazol). (C) SDS-PAGE 12 % de fracciones de la SEC. MPM: marcador de peso molecular; PC: muestra de CUTie2 purificada por IMAC y concentrada

(E2A - E2B - E3 - E4); F1 - F6: fracciones de SEC correspondiente a los volúmenes de retención, 12, 12,5, 13, 13,5, 14 y 14,5 ml, respectivamente. (D). Cromatograma de exclusión de molecular. El registro de absorbancia a 280 nm y 510 nm se representa con trazos negro y verde, respectivamente. (E) Espectro de emisión de la forma recombinante CUTie2 purificada por IMAC y SEC. Condiciones de adquisición: fotomultiplicador 700 volts, ancho de banda de 5 nm para cada monocromador y λ_{exc} 456 nm.

Muestras de CUTie2 recombinante con estas características fueron empleadas en los ensayos que se presentan en la próxima sección.

4.2.3 Caracterización *in vitro* del biosensor CUTie2.

El análisis del espectro de emisión de la forma recombinante de CUTie2 adquirido a pH fisiológico (pH 7,0) fue esencialmente idéntico al reportado para el par FRET CFP-YFP (Lam, 2012) (**Figura 43 E**), mostrando máximos de emisión a 475 nm y 527 nm, correspondientes a la proteína CFP y YFP, respectivamente.

Con el fin de confirmar la funcionalidad y especificidad del biosensor, se realizaron tres ensayos independientes con la proteína recombinante y diferentes concentraciones de GMPc y AMPc (**Figura 44**).

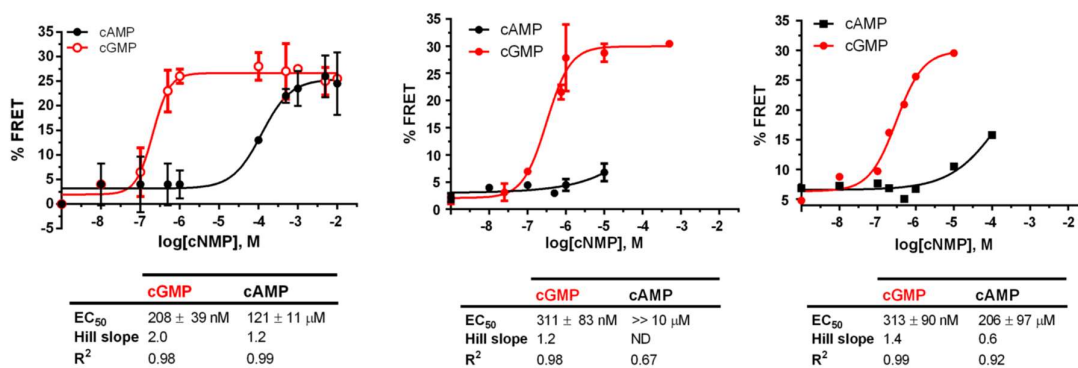


Figura 44. Curvas de titulación del biosensor CUTie2 con GMPc y AMPc. Gráficas dosis respuesta obtenidas para tres ensayos independientes. Las tablas debajo de los gráficos muestran los valores para los diferentes parámetros evaluados. ND: no determinado. Los datos fueron ajustados utilizando la ecuación de Boltzmann.

Se determinó que la concentración de GMPc a la que CUTie2 tiene una respuesta de FRET equivalente al 50 % (concentración efectiva 50 o EC₅₀) es de 277 ± 60 nM, la cual coincide con el valor reportado para este módulo CNBD utilizando polarización de fluorescencia (Huang,

2014). El coeficiente de Hill (o la pendiente de las curvas) arrojó un valor promedio de $1,5 \pm 0,4$, el cual se encuentra dentro del rango de valores reportados para PKG I (Huang, 2014) y para un sensor FRET de características similares (Honda 2001). Como era de esperar para la interacción del GMPc con el CNBD, valores mayores a 1 son indicativos de un efecto alostérico positivo por parte del ligando, lo cual confirma que la configuración elegida para insertar los módulos fluorescentes al CNBD no afectó sus propiedades de reconocimiento de ligando ni los cambios conformacionales que este induce en el receptor.

En los ensayos de titulación de CUTie2 con AMPc, el valor de EC_{50} fue de $167 \pm 54 \mu\text{M}$. Esto indica que el biosensor es al menos 600 veces más selectivo por GMPc que por AMPc. Este resultado es de gran relevancia ya que permitiría el uso del biosensor en sistemas biológicos, donde en gran parte de los compartimentos subcelulares la concentración de AMPc supera a la de GMPc de 10 - 100 veces (Turko, 1999); (Stangherlin, 2012).

Estos experimentos mostraron que el máximo de eficiencia FRET obtenido a concentraciones de saturación de GMPc (FRET 26 – 30%, **Figura 44**) es comparable con las predicciones hechas por modelos computacionales (21%, (Klein, 2021), **Figura 45 A**). En estos modelos se generaron dos conjuntos de simulaciones con diferentes conformeros del biosensor en los estados holo (unido a GMPc) y apo (libre de GMPc). Luego de 10 μs de simulación, se concatenaron las trayectorias y se calculó la eficiencia de FRET promedio en la corrida (**Figura 45 A**).

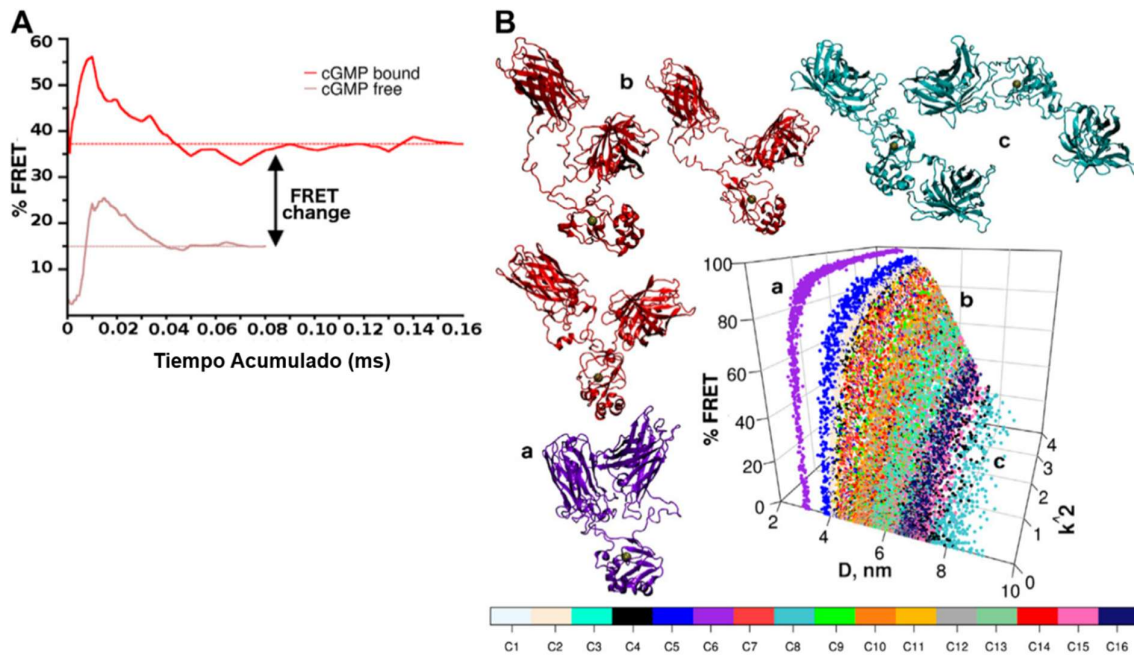


Figura 45. Eficiencia de FRET del biosensor CUTie2. A. Valores promedio de FRET calculados a partir de diferentes conformeros vs. tiempo de simulación para el conjunto de simulaciones con el complejo biosensor-GMPc o biosensor libre. El cambio de FRET entre ambos estados fue estimado en un 21%. B. Valoración de la totalidad de muestras conformacionales en una simulación del biosensor unido a GMPc. La eficiencia de FRET se expresa en función de D y de k_2 para cada uno de los conformeros (trayectorias representadas con diferentes colores). A modo representativo, se muestran las estructuras de seis conformeros correspondientes a tres trayectorias diferentes. Figura tomada y modificada de Klein 2021.

La capacidad de ambos módulos fluorescentes de producir FRET frente a diferentes concentraciones de GMPc es similar a resultados con la proteína intacta (solo por FRET; (Kremers G.-J. , 2006), (Rizzo, 2006). Esto indica que ambas proteínas fluorescentes adoptan el plegamiento correcto en esta configuración del biosensor y, como se mencionara anteriormente, no afectan la estructura y funcionalidad del CNBD, confirmando de esta forma las predicciones teóricas. En ese sentido, debe destacarse el rol de las secuencias espaciadoras que flanquean a la YFP del CNBD, las cuales, al igual que en el biosensor CUTie original, probaron ser las adecuadas para evitar interacciones o efectos indeseados entre esos módulos del biosensor.

El haber confirmado que esta estrategia de generación de biosensores de nucleótidos cíclicos es reproducible para distintas secuencias de CNBDs, siempre y cuando estas conserven la forma de interacción con ligando y la misma mecánica de cambios conformacionales inducidos por esta interacción, abre la posibilidad de generar un portfolio de biosensores con afinidades

por diferentes ligandos basados en CNBDs caracterizados bioquímicamente u otros dominios específicos de ligando que sufren cambios conformacionales similares (Klein, 2022).

4.2.4 Diseño del biosensor dual (redox y cGMP) rxCUTie2

Con el fin de desarrollar un sensor que fuera capaz de detectar en simultáneo cambios en la relación GSH/GSSG y en los niveles de cGMP, se procedió a la estrategia molecular de sustituir el módulo YFP de CUTie2 por una versión redox sensible de la proteína YFP (rxYFP, (Ostergaard, 2001), manteniendo la arquitectura y organización del biosensor CUTie2 (descrito en las secciones anteriores y en (Klein F. , 2021); **Figura 42**).

Por medio del alineamiento de secuencias primarias entre CUTie2 y la rxYFP (Ostergaard, 2001) se identificaron cuatro residuos aminoacídicos que deberían ser mutados para generar la proteína YFP redox sensible (Asn225Cys y Ser278Cys) y evitar la posible formación de disulfuros inespecíficos intra- o inter-moleculares entre la rxYFP (Cys128Ser) y la CFP (Cys428Ser). Vale la pena destacar que estas precauciones se tomaron para minimizar respuestas sub-óptimas del módulo redox del sensor rxCUTie2 ya que los ensayos de caracterización funcional presentados en las secciones anteriores para el biosensor CUTie2, realizados bajo condiciones no reductoras, no mostraron alteraciones en la estructura cuaternaria ni en la respuesta del biosensor a los nucleótidos cíclicos.

El modelo estructural del biosensor rxCUTie2 muestra la ubicación de las cisteínas redox sensibles (Cys225 y Cys278) y permite inferir que su oxidación a disulfuro mediada por reacción con GSSG no debería interferir con los cambios alostéricos mediados por el dominio CNBD que aproximarían rxYFP a CFP durante la unión del GMPc (**Figura 46 A-B**). La síntesis de la secuencia de ADN codificante para rxCUTie2 y su clonado en el vector de expresión procariota pET28a fue ordenada a Genscript (ver **sección 4.2.5**).

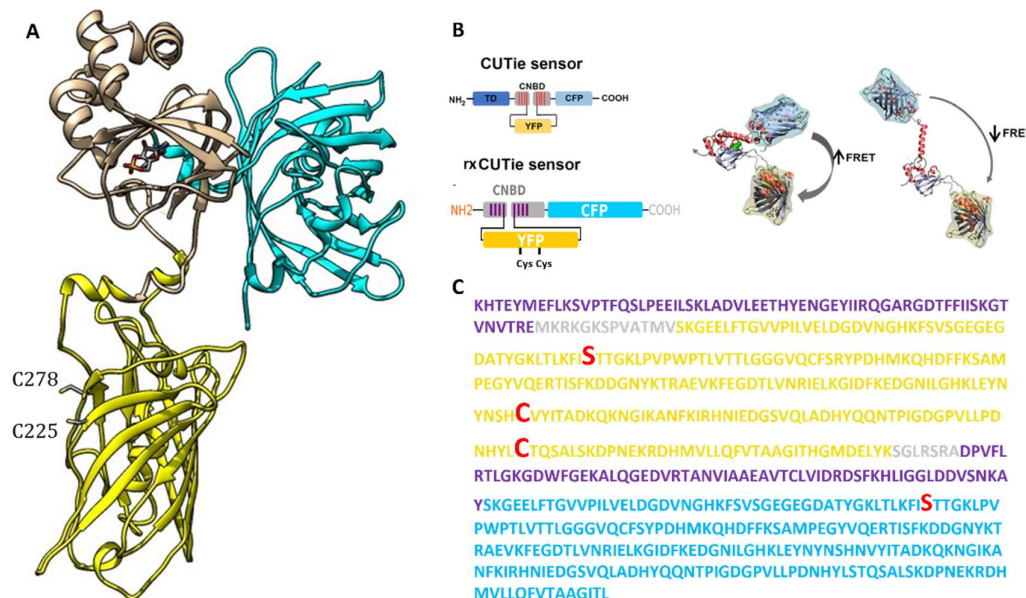


Figura 46. Diseño del biosensor dual rxCUTie2. A. Modelo tridimensional construido *in silico* a partir de la secuencia del CUTie2. La estructura de la rxYFP (Asn225Cys, Ser278Cys y Cys128Ser), CFP (Cys428Ser) y el CNBD se colorean en amarillo, celeste y marrón claro, respectivamente. Con palillos se señalan los residuos de cisteína que tornan a la YFP redox sensible, y al GMPc unido al CNBD. B. Esquema representativo del sensor rxCUTie2 y su funcionamiento frente a la unión del ligando GMPc. C. Secuencia aminoacídica de rxCUTie2. Se usan diferentes colores para identificar las secuencias del CNBD (violeta), espaciadores (gris), rxYFP (amarillo) y CFP (celeste). Los 4 residuos mutados se identifican en letras mayúsculas rojas. Imagen modificada de (Klein F. , 2021).

4.2.5 Expresión y purificación del biosensor rxCUTie2

Con el fin de obtener la forma recombinante de rxCUTie2 con etiqueta N-terminal de seis residuos de histidina, en primer lugar, se probaron las mismas condiciones empleadas para la expresión del sensor CUTie2 (ver **sección 4.2.2**). Sin embargo, esta estrategia no tuvo éxito ya que la cantidad de rxCUTie2 tanto en fracción soluble del extracto celular como en la purificación por IMAC fue prácticamente nula y carecía de los picos de emisión de fluorescencia esperados a para CFP (475 nm) y rxYFP (527 nm).

Una re-secuenciación parcial del constructo generado por la empresa Genscript permitió confirmar que tanto la secuencia N-terminal (aminoácido 1 - 180) como C-terminal

(aminoácido 465 - 636) del biosensor tenían un 100% de identidad de secuencia con la secuencia teórica (**Anexo Figura 53**).

Por lo tanto, decidimos volcar nuestros esfuerzos a explorar diferentes métodos de expresión de la proteína recombinante. Para ello, empleamos las cepas de expresión BL21 DE3, Rosetta DE3 y C41 DE3 de *E. coli*. Elegimos la cepa Rosetta (Novagen) porque esta fue diseñada para potenciar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente utilizados en *E. coli*. Mediante la co-expresión de un plásmido que codifica para secuencias de ARNts para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, este sistema expande el panel de genes a ser expresados en *E. coli* sin que la traducción de codones poco abundantes se convierta en un cuello de botella. Por otro lado, la cepa C41 (Lucigen) fue desarrollada para expresar proteínas tóxicas de diverso origen filogenético (plantas, mamíferos, levadura, virus). La cepa C41 (DE3), que deriva de la cepa BL21 (DE3) estándar, contiene mutaciones genéticas fenotípicamente seleccionadas para proporcionar tolerancia a proteínas tóxicas (Miroux, 2004) (Dumon-Seignovert, 2004). Una de las mutaciones genéticas provoca la reducción de la actividad T7 RNAP, previniendo de esta manera, la muerte celular asociada con la sobreexpresión de proteínas recombinantes tóxicas. Al igual que para la cepa estándar BL21 (DE3), la cepa C41 (DE3) es lisógeno de λ DE3 y contiene una copia cromosomal del gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5* que permite la expresión de la proteína de interés mediante inducción por IPTG.

En los sistemas de expresión inducible, una tasa alta de expresión del transgen puede afectar los niveles de productividad de biomasa total, el rendimiento de cantidad de proteína / célula (teniendo un potencial efecto inhibitorio en el crecimiento celular) y afectar el plegamiento proteico (Rizkia, 2015). Ante la sospecha que este factor podría ser uno de los causantes (por toxicidad intrínseca de rxCUTie2 o por agregación intracelular del biosensor) de la frustrada expresión del biosensor en *E. coli*, es que decidimos evaluar concentraciones más bajas de IPTG durante el proceso de producción de la proteína recombinante.

Otro factor que también nos pareció importante considerar es el método de lisis de la bacteria. Existen diferentes métodos de lisar la membrana celular y la pared bacteriana para extraer las proteínas (**Tabla 3**). La elección del método va a depender del tipo de célula, el volumen de muestra y la sensibilidad de las proteínas que son extraídas (Walker, 2009). En los métodos de disrupción física, las membranas celulares son físicamente rotas por fuerzas externas o de rozamiento para liberar los componentes celulares. A pesar que los métodos mecánicos han sido utilizados por décadas, presentan ciertas desventajas como el calentamiento de la

muestra, que puede provocar agregado o desnaturalización de la proteína de interés. En parte, esto es evitable o minimizado si la muestra y los implementos del equipo se mantienen refrigerados durante el proceso completo. Otra desventaja es la reproducibilidad, ya que la ruptura de las células se da de manera continua, por lo que la viscosidad del medio cambia constantemente.

Los detergentes o agentes caotrópicos que promueven la lisis celular son una alternativa más sencilla a la disrupción física. No obstante, ambos métodos suelen usarse de manera combinada. Los detergentes rompen la barrera lipídica que rodea a la célula al solubilizar las proteínas y romper las interacciones lípido-lípido, proteína-proteína y proteína-lípido. Diferentes tipos y concentraciones de detergentes, buffers, y agentes reductores se han desarrollado para obtener los mejores resultados para distintas especies y tipos celulares.

La homogeneización líquida es la técnica de disrupción más utilizada para pequeños volúmenes de suspensiones celulares. Las células son lisadas al forzar el pasaje de las células a través de un espacio angosto, rompiendo de esa manera las membranas. Tres tipos diferentes de homogeneizadores son comúnmente usados. El homogeneizador de tipo Dounce consiste en un émbolo de vidrio que manualmente es introducido en un tubo de vidrio. El homogeneizador de tejidos tipo Potter-Elvehjem en vidrio de borosilicato tiene superficie cilíndrica para reducir eficazmente la masa de tejido y producir un homogeneizado uniforme. El espacio entre el mango y el tubo es entre 0,1 y 0,15 mm. Es de construcción fuerte y está diseñado para ser impulsado por una unidad motora. La prensa francesa consiste en un pistón que es utilizado para aplicar alta presión a una muestra de un volumen de 40-250 mL, forzando el pasaje de la muestra a través de un pequeño espacio. Solamente dos ciclos son necesarios para una lisis eficiente debido a la alta presión utilizada en el proceso. El equipamiento es costoso, pero la prensa francesa es el método de elección para romper mecánicamente células bacterianas.

Además, las células pueden ser tratadas con varios agentes que favorezcan el proceso de disrupción como puede ser una solución hipotónica o con lisozima (200 µg/ml) que digiere los componentes polisacáridos de la pared de levaduras o bacterias. La viscosidad de la muestra normalmente aumenta durante la lisis debido a la liberación del ácido nucleico, lo cual se neutraliza con el agregado de ADNasa (25 – 50 µg/mL) y ARNasa (50 µg/mL) a las muestras. Finalmente la proteólisis puede ser un problema cuando las células son manipuladas, por lo que el agregado de inhibidores de proteasas es generalmente recomendado.

Método	Equipamiento	Descripción	Uso
--------	--------------	-------------	-----

Mecánica	Waring Blender Polytron	Cuchillas rotantes trituran las células y tejidos	Tejidos complejos (hígado, músculo)
Homogeneización líquida	Homogeneizador Potter-Elvehjem Prensa francesa	Suspensiones de células o tejidos son cortadas al ser forzadas a pasar por un espacio angosto.	Pequeños volúmenes, cultivo celular. Prensa Francesa: células bacterianas
Sonicador	Sonicador	Ondas de ultrasonido rompen las células.	Células bacterianas o levaduras
Congelado/descongelado	Freezer o hielo seco	Ciclos repetidos de congelado/descongelado rompen las células a través de formación de cristales.	Células de mamífero
Trituración manual	Mortero	Trituración de tejido congelado en nitrógeno líquido.	Tejidos resistentes (ej. Plantas)

Tabla 3. Métodos de disrupción física para obtener la lisis celular.

De las formas de lisis presentadas anteriormente, se optó por utilizar la prensa francesa ya que, a diferencia de la lisis por ultrasonido (sonicación), no debería producir un sobrecalentamiento del lisado, favoreciendo el plegamiento proteico y disminuyendo la formación de agregados.

Como se puede observar en la **Figura 47 B**, las tres cepas de *E. coli* mostraron una buena expresión de la proteína recombinante a la menor concentración de IPTG ensayada (0,1 mM). Luego de la lisis mediante prensa francesa y clarificado por centrifugación, se logró identificar en la fracción soluble de los extractos de la cepa C41 (carril 5, **Figura 47 B**) y, aunque en menor medida, la cepa BL21 (carril 3, **Figura 47 B**), una banda de proteína que se corresponde con el peso molecular de la rxCUTie2 (70 kDa). Se confirmó la mejoría en la recuperación de la proteína recombinante en la fracción soluble al utilizar la cepa C41, con 0,1 mM IPTG a 20°C y lisis mediante prensa francesa (carril 4, **Figura 47 C**), en comparación a las mismas condiciones, pero con 0,5 mM IPTG (carril 2, **Figura 47 C**).

Basados en estos resultados, decidimos proceder a escalar la expresión del sensor rxCUTie2 empleando la cepa C41-DE3 inducida con 0,1 mM IPTG a 20°C durante aproximadamente 18 horas con agitación vigorosa (200 rpm), y lisis mediante prensa francesa. El análisis de microscopia de epifluorescencia confirmó expresión funcional de ambos módulos fluorescentes del biosensor (**Figura 48 A**). La electroforesis en gel de poliacrilamida de bajo

condiciones desnaturalizantes y reductoras reveló la una banda prominente cercana a los 70 kDa en la fracción soluble del lisado de bacterias.

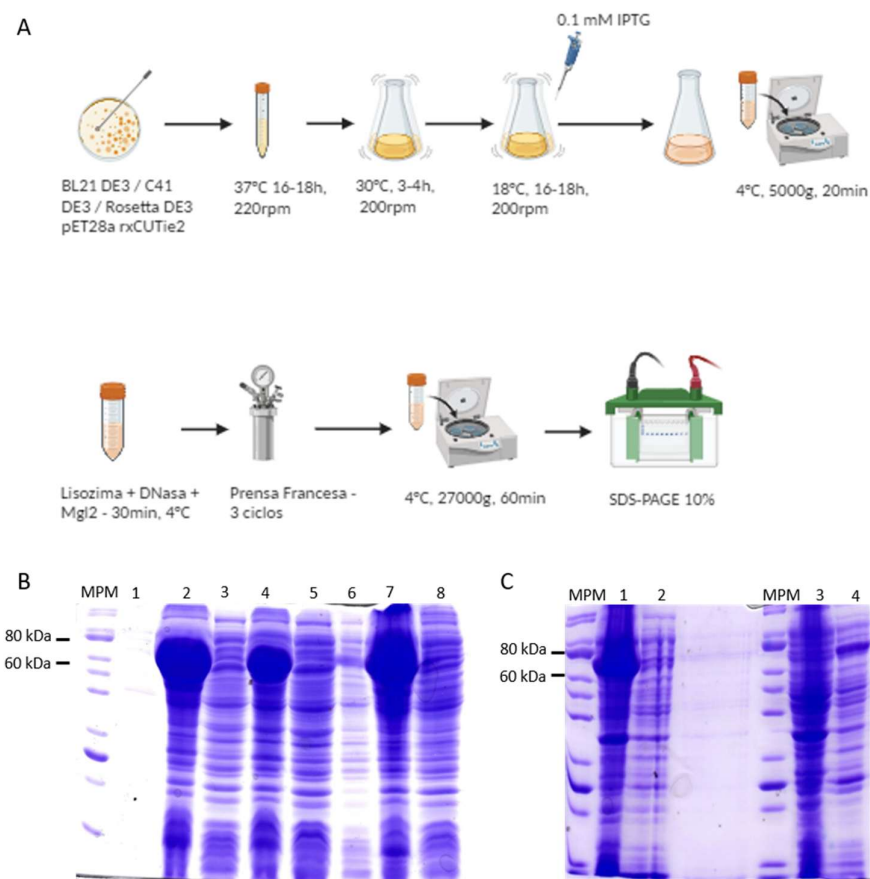


Figura 47. Evaluación de diferentes condiciones de expresión del biosensor dual rxCUTie2. A. Esquema de los pasos de expresión y extracción en bacterias *E. coli* cepas BL21-DE3, C41-DE3 y Rosetta-DE3 transformadas con el plásmido pET28a rxCUTie2. B. Gel SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras. carril 1: vacío; carril 2 y 3: pellet y fracción soluble, respectivamente, de expresión en BL21-DE3; carril 4 y 5: pellet y fracción soluble, respectivamente, de expresión en C41-DE3; carril 6: vacío; carril 7 y 8: pellet y fracción soluble, respectivamente, de expresión en Rosetta-DE3. C. Gel SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras donde: carril 1 y carril 2: Pellet y fracción soluble, respectivamente, de expresión en C41-DE3 inducida con 0,5mM IPTG; carril 3 y carril 4: Pellet y fracción soluble, respectivamente, de expresión en C41-DE3 inducida con 0,1 mM IPTG.

inducidas (**Figura 48 B**). El peso molecular de esta banda es compatible con el estimado para la secuencia primaria del biosensor rxCUTie2 (72 kDa). A continuación, se procedió a purificar por IMAC la proteína recombinante, identificándose esta misma banda, aunque en una proporción

minoritaria, en la fracción no unida (FNU), lo cual indica una retención eficiente de la proteína etiquetada a la resina de níquel. En la primera fracción del lavado con imidazol 10 mM (L1) se puede apreciar la eliminación de proteínas contaminantes que se unieron de manera inespecífica y con menor afinidad a la columna HisTrap. La elución completa de la proteína recombinante se logra a concentraciones de imidazol de 250 mM, fracciones E2 (E2A - E2B - E2C). Del análisis de las fracciones (**Figura 48 B**), se observa que la mayor parte de la proteína eluyó principalmente en las fracciones E2A - E2C, por lo que las mismas fueron juntas para proceder con el cambio de buffer y posterior cuantificación. Se estimó un rendimiento promedio por preparación de 1 mg de proteína por litro de medio de cultivo, siempre obteniéndose valores de pureza > 90%. (**Figura 48**).

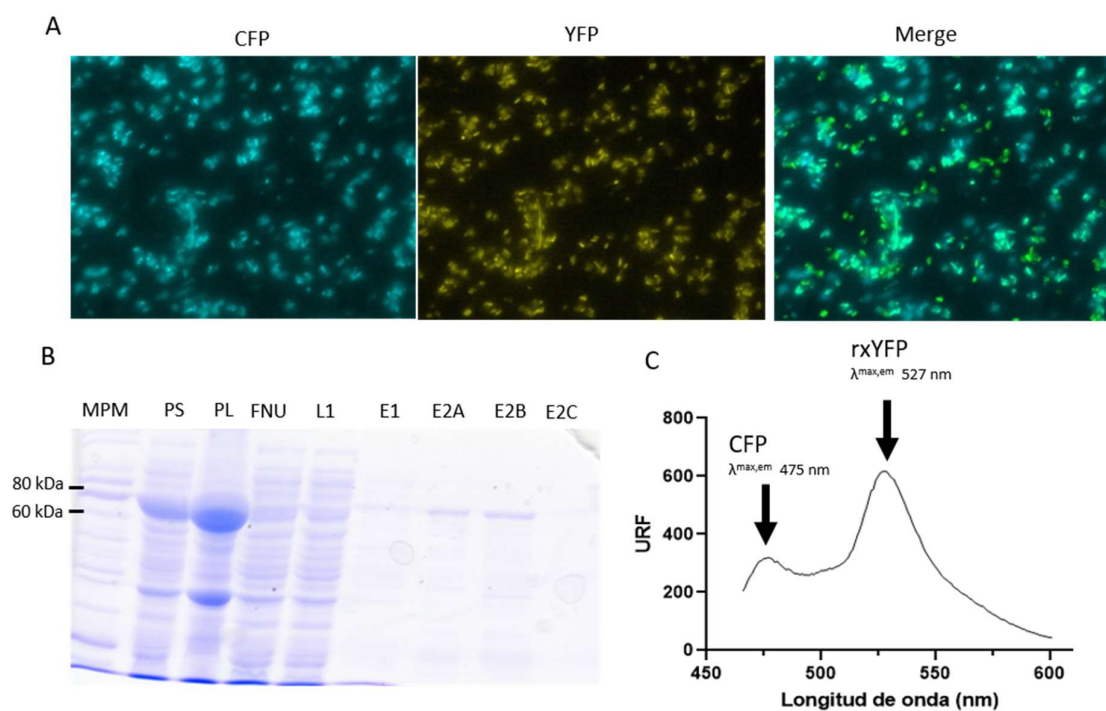


Figura 48. Expresión y purificación del biosensor dual rxCUTie2. (A) Imagen tomada en el microscopio de epifluorescencia de bacterias *E. coli* C41 inducidas 18 horas con IPTG 100 μ M, utilizando el objetivo 100x de inmersión en aceite y los filtros ECFP (CFP; λ_{ex} 426 - 446 nm / λ_{em} 460 - 500 nm) y FITC (rxYFP; λ_{ex} 470 - 495 nm / λ_{em} 510 - 550 nm). (B) SDS-PAGE 10% de muestras pre- y post-IMAC. MPM: marcador de peso molecular (Benchmark Protein Ladder); PS: post-sonicado; PL: pellet; FNU: fracción no unida; E1: eluido 1 (50 mM imidazol); E2A-E2C: eluido 2, fracción A-C (250 mM imidazol) (C) Espectro de emisión de la forma recombinante rxCUTie2 purificada por IMAC. Condiciones de adquisición: fotomultiplicador 700 volts, ancho de banda de 5 nm para cada monocromador y λ_{exc} 456 nm.

4.2.6 Caracterización *in vitro* de la funcionalidad del biosensor rxCUTie2 a estímulos redox y nucleótido cíclico.

La caracterización funcional de rxCUTie2 *in vitro* se abordó mediante ensayos de titulación con diferentes concentraciones de GMPc y bajo condiciones donde el módulo redox sensible del biosensor (la rxYFP) se encontrara reducido (en presencia de DTT) u oxidado (en presencia de GSSG). El estudio de diferentes condiciones redox es de gran relevancia para determinar la sensibilidad del par FRET ya que la oxidación de rxYFP se acompaña de una disminución en su intensidad de fluorescencia, lo cual podría comprometer la detección de cGMP.

Tomando como base el diseño de los ensayos realizados para el sensor CUTie2 (**sección 4.2.3**), la experiencia con el sensor rxmRuby2 y con otros biosensores fluorescentes caracterizados en (Sardi, 2016), como el sensor hGrx1-roGFP2, es que se evaluaron las siguientes condiciones:

- 1) rxCUTie2 (5 μ M) totalmente reducido y titulado con GMPc (**Figura 49 A**)
- 2) rxCUTie2 (5 μ M) totalmente oxidado y titulado con GMPc (**Figura 49 D**)
- 3) rxCUTie2 (5 μ M) totalmente reducido y titulado con GSSG (**Figura 51 A**).

En todos estos ensayos y previo a las correspondientes titulaciones, el exceso de DTT (5 mM) y GSSG (2 mM) que fue empleado para obtener la forma totalmente reducida y oxidada, respectivamente. El biosensor fue removido por SEC (columna sefarosa G25).

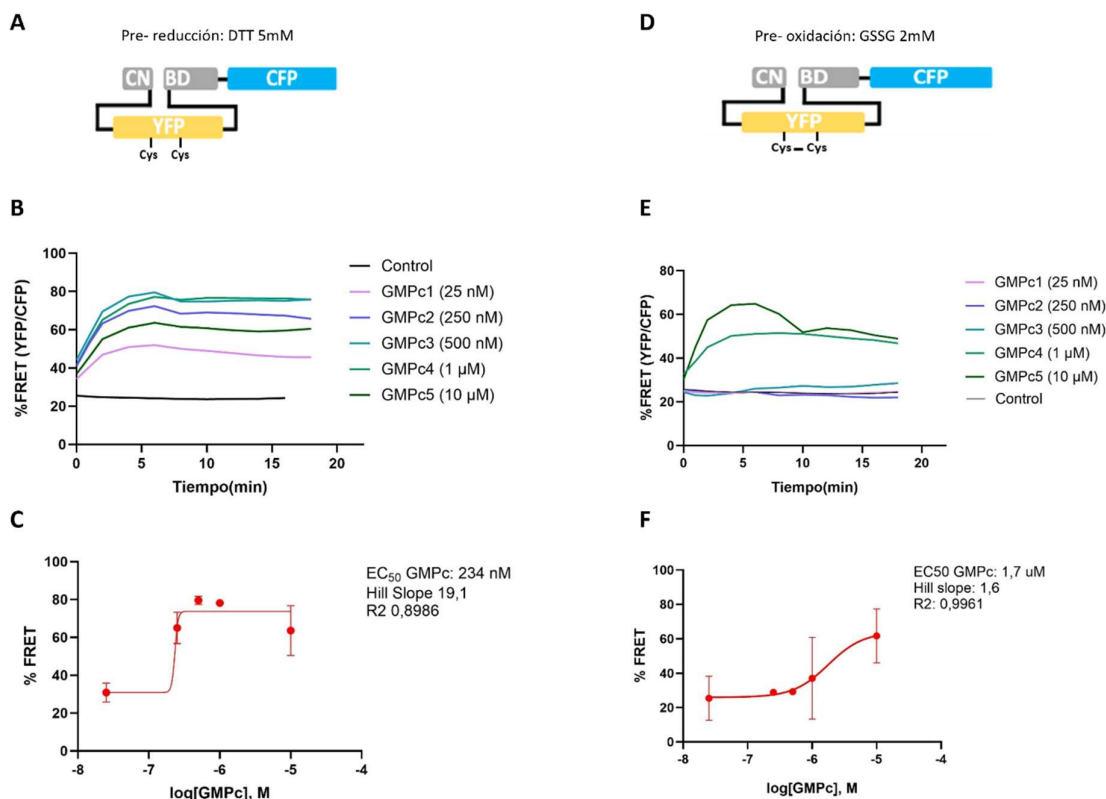


Figura 49. Caracterización de la respuesta de FRET del biosensor rxCUTie2. El biosensor (5 μM) totalmente (A) reducido (5 mM DTT) y (D) oxidado (2mM GSSG) fue incubado con diferentes concentraciones de GMPc (0 - 10 μM) por 20 minutos en microplaca 96 pocillos, registrándose el curso temporal del espectro de emisión ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 454/466-600 nm) en un equipo Cary Eclipse. (B y E) Se grafica el % FRET (YFP/CFP) vs tiempo (min) en relación al valor de FRET a tiempo 0. Los datos de EC₅₀ fueron obtenidos por ajuste utilizando la ecuación de Boltzmann ($R^2 \geq 0,98$) (C y F).

Como se aprecia en la **Figura 49 B**, ante el agregado de GMPc, la señal de FRET de la forma reducida de rxCUTie2 sufre un incremento que depende del tiempo y concentración de nucleótido cíclico. Tanto la velocidad de respuesta (2% FRET/min (25 nM), 5% FRET/min (250 nM), 5,8% FRET/min (500 nM), 6% FRET/min (1 μM)) como el tiempo al cual se alcanza un *plateau* de máxima señal de FRET (ej. entre los 5 - 10 minutos post-estímulo, 20 – 40%) son directamente correlativos con la concentración de nucleótido cíclico. Luego de alcanzar el máximo de FRET, y hasta los 20 minutos, la señal de FRET permaneció relativamente estable para todas las concentraciones de GMPc ensayadas. Otro dato importante es que el % de FRET máximo alcanzado por el biosensor dual a una concentración de saturación de GMPc (10 μM; 27% FRET), está dentro del rango de valores obtenidos para CUTie2 (26 – 30% FRET; **Figura 44**).

A partir de la curva [GMPc] vs % FRET se calculó un EC_{50} de 234 ± 14 nM GMPc para rxCUTie2 (**Figura 49 C**), el cual es casi idéntico al obtenido para CUTie2 (EC_{50} de 277 nM; **Figura 44**). Estos resultados demuestran que las mutaciones realizadas al biosensor dual no modificaron la afinidad del CNBD por GMPc ni los cambios alostéricos disparados por esta interacción, ni tampoco la capacidad de las proteínas fluorescentes para hacer FRET.

Cuando la titulación se realiza sobre el biosensor dual cuyo módulo aceptor de FRET y redox sensible, la rxYFP, ha sido oxidado con GSSG (**Figura 49 D y E**), se observan señales de FRET más bajas en todo el rango de concentraciones de GMPc ensayadas y cinéticas de respuesta significativamente más lentas que las registradas para la forma reducida de rxCUTie2 (excepto a la concentración de 10 μ M GMPc). Por ejemplo, es prácticamente indistinguible en magnitud y velocidad la respuesta del biosensor oxidado para concentraciones de 25 - 500 nM de GMPc ($0 - 3\%$ FRET y $0 - 0,3\%$ FRET/min, respectivamente). A 1 y 10 μ M de GMPc se observa una cinética y máximo de señal de FRET que es concentración dependiente. Los % de FRET obtenidos a estas concentraciones de GMPc para el biosensor oxidado (19 y 26%) fueron levemente inferiores a los registrado para la forma reducida de rxCUTie2 (27%), lo cual sugiere una menor eficiencia de FRET en la primera condición. A partir de la curva [GMPc] vs % FRET se calculó un EC_{50} de $1,7 \pm 0,1$ μ M GMPc para la forma oxidada de rxCUTie2 (**Figura 49 F**), el cual es 7 veces más alto que el estimado para la forma reducida del biosensor. Está marcada disminución en la afinidad por GMPc del biosensor oxidado podría ser aparente y deberse solo a la disminuida eficiencia de la rxYFP a absorber y emitir luz cuando se encuentra oxidada (Ostergaard, 2001), (Björnberg, 2006), (Meyer, 2010) y/o bien a una afectación del cromóforo de la CFP bajo estas condiciones. Cualquiera de estos fenómenos afectaría la sensibilidad de la señal FRET pero no necesariamente los otros eventos moleculares que tienen lugar en el biosensor como lo son la afinidad por el ligando y el cambio conformacional del CNBD que acompaña a esta interacción, o el ángulo y distancia adoptadas por los módulos fluorescentes. La señal de IF de la CFP para el biosensor totalmente reducido y oxidado en ausencia de GMPc tuvo valores similares: 514 y 521 URF, lo cual indica que el módulo dador de fluorescencia no sería responsable de las bajas señales de FRET (ej. por baja emisión para excitar al aceptor) y que la mutación realizada al módulo CFP (Cys428Ser) no alteró las propiedades espectrales del mismo bajo condiciones oxidantes. Al analizar la IF de CFP bajo condiciones de preoxidación en función de [GMPc] (**Figura 50 C y D**) se observa un comportamiento similar a la gráfica de % FRET vs [GMPc] (**Figura 49 E y F**), bajas concentraciones de GMPc (25 nM – 500 nM) no provocan una disminución en la IF de la proteína CFP, mientras que concentraciones más altas (1 y 10 μ M) desencadenan una disminución del 50% de la IF luego de dos minutos de

exposición (**Figura 50 C**). Si se compara este resultado con la IF de la proteína CFP en el biosensor prereducido (**Figura 50 A**) se observa que dos minutos de tratamiento con 25 nM de GPMc ya es suficiente para alcanzar un valor similar al obtenido con el biosensor preoxidado con 10 μ M de GPMc. Las gráficas de IF CFP vs [GMPc] reflejan esta diferencia en el comportamiento entre ambas formas redox del biosensor (**Figura 50 B y D**), se calculó un EC_{50} de 190 ± 20 nM GMPc para rxCUTie2 prereducido y un EC_{50} de 901 ± 30 nM GMPc para rxCUTie2 preoxidado. Tomando en cuenta este último valor y el obtenido para % FRET vs cGMP ($1,7 \pm 0,1 \mu$ M) para el biosensor preoxidado, se podría decir que una menor relación entre la excitación y la emisión de la forma oxidada de la rxYFP es la que podría estar comprometiendo la señal de FRET.

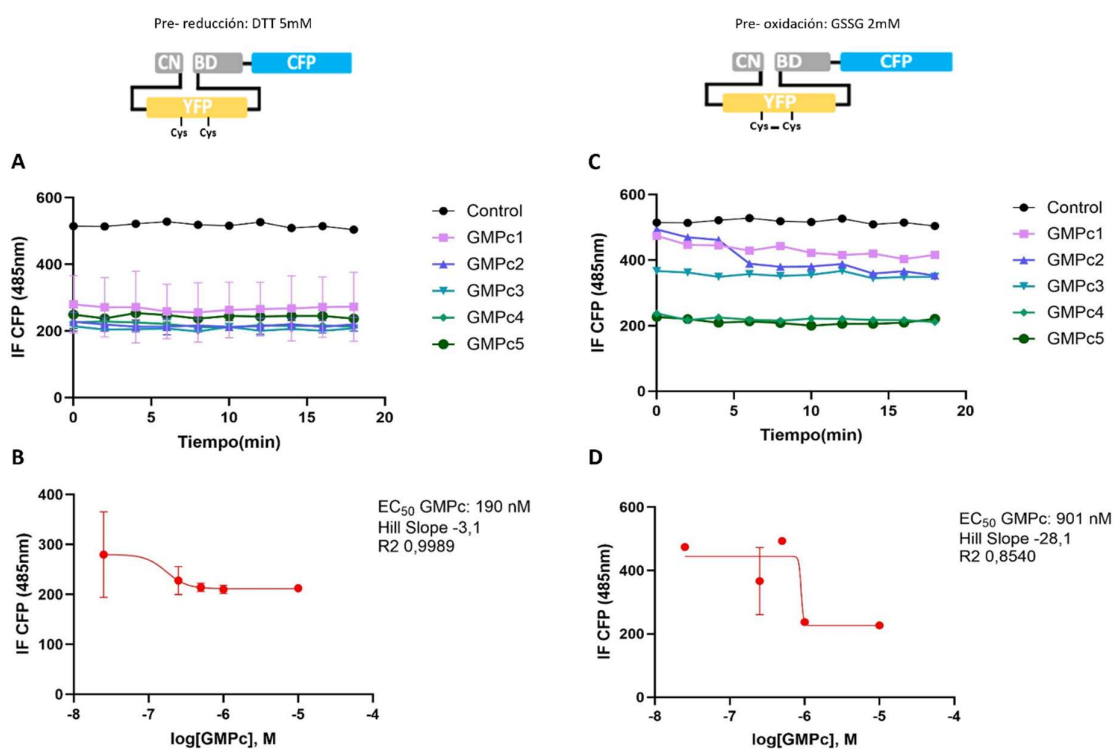


Figura 50. Caracterización de la respuesta de IF de la proteína CFP del biosensor rxCUTie2. Se grafica la IF CFP (485nm) del biosensor (5 μ M) totalmente (A) reducido (5 mM DTT) y (C) oxidado (2mM GSSG) incubado con diferentes concentraciones de GMPc (0 - 10 μ M) por 20 min en microplaca 96 pocillos, registrándose el curso temporal del espectro de emisión ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 454/466-600 nm) en un equipo Cary Eclipse. Los datos de EC_{50} fueron obtenidos por ajuste utilizando la ecuación de Boltzmann ($R^2 \geq 0.98$) (B y D).

Dado que el biosensor rxYFP fue previamente caracterizado demostrándose su selectividad por GSH/GSSG (Ostergaard, 2001); (Björnberg, 2006), en esta tesis restringimos los ensayos de

funcionalidad redox a determinar si rxCUTie2 se oxida reversiblemente con, y por ende es capaz de detectar, GSSG (**Figura 51 A**). Para ello, el biosensor dual pre-reducido (3 μ M) fue incubado con diferentes concentraciones de GSSG (0,012 - 1 mM) durante 30 minutos, luego de lo cual todas las muestras fueron tratadas con un exceso de DTT (2 mM) y la incubación se extendió por 30 minutos adicionales. En estos ensayos de curso temporal solo se midió la fluorescencia de rxYFP (λ_{exc} 510 nm / λ_{em} 525 nm). Se pudo observar una oxidación concentración dependiente del biosensor con una cinética monofásica para concentraciones bajas de GSSG (12 y 62 μ M) y cinéticas de dos fases (una inicial rápida seguida de una lenta) para el rango de concentraciones altas de oxidante (> 125 μ M), similar al comportamiento de la rxmRuby2 (**Figura 33**). En ese sentido, la velocidad inicial de oxidación de rxYFP por 0,25 y 1 mM GSSG fue indistinguible entre sí, siendo ligeramente más marcada para esta última concentración en la segunda fase. No obstante en ambos casos se alcanzan valores máximos de oxidación del biosensor similares (55 – 60% reducción), para obtener un 100% de oxidación hubiera sido necesario tratar al biosensor con 10 mM de GSSG (Østergaard, 2004). Para las concentraciones más bajas de GSSG (12 - 125 μ M) el nivel de oxidación del biosensor oscila entre un 10 – 20%. Al agregar DTT se observa una recuperación rápida (< 5 min) de la intensidad de fluorescencia de la rxYFP y por lo tanto del estado reducido del biosensor en las muestras expuestas a concentraciones bajas de GSSG (12 - 125 μ M). También se distingue una reducción significativa y rápida de la rxYFP (90% reducción en 5 minutos) para las muestras tratadas con 0,25 y 1 mM GSSG, la cual persiste con una tendencia alcista pero de cinética lenta los restantes 25 minutos. En su conjunto, estos resultados confirman la funcionalidad del módulo rxYFP inserto en el CNBD del biosensor rxCUTie2. Los resultados obtenidos son comparables con los observados por (Ostergaard, 2001) y (Østergaard, 2004), dónde se reporta una oxidación directa por GSSG lenta (72 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$), la exposición de la proteína rxYFP a 100 μ M de GSSG es difícilmente detectable en un marco temporal de pocos minutos, recién luego del transcurso de 25 minutos se observa una disminución de ~ 15 % de reducción.

Finalmente, se procedió a titular el biosensor dual con diferentes concentraciones de GMPc (0,025 - 10 μ M) y en presencia de 1 mM GSSG (**Figura 51 C**). Bajo estas condiciones, rxCUTie2 se comportó de manera similar al biosensor reducido (**Figura 49 B**), mostrando una velocidad y respuesta de FRET que correlacionó positivamente con la concentración de GMPc. Para todas las concentraciones de GMPc se produjo un marcado incremento de FRET (20 – 40%) en los primeros 10 minutos de incubación (2,25% FRET/min, 3% FRET/min, 4% FRET/min, 4,75% FRET/min y 5% FRET/min. Luego de este tiempo y hasta los 20 minutos, la señal de FRET permaneció relativamente estable para todas las concentraciones de GMPc ensayadas.

El monitoreo simultáneo de la señal no FRET del módulo rxYFP del biosensor dual incubado con las diferentes concentraciones de GMPc (**Figura 51 D**) mostró una oxidación marcada del mismo (50 – 60% reducción rxYFP) en los primeros 2 minutos de incubación, la cual, al igual que lo comentado para la señal de FRET, se mantiene relativamente estable hasta finalizado el ensayo (20 min). No obstante, resultó llamativo que el nivel de oxidación del biosensor en presencia de 1 y 10 μM GMPc fue menor (reducción rxYFP de 65% y 70%, respectivamente) que el registrado a concentraciones bajas del ligando nucleotídico (25 - 500 nM; 50% reducción rxYFP). Esto sugiere que concentraciones altas de GMPc podrían interferir con la oxidación del módulo rxYFP.

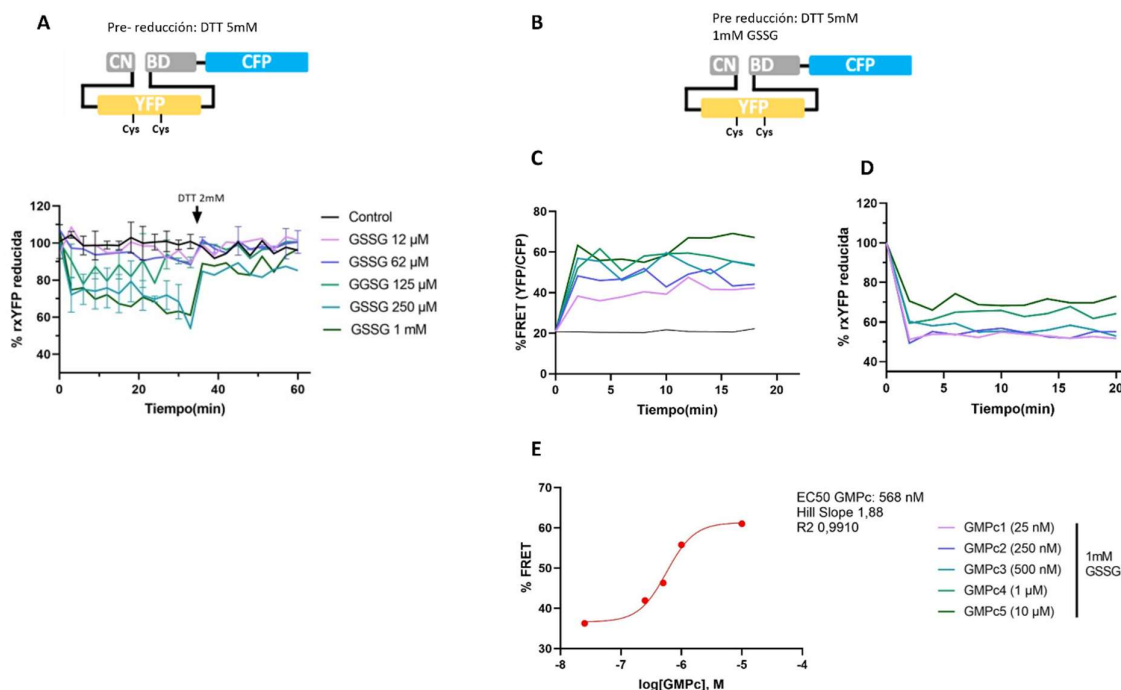


Figura 51. Caracterización de la respuesta del biosensor rxCUTie2 a estímulos redox y de GMPc simultáneos. (A). Curso temporal (60 min) de la oxidación del módulo rxYFP tratado con diferentes concentraciones de GSSG y luego del agregado de 2 mM DTT al minuto 30 (indicado con flecha). El % de reducción de rxYFP se calcula normalizado a una muestra totalmente reducida (5 mM DTT/ 60 min) y oxidada (10 mM GSSG/ 60 min). (B) Curso temporal (20 min) de la respuesta del biosensor previamente reducido (5 mM DTT) y luego incubado con GSSG (1 mM) y con diferentes concentraciones de GMPc (0 - 10 μM). Se gráfica: B) el % FRET vs tiempo (min) normalizado al valor de FRET a tiempo 0, C) el % de reducción de rxYFP vs tiempo (min) normalizado como se indicó en A), y D) el % FRET vs $\log [\text{GMPc}]$. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Boltzmann para obtener los valores de EC_{50} y el coeficiente de Hill.

A partir de la curva de % FRET vs. [GMPc], el valor de EC_{50} para GMPc fue de 568 nM para rxCUTie2 en presencia de 1 mM GSSG (**Figura 51 E**). Este valor es al menos dos veces superior al calculado para la forma reducida del biosensor dual, lo cual sugiere una menor afinidad por GMPc de la forma oxidada de rxCUTie2. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que a bajas concentraciones de GMPc la señal de FRET podría estar siendo subestimada debido a la menor capacidad de absorber y emitir fluorescencia de la forma oxidada de rxYFP.

Tanto la menor sensibilidad de la forma oxidada de rxCUTie2 por GMPc como el efecto protector contra su oxidación por GSSG mediada por altas concentraciones de este nucleótido cíclico sugieren una interacción específica entre la especie oxidada de la rxYFP y el CNBD. Como fue descrito en el artículo de (Klein F. , 2021), las simulaciones moleculares fueron realizadas sobre el sensor CUTie2 en su forma *apo* y *holo*. Luego de 10 μ s de simulación, se concatenaron las trayectorias de cada una de estas especies y se calcularon las eficiencias de FRET. De los conformeros unidos a GMPc se graficaron las eficiencias de FRET en función de la D (distancia entre cromóforos) y la κ^2 (orientación de los cromóforos) (Machado, 2016). Los conformeros se distribuyeron en diferentes poblaciones, distinguiéndose tres conformaciones iniciales: 1) la de un grupo de conformeros que permanece bloqueado en una configuración de alto FRET (**Figura 45 B**, grupo *a*), 2) otra donde los conformeros exploran un rango más amplio de configuraciones (con D entre 4 – 6 nm; **Figura 45 B**, grupo *b*) y 3) un grupo que permanece la mayor parte del tiempo con los dos módulos fluorescentes alejados uno del otro, presentando pocas instancias de FRET (**Figura 45 B**, grupo *c*).

Teniendo en cuenta esas predicciones computacionales, podemos inferir para rxCUTie2 que la oxidación de las cisteínas de la rxYFP favorecería el enriquecimiento de la población de conformeros del grupo *b* y en menor medida del *c*, y que para desplazar dicho equilibrio hacia conformeros con mayor eficiencia de FRET (grupo *a*) sean necesarias concentraciones más elevadas de GMPc. De la misma manera, al desplazar el equilibrio hacia conformeros del grupo *a*, concentraciones elevadas de GMPc desfavorecerían la oxidación del módulo rxYFP. No obstante, las bases moleculares de estos fenómenos son desconocidos y requieren de más estudios.

4.2.7 Generación de líneas celulares de *T. brucei* y de *T. cruzi* que expresen el biosensor rxCUTie2

La forma sanguínea de *T. brucei* (cepa 427), línea celular 449 (que codifica una copia del gen de la proteína represora de tetraciclina, ya descrito en la **sección 4.1.4**), fue transfectada con el plásmido pHD1700 CFP-cGMP-rxYFP que permite la integración sitio-dirigida y expresión inducible de la secuencia del biosensor dual. En este vector, la expresión del transgen está bajo el control de la secuencia del promotor del gen de prociclina de *T. brucei* (PARP: procyclic acidic repetitive protein, una proteína altamente expresada en la forma no infectiva de este parásito; (Hotz, 1998), (Wirtz, 1999), (Tyler-Cross, 1995)). A su vez, esta secuencia promotora está precedida del operón bacteriano de tetraciclina que une con alta afinidad a la proteína represora de tetraciclina, la cual reprime estéricamente la unión de la ARNpol a la secuencia promotora contigua impidiendo la transcripción del gen vecino (Hotz, 1995). Ante el agregado de tetraciclina, este antibiótico se unirá a la proteína represora produciendo un cambio conformacional que le hará perder afinidad por la secuencia del operón permitiendo así que ocurra la transcripción del gen de interés.

Luego de la transfección por nucleofección (sistema Amaxa), los parásitos transfectantes fueron seleccionados con higromicina y mediante el método de dilución límite se lograron obtener 6 clones en los cuales se evaluó la expresión del biosensor por citometría de flujo (**Figura 52 A**). Cada clon fue crecido durante 24 horas en ausencia y presencia de 1 µg/ml de oxitetraciclina, y la intensidad de fluorescencia fue registrada utilizando el citómetro ATTUNE (λ_{ex} 488 nm / λ_{em} 530 nm) en busca de señal fluorescente de la rxYFP. Para este ensayo se utilizó como control parásitos de la línea celular 449 que expresan, también de manera inducible, el biosensor hGrx-roGFP2.

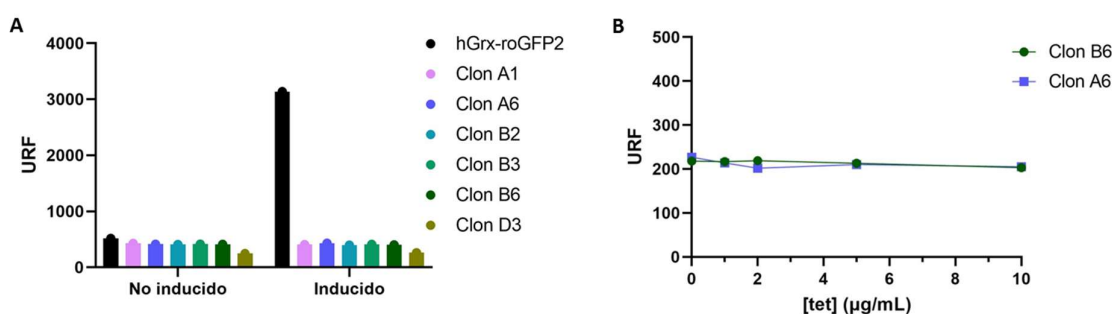


Figura 52. Expresión del biosensor rxCUTie2 en la forma sanguínea de *T. brucei*. (A) Intensidad de fluorescencia relativa de la rxYFP registrada por citometría de flujo (λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 530/30 nm) para 6 clones.

clones previamente inducidos (24 h) o no con oxitetraciclina (1 µg/ml). Como control se incluye a la línea celular de *T. brucei* que expresa hGrx-roGFP2 y fue crecida e inducida bajo las mismas condiciones. (B) IF de la rxYFP para el clon B6 y el clon A6 inducidos con diferentes concentraciones de oxitetraciclina.

Como se puede observar en la **Figura 52 A**, ninguno de los 6 clones mostró diferencias significativas de señal de fluorescencia de rxYFP entre la condición inducida y no inducida. Por el contrario, el control correspondiente a la línea celular reportera hGrx1-roGFP2 crecida en presencia del inductor presentó una señal de fluorescencia al menos 7 veces superior a la de estos mismos parásitos cultivados en ausencia del mismo.

Dos de los clones (A6 y B6) fueron crecidos durante 24 horas en presencia de concentraciones más altas del inductor (2, 5 y 10 µg/ml; **Figura 52 B**) para establecer si la concentración de oxitetraciclina anteriormente empleada fue insuficiente para inducir la expresión del transgen. Para ambos clones, los niveles de fluorescencia fueron bajos y prácticamente idénticos en todo el rango de concentraciones de oxitetraciclina ensayados, confirmando que la baja o nula expresión de rxCUTie2 por estas líneas celulares es una propiedad intrínseca de las mismas y no debida a biodisponibilidad del agente inductor.

Como se mencionó al inicio de esta sección, la línea celular empleada para generar las líneas reporteras codifica para una única copia de la proteína represora de la tetraciclina. Ante la sospecha que la expresión del biosensor dual otorgara una desventaja selectiva a la forma sanguínea de *T. brucei* (ej. citotoxicidad o interferencia con procesos celulares) y que la misma tuviera lugar durante el proceso de selección clonal debido a una ineficiente represión de la expresión por la proteína represora de tetraciclina, es que decidimos transfectar parásitos que tienen integrado en su genoma dos copias de este gen (línea celular 514-1313). Esta línea celular fue desarrollada con tal fin de y mostró una mayor eficiencia en reprimir la expresión de genes regulada por el operón de tetraciclina (Alibu, 2005). Producto de la transfección de esta línea celular con la construcción para expresar el biosensor dual se obtuvieron 8 clones resistentes a higromicina, ninguno de los cuales mostró señal de fluorescencia cuando fueron cultivados con oxitetraciclina (1 µg/ml; no mostrado). Dado que para ambas líneas celulares fue posible obtener parásitos resistentes al antibiótico de selección, esto sugiere que la integración genómica del casete de expresión de rxCUTie2 no es la etapa problemática de este proceso. No obstante, el análisis molecular (ej. genotipado por PCR o Southern blot) de estos clones sería necesario para confirmar la presencia o ausencia completa o parcial del gen de rxCUTie2 en su genoma y de los elementos que controlan su expresión (secuencia promotora, regiones no traducidas 5' y 3'). En ese sentido, se ha reportado que *T. brucei* es capaz de

introducir mutaciones (sustituciones, inserciones, delección o transposición en sitio genómico transcripcionalmente silente) en secuencias ectópicas que representan una desventaja para su crecimiento (Ammerman, 2013) (Hashimi, 2009) (Chen, 2003) (Fisk, 2008) (Motyka, 2004).

Considerando la refractariedad mostrada por *T. brucei* para expresar el biosensor dual, optamos por cambiar la especie y estadio de tripanosoma sobre la cual generar líneas reporteras de rxCUTie2. La especie seleccionada fue *T. cruzi* (cepa CL Brenner), que causa la enfermedad de Chagas en humanos, y más específicamente una línea celular transfectada establemente con el vector pLew13 que integra en el locus de β -tubulina del genoma del parásito una copia de los genes de la T7 ARN polimerasa y de la TetR, ambos bajo el control del promotor fuerte del ARNr (Taylor, 2006). El estadio epimastigota de esta especie no es infectivo y puede cultivarse de manera axénica y prolongada, alcanzando altas densidades celulares. Como vector de expresión se seleccionó el plásmido pTcINDEX el cual se integra de manera estable en un locus transcripcionalmente quiescente (*non transcribed ribosomal RNA spacer*) del genoma de *T. cruzi* y posee un promotor de T7 ARNpol y un operon de tetraciclina que dirigen la expresión inducible del gen de interés (Taylor, 2006). Esta línea celular fue transfectada con el plásmido pTcINDEX-rxCUTie2 linealizado con *SpeI* (para favorecer el proceso de integración al genoma por recombinación homóloga, **Figura 43C**) o con PBS (control), y la selección de la población de parásitos con vector integrado a su genoma se realizó con higromicina.

Se realizaron dos ensayos independientes de transfección con ADN fresco obtenido de un kit de Maxiprep (Sigma) pero en ninguno de ellos se recuperaron parásitos viables luego del tratamiento con antibiótico de selección (200 μ g/ml higromicina). Esto mismo ocurrió con los controles de parásitos sin transfectar y los transfectados con PBS. Por lo tanto, estos resultados indican que el plásmido pTcINDEX-rxCUTie2 no se integró al genoma del parásito.

Las razones de estos resultados negativos difícilmente puedan atribuirse a los diferentes vectores de expresión o líneas celulares empleadas ya que estos sistemas fueron utilizados con éxito para la expresión o silenciamiento de genes tanto por nuestro laboratorio como por diferentes grupos de investigación (Comini, 2008), (Manta, 2013), (Hiller, 2014), (Alibu, 2005), (Voncken, 2003), (Sardi, 2016), (Alloatti, 2010), (Basu, 2013), (Gould, 2013), (Wickstead, 2002). Probablemente mecanismos de regulación epigenética y post-transcripcionales (Clayton, 2019), estén contribuyendo a los nulos niveles de expresión del biosensor en *T. brucei* o a la fallida integración del vector de expresión en el genoma de *T. cruzi*.

Otra alternativa aplicable a *T. brucei*, podría haber sido el empleo de un vector (pHD1034) que integra en el locus transcripcionalmente quiescente del espaciador del ARN ribosomal (*non transcribed ribosomal RNA spacer*) y controla la expresión constitutiva del gen de interés mediante un promotor PARP. Este sitio de integración difiere al del vector pHD1700 que eventualmente podría ser menos propenso a silenciamiento o recombinación por factores epigenéticos.

La continuación de esta línea de trabajo debería abordar estas cuestiones, así como explorar otras especies de tripanosomátidos (como *Leishmania sp.*, ver **sección 1.5.1**) para lograr el objetivo de obtener líneas reporteras duales de cambios redox y GMPc.

4.2.8 Conclusiones objetivo específico 2

En este capítulo se presentaron los resultados del desarrollo de un sensor de GMPc diseñado computacionalmente. Esta metodología generó simulaciones de la eficiencia de FRET que fueron contrastadas con los datos experimentales obtenidos sobre la forma recombinante del biosensor CUTie2. Este biosensor respondió de manera específica y sensible (EC_{50} GMPc = 277 ± 60 nM vs EC_{50} AMPc = 167 ± 54 μ M) generando señal de FRET cuando fue estimulado con GMPc, lo cual confirmó que tanto las proteínas fluorescentes como el CNBD adoptaron el plegamiento y funcionalidad esperados.

El diseño modular de este biosensor abre la posibilidad de generar un portfolio de sensores compuestos por diferentes pares FRET y por dominios con afinidad por diferentes ligandos (sean estos basados en CNBDs u otros dominios relacionados), siempre y cuando la interacción con sus sustratos de lugar a cambios conformacionales similares a los del CNBD. Otra característica interesante del diseño molecular de este biosensor es que admite la inclusión de secuencias tanto en su N- como C-terminal las que podrían dirigir el mismo a diferentes compartimentos subcelulares o bien permitir la detección de este segundo mensajero en el microambiente donde la proteína de fusión elegida esté cumpliendo su rol biológico.

Con la finalidad de expandir el espectro de eventos bioquímicos a ser investigados con estos tipos de biosensores, es que decidimos modificar el módulo YFP para tonarlo capaz de detectar variaciones en la relación GSH/GSSG. Mediante 3 mutaciones específicas convertimos a la YFP en una proteína fluorescente redox sensible (rxYFP). Una exploración sistemática de diferentes cepas y protocolos de expresión nos permitió encontrar condiciones satisfactorias para producir la forma recombinante de rxCUTie2 y proceder a su caracterización. Nos resultó

llamativo que a pesar que rxCUTie2 difiere en solo 4 aminoácidos de CUTie2, fueran necesarias condiciones de expresión y preparación de extractos diferentes para la producción de cada uno de ellos. Por ejemplo, rxCUTie2 logró ser expresado en una cepa especial de *E. coli* que soporta la expresión de proteínas tóxicas y empleando concentraciones bajas de inductor (100 μ M IPTG). Como se discutirá más adelante, esto estaría indicando un procesamiento diferente del biosensor rxCUTie2 y una interacción no deseada con procesos celulares.

Este biosensor dual respondió al estímulo oxidativo generado por distintas concentraciones de GSSG (visualizado por una disminución de la fluorescencia del módulo rxYFP) y dicha oxidación fue revertida por un agente reductor, demostrando que la misma implica la formación de un enlace disulfuro. El rxCUTie2 fue capaz de realizar FRET al ser titulado con GMPc, determinándose valores de EC_{50} de 234 ± 14 nM y $1,7 \pm 0,1$ μ M, para la forma reducida y oxidada del biosensor. Esta diferencia sugiere que la oxidación del módulo rxYFP de rxCUTie2 afecta la afinidad del CNBD por GMPc y/o estabiliza conformeros donde CFP y rxYFP se ubican a distancias de bajo a mediano FRET. Por otro lado, la magnitud de la oxidación inducida por 1 mM GSSG dependió de la concentración de GMPc siendo ésta más marcada a bajas concentraciones del nucleótido cíclico. Este comportamiento refuerza la idea de una influencia mutua entre el dominio CNBD y la forma oxidada de la rxYFP la cual es modulada por la unión de ligando. No obstante, esta interacción no afectó la cinética de respuesta del biosensor, el cual mostró cambios significativos en su fluorescencia en ≤ 2 minutos tanto cuando fue enfrentado a un estímulo oxidativo (1 mM GSSG) como a GMPc (0,025 - 10 μ M). Respecto a la respuesta al GSSG, es importante aclarar, que al igual que fue demostrado para la proteína rxYFP (Ostergaard, 2001), roGFP2 (Gutscher M. , 2009), se espera que en condiciones fisiológicas la oxido-reducción del biosensor por el par GSH/GSSG sea catalizada por las glutaredoxinas celulares endógenas.

A pesar de varios intentos no se logró obtener ninguna línea de tripanosomátido que exprese rxCUTie2. Dado que la secuencia de ADN que codifica para este biosensor fue optimizada con codones altamente representados *T. brucei*, podemos descartar que el uso de codones haya sido un cuello de botella para la transcripción de este gen. No obstante, no podemos descartar que el ARNm de rxCUTie2 se haya transcrito en niveles muy bajos o que sea inestable y posea una vida media muy corta, o bien que el biosensor sea citotóxico, obligando al parásito a retener el casete de resistencia al antibiótico de selección pero concomitantemente a silenciar la expresión del transgen (ej. mediante mutaciones o deleciones que interfieran con su correcta expresión o mediante la expulsión de la secuencia de interés). Un caso más extremo fue el de *T. cruzi*, especie para la cual ni siquiera fue posible obtener poblaciones resistentes al

antibiótico de selección, indicando que la construcción no se logró integrar al genoma del parásito.

Los resultados preliminares de caracterización de la forma recombinante de rxCUTie2 brindaron información relevante para predecir tanto la respuesta como las limitaciones que presentaría a nivel intracelular este novedoso biosensor dual. A partir de los ensayos *in vitro* reconocimos la dificultad de separar y discriminar las señales generadas por el par FRET CFP/YFP debido al solapamiento espectral que las mismas presentan. Esto podría ser problemático si los instrumentos de medida a ser empleados en ensayos celulares (ej citómetros o microscopios) trabajan con filtros con limitada resolución espectral. La discriminación de FRET respecto de cambios redox en la rxYFP puede resolverse mediante el análisis de la IF del módulo rxYFP excitado de manera independiente (no FRET, λ_{exc} 488 nm, λ_{em} 530 nm) para luego proceder a medir señal FRET (λ_{exc} 405 nm, λ_{em} 530). Con los datos de oxidación de obtenidos para rxYFP podría corregirse el valor de FRET y viceversa. No obstante, estos ensayos celulares requieren de controles de calibración redox que incluyan la adquisición de datos de las mismas muestras tratadas con un agente reductor y un oxidante. Protocolos similares al aquí descrito fue aplicado por (Voyton, 2018), para un biosensor FRET CFP-mCitrine que mide cambios intracelulares (citósol y glicosomal) en los niveles de glucosa en *T. brucei*. Otra aproximación para cuantificar la señal del reportero dual puede ser aquella basada en la microscopía hiperespectral y el análisis espectral de fasores. Esta técnica de análisis fue aplicada en ensayos *ex vivo* sobre muestras de tejido de moscas que expresaban CUTie2 (Gonzalez, 2023).

Otra potencial desventaja del par FRET CFP/YFP es que, si los niveles de expresión del biosensor fueran bajos, la autofluorescencia celular podría comprometer la detección de la señal intrínseca de rxCUTie2. Por este motivo, el tercer objetivo específico de esta tesis de Doctorado apuntó hacia el desarrollo de un biosensor dual basado en el par Clover/rxmRuby2. Este par FRET presenta un corrimiento espectral hacia el rojo, incrementado el coeficiente señal/ruido, además de presentar menor foto-toxicidad y ser compatible con el uso de láser azul y filtros de excitación comunes en la mayoría de los microscopios de fluorescencia y citómetros de flujo (Lam, 2012).

4.2.9 Anexo

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
373 bits(958)	1e-125	Compositional matrix adjust.	180/180(100%)	180/180(100%)	0/180(0%)
Query 1	MRTGLIKHTEYMEFLKSVPTFQSLPEEILSKLADVLEETHYENGEYIIRQGARGDTFFII				60
Sbjct 1	MRTGLIKHTEYMEFLKSVPTFQSLPEEILSKLADVLEETHYENGEYIIRQGARGDTFFII				60
Query 61	SKGTNVNMTMRKGKSPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG				120
Sbjct 61	SKGTNVNMTMRKGKSPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG				120
Query 121	KLTLKFIVTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFF				180
Sbjct 121	KLTLKFIVTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFF				180
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
357 bits(917)	2e-119	Compositional matrix adjust.	170/172(99%)	170/172(98%)	0/172(0%)
Query 465	GVQCFSRYPXHKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRXEVKFEGDTLVNRIELK				524
Sbjct 465	GVQCFSRYP HMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTR EVKFEGDTLVNRIELK				524
Query 525	GIDFKEDGNILGHKLEYNVYISHNVYITADKQKNGIKAHFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT				584
Sbjct 525	GIDFKEDGNILGHKLEYNVYISHNVYITADKQKNGIKAHFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT				584
Query 585	PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK				636
Sbjct 585	PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK				636

Figura 53. Alineamiento de secuencia de la construcción pET288a rxCUTie2. La secuencia Query es la obtenida por el secuenciador del IPMon, mientras que la secuencia Subject corresponde a la secuencia enviada por genscript. Se observa un 100 % y 98 % de homología para los segmentos 1 - 180 y 465 - 636, respectivamente.

4.3 Objetivo específico 3: Biosensor dual redox y de AMPc, Clover-AMPc-rxmRuby2 (INF-RXM)

4.3.1 Diseño molecular y generación del biosensor Clover-AMPc-rxmRuby2

A la fecha, no existen reportes sobre la generación de biosensores FRET de nucleótidos cíclicos con corrimiento espectral al rojo y capaces de medir simultáneamente la relación glutatión/glutatión disulfuro. El diseño de este biosensor lo abordamos computacionalmente, utilizando herramientas de bioinformática y modelado molecular. En primer lugar, se realizó una construcción análoga al sensor CFP-GMPc-rxYFP (módulo 2 de resultados) obteniendo una nueva arquitectura de sensor FRET para AMPc que se compone del dominio de enlace a AMPc de la subunidad reguladora IIB de PKA como módulo alostérico y el par FRET Clover/rxmRuby2 (denominado INF-RXM, **Figura 54**). Este par FRET presenta uno de los cambios de Stokes más grandes reportados en la literatura (Lam, 2012). Los resultados obtenidos para rxCutie mostraron una afectación recíproca de la capacidad de respuesta y afinidad del módulo de CNBD y la proteína fluorescente redox sensible y receptora de FRET. Nuestra hipótesis es que esto se debe a la inserción de la secuencia de la proteína redox sensible en el CNBD, lo cual podría estar afectando la dinámica de los cambios conformacionales y el equilibrio de las especies resultantes que acompañan ambos eventos de detección: unión de GMPc por CNBD y oxidación de cisteínas de rxYFP. Por lo tanto, para evitar esta interferencia y comprobar nuestra hipótesis, en la configuración del nuevo biosensor la proteína fluorescente dadora de FRET e insensible a cambios redox, Clover (Lam, 2012), fue inserta en el CNBD y el módulo aceptor de FRET, la proteína redox sensible rxmRuby2, fue colocada en posición C-terminal (**Figura 54 A y B**). Se realizó una sustitución puntual en la secuencia de Clover (Cys49Thr) para evitar la posible formación de disulfuros inespecíficos intra- o inter-moleculares entre las proteínas fluorescentes, al igual que fue previsto para el sensor rxCutie2 (sección **4.2.4**). Como dominio de unión a AMPc se seleccionó a la subunidad reguladora IIB de la proteína quinasa A (PKA), la cual sufre cambios conformacionales importantes luego de unir AMPc (**Figura 54 C**).

Al igual que lo reportado para el biosensor CUTie, es posible incluir secuencias de localización subcelular tanto en el N- como el C-terminal (**Figura 54 B**).

La secuencia que codifica para este biosensor dual se insertó en los vectores de expresión pET28a, pTcINDEX y pLexsy_Hyg2 los cuales permiten su expresión en *E. coli* (inducible), *Trypanosoma cruzi* (inducible) y *Leishmania spp.* (constitutiva). Se optó por optimizar la secuencia de codones para las construcciones a expresar en estos últimos organismos (empresa Genscript). La integridad de las nuevas construcciones fue confirmada mediante secuenciación de la doble hebra de ADN codificante (**Figura 55**).

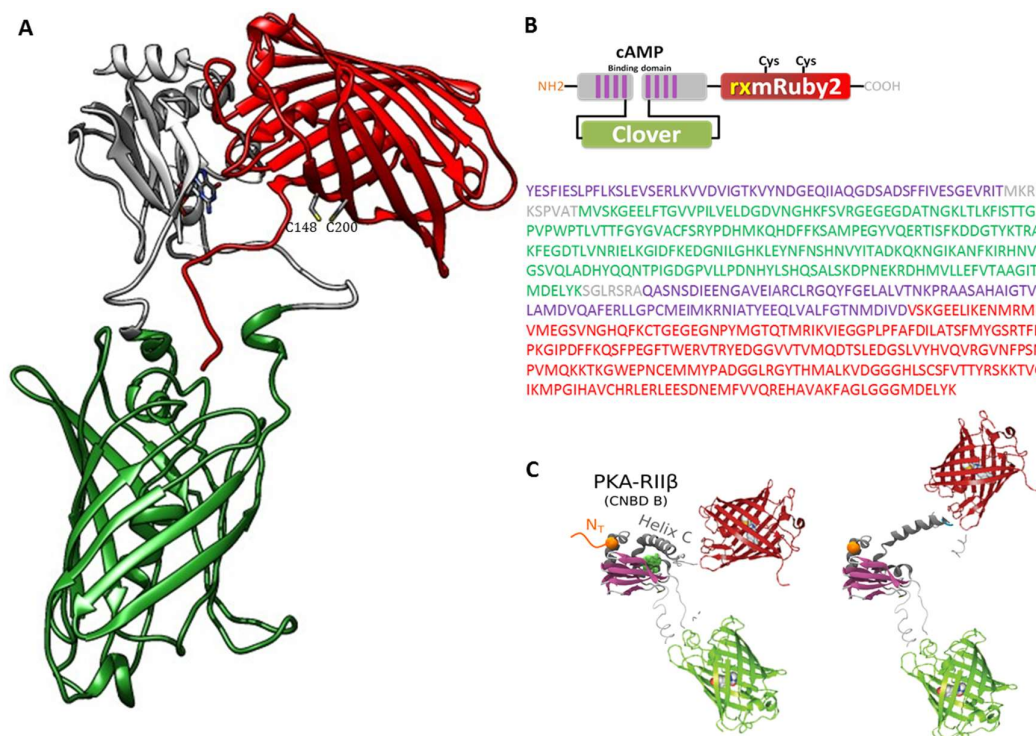


Figura 54. Diseño de INF-RXM (A) Modelo tridimensional construido *in silico* mediante PyMol a partir de la secuencia de la proteína Clover (verde), el sensor rxCUTie2 (CNBD gris) y la proteína rxmRuby2 (rojo). Se indica la posición de los residuos de cisteína de rxmRuby2 (Cys 148 y Cys 200), así como el ligando AMPc unido al CNBD de PKA-IIb. (B) Esquema representativo y secuencia de aminoácidos de INF-RXM. Cada dominio del sensor se encuentra identificado con diferente color: CNBD (violeta), espaciadores (gris), rxmRuby2 (Rojo) y Clover (verde). (C) Modelo del biosensor en forma *holo* (izquierda, FRET) y *apo* (derecha, no FRET), donde con bolas verdes se representa al ligando AMPc y en naranja el extremo N-terminal (N_T).

4.3.2 Expresión y purificación del sensor Clover-AMPc-rxmRuby2

Como una primera aproximación para obtener la forma recombinante de INF-RXM se utilizaron las mismas condiciones de expresión optimizadas para rxCUTie2 (ver **sección 4.2.5**). Sin embargo, no se detectó la proteína de interés en la fracción soluble del extracto celular durante la purificación ni tampoco durante la purificación por IMAC.

Para descartar que esto se debiera a errores de secuencia como ser micro-delecciones, - inserciones y/o corrimiento del marco de lectura, la secuencia del gen de interés en la construcción sintetizada por Genscript fue analizada mediante secuenciado (servicio del Institut Pasteur de Montevideo). Este análisis confirmó que la misma era la correcta (**Figura 55**), determinándose un 100% de identidad a nivel de aminoácidos entre la secuencia originalmente prevista y la obtenida.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1331 bits(3445)	0.0	Compositional matrix adjust.	640/640(100%)	640/640(100%)	0/640(0%)
Query 2	YESFIESLPFLKSLEVSRCLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIVESGEVRITMK				61
Sbjct 1	YESFIESLPFLKSLEVSRCLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIVESGEVRITMK				60
Query 62	RKGKSPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFISTT				121
Sbjct 61	RKGKSPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFISTT				120
Query 122	GKLPVPWPTLVTTFGYGVACFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRA				181
Sbjct 121	GKLPVPWPTLVTTFGYGVACFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRA				180
Query 182	EVKFEQDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFSHNHVVITADKQKNGIKANFKIRHN				241
Sbjct 181	EVKFEQDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFSHNHVVITADKQKNGIKANFKIRHN				240
Query 242	VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSHQALSADPNEKRDMVLEFVTAAGIT				301
Sbjct 241	VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSHQALSADPNEKRDMVLEFVTAAGIT				300
Query 302	HGMDELYKSGLSRAQASNSDIEENGAVEIARCLRGQYFGELALVTNKPRASAHAIQTV				361
Sbjct 301	HGMDELYKSGLSRAQASNSDIEENGAVEIARCLRGQYFGELALVTNKPRASAHAIQTV				360
Query 362	KCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALFGTNMDIVDVSKGEELIKENMRMKV				421
Sbjct 361	KCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALFGTNMDIVDVSKGEELIKENMRMKV				420
Query 422	VMEGSVNGHQFKCTGEGGNPYMGQTMRKIVIEGGPLPFAFDILATSFMYGSRTFIKYP				481
Sbjct 421	VMEGSVNGHQFKCTGEGGNPYMGQTMRKIVIEGGPLPFAFDILATSFMYGSRTFIKYP				480
Query 482	KGIPDFFKQSFPEGFTWERVTRYEDGGVVTVMQDTSLEDGSLVYHVQVRGVNFPNGPVM				541
Sbjct 481	KGIPDFFKQSFPEGFTWERVTRYEDGGVVTVMQDTSLEDGSLVYHVQVRGVNFPNGPVM				540
Query 542	QKKTKGWEPNCEMMYPADGGLRGYTHMALKVDGGGHLSCSFVTYRSKKTGVGNIKMPGIH				601
Sbjct 541	QKKTKGWEPNCEMMYPADGGLRGYTHMALKVDGGGHLSCSFVTYRSKKTGVGNIKMPGIH				600
Query 602	AVCHRLERLEESDNEMFVVQREHAVAKFAGLGGGMDELYK		641		
Sbjct 601	AVCHRLERLEESDNEMFVVQREHAVAKFAGLGGGMDELYK		640		

Figura 55. Alineamiento de secuencia de la construcción pET28a INF-RXM. La secuencia Query y la Subject corresponden a las secuencias traducidas que fueron obtenidas por secuenciado de ADN en el IP-Montevideo y en Genscript. La secuencia de aminoácidos de esta última es idéntica a la ordenada.

Habiendo confirmado la integridad de la secuencia de interés en el vector de expresión, procedimos a evaluar diferentes condiciones de expresión y purificación de la proteína recombinante. Esto incluyó distintas cepas de expresión de *E. coli* y vectores de expresión (pET28a y pET32a), diferentes condiciones de inducción (IPTG 0,1, 0,5 y 0,7 mM), y crecimiento post-inducción (18°C, 20°C y 25°C), co-expresión de chaperonas (GroEL/ES), distintos métodos de lisis (ultrasonido y prensa francesa) y medios de cultivo (LB y 2YT)).

En la **Tabla 4** se resumen las diferentes condiciones ensayadas para poner a punto la expresión y purificación de la forma recombinante de INF-RXM. Si bien se realizaron más de 15 pruebas, como resultado de combinar las diferentes condiciones antes mencionadas, solamente se van a detallar en la tesis tres bloques de resultados, ya que en todas las oportunidades se obtuvo el mismo resultado.

Tabla 4. Condiciones de expresión y purificación del biosensor INF-RXM en *E. coli*.

CEPA	Vector de expresión	Temperatura de inducción	Concentración IPTG	Medio	Lisis
BL21 (DE3)	pET28a	18 °C	0,1 mM	LB	Sonicado
BL21 (DE3) + GroEL/ES	pET32a	20 °C	0,5 mM	2 YT	Prensa Francesa
BL21 codon plus	pT7pelB	25 °C	0,7 mM		
Rosetta (DE3)			1 mM		
C41 (DE3, Lucigen)					

Una primera aproximación fue utilizar la cepa de *E. coli* BL21 DE3 transformada con el plásmido pET28a resistente a kanamicina, crecer las bacterias en LB a 37°C hasta OD 0,7 e

inducir la expresión de la proteína recombinante con 0,5 mM IPTG a 20 °C por 16 - 18 h (*overnight*) (**Figura 56 A**).

El análisis por microscopía de epifluorescencia de muestras de cultivo sin inducir e inducidos, confirmó en estas últimas la presencia de bacterias que expresan el biosensor ya que fue posible observar señal fluorescente utilizando los filtros FITC para Clover y Rodamina para rxmRuby2 (**Figura 56 B**). Además, dichas señales co-localizaban lo cual garantizaba la integridad estructural del biosensor expresado por las bacterias. También se pudo inferir la presencia del biosensor en la fracción soluble de extractos celulares ya que el espectro de absorción de fluorescencia mostró dos picos: 503 nm y 560 nm, que se corresponden con los de Clover y rxmRuby2, respectivamente (**Figura 56 C**). Sin embargo, al analizar el espectro de emisión de fluorescencia de esta muestra solo se observa señal correspondiente a Clover (525 nm) y no para rxmRuby2.

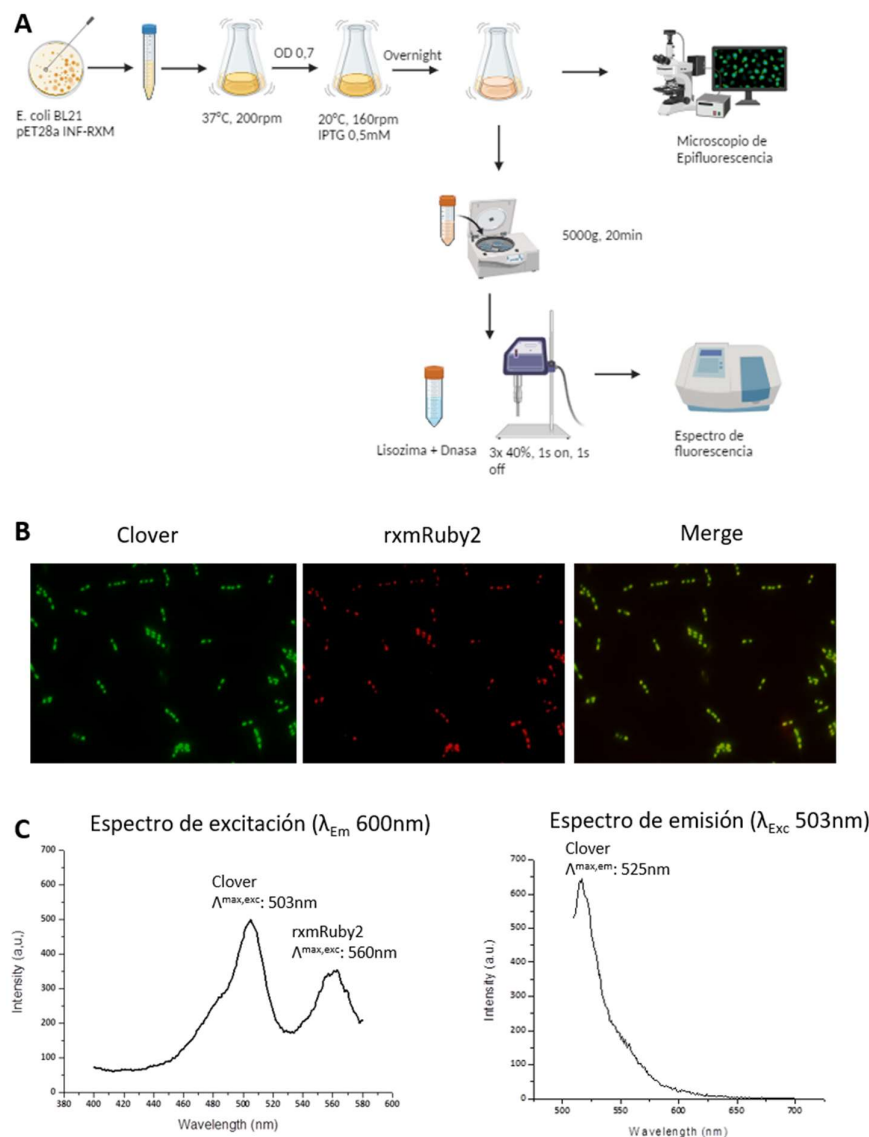


Figura 56. Expresión de INF-RXM en cepa BL21 (DE3) y medio LB. A) Esquema del proceso de expresión y purificación (creado utilizando BioRender). B) Imágenes de epifluorescencia de una muestra del cultivo previo a la cosecha, adquiridas en el microscopio Olympus IX81 con el objetivo de inmersión 100x: Clover (λ_{exc} 470 - 495 nm / λ_{em} 510 - 550 nm) y rxmRuby2 (λ_{exc} 530 - 550 nm / λ_{em} 570 nm). C) Espectro de excitación del sensor FRET (izquierda, λ_{em} 600 nm) y de emisión (derecha, λ_{exc} 503 nm) del extracto de proteína lisado.

Estos resultados fueron algo contradictorios ya que por un lado muestran que el módulo rxmRuby2 es funcional, desde el punto de vista de sus propiedades de fluorescencia, cuando es expresado por *E. coli*, y que retiene la capacidad de absorber luz a 560 nm cuando se lo aísla de la célula, pero que este proceso conlleva una afectación del cromóforo que pierde la capacidad de emitir fluorescencia. Por otro lado, si bien la expresión del biosensor bajo las

condiciones indicadas en la **Figura 56** fue excelente, éste se recuperaba mayoritariamente en la fracción insoluble del extracto celular (ver como referencia **Figura 57**).

Por lo tanto, para evaluar si el proceso de lisis celular impacta negativamente sobre el cromóforo de rxmRuby2 y si era posible incrementar la fracción soluble del biosensor, probamos llevar a cabo la misma incorporando el agregado a baja concentración de Tritón X-100 y de un agente reductor, el DTT. Tritón X-100 es un detergente surfactante no iónico que no sólo permeabiliza membranas sino que desfavorece las interacciones hidrofóbicas entre macromoléculas y por tanto la agregación de proteínas. El agregado de DTT pretende mantener las cisteínas de rxmRuby2 (y las de otras proteínas de *E. coli*) en estado reducido de manera de evitar la formación de hetero-complejos covalentes enlazados por puentes disulfuro que puedan tanto contribuir a la agregación del biosensor y/o a interferir con la emisión de fluorescencia de rxmRuby2.

De las diferentes condiciones de lisis probadas (**Figura 57 A**), solo se destacan la 1 (lisozima + DTT + sonificado) y la 3 (lisozima + DTT + Tritón + sonificado) por dar lugar a un mayor rendimiento de proteínas solubles totales (carriles C de la **Figura 57 B**). Estas dos condiciones se diferencian de las otras tres en que incorporan el tratamiento enzimático (lisozima) para degradar la pared celular. Un barrido espectral de los extractos solubles de estas muestras indica la presencia de los módulos fluorescentes del biosensor principalmente en la muestra 3, en la cual se observa un claro pico de absorción a ~ 505 nm y uno menor y ancho a 560 nm (**Figura 57 C**). Si bien de mucho menor intensidad, la muestra 1 presenta un patrón espectral similar. En el resto de las muestras, la señal de fluorescencia es muy baja y solo se observa un incremento de IF próximo a los 510 nm. Al realizar el barrido espectral de emisión de fluorescencia (λ_{exc} 503 nm), en todas las muestras se observa un pico de emisión a 516 nm, el cual satura el detector para la muestra 3, correspondiente a la Clover, pero no un máximo a 600 nm que correspondería a la rxmRuby2. Dada la buena señal de fluorescencia presente en la muestra 3, se ensayó de manera preliminar la capacidad del biosensor recombinante por realizar FRET frente a la exposición a AMPc (250 μ M) y en presencia de agente reductor (DTT 1 mM) para asegurar máxima capacidad de absorción de fluorescencia por la rxmRuby2 (**Figura 57 D**). El espectro de emisión muestra un marcado apagado de la señal de Clover solo cuando AMPc está presente, lo cual sugiere que ha tenido lugar el fenómeno de FRET ya que la fluorescencia emitida por Clover fue capturada eficientemente por la rxmRuby2. Si bien estos resultados son promisorios respecto a la funcionalidad del biosensor con el ligando nucleotídico, aún persiste la imposibilidad de detectar la fluorescencia emitida por rxmRuby2, lo cual impediría uso como biosensor redox.

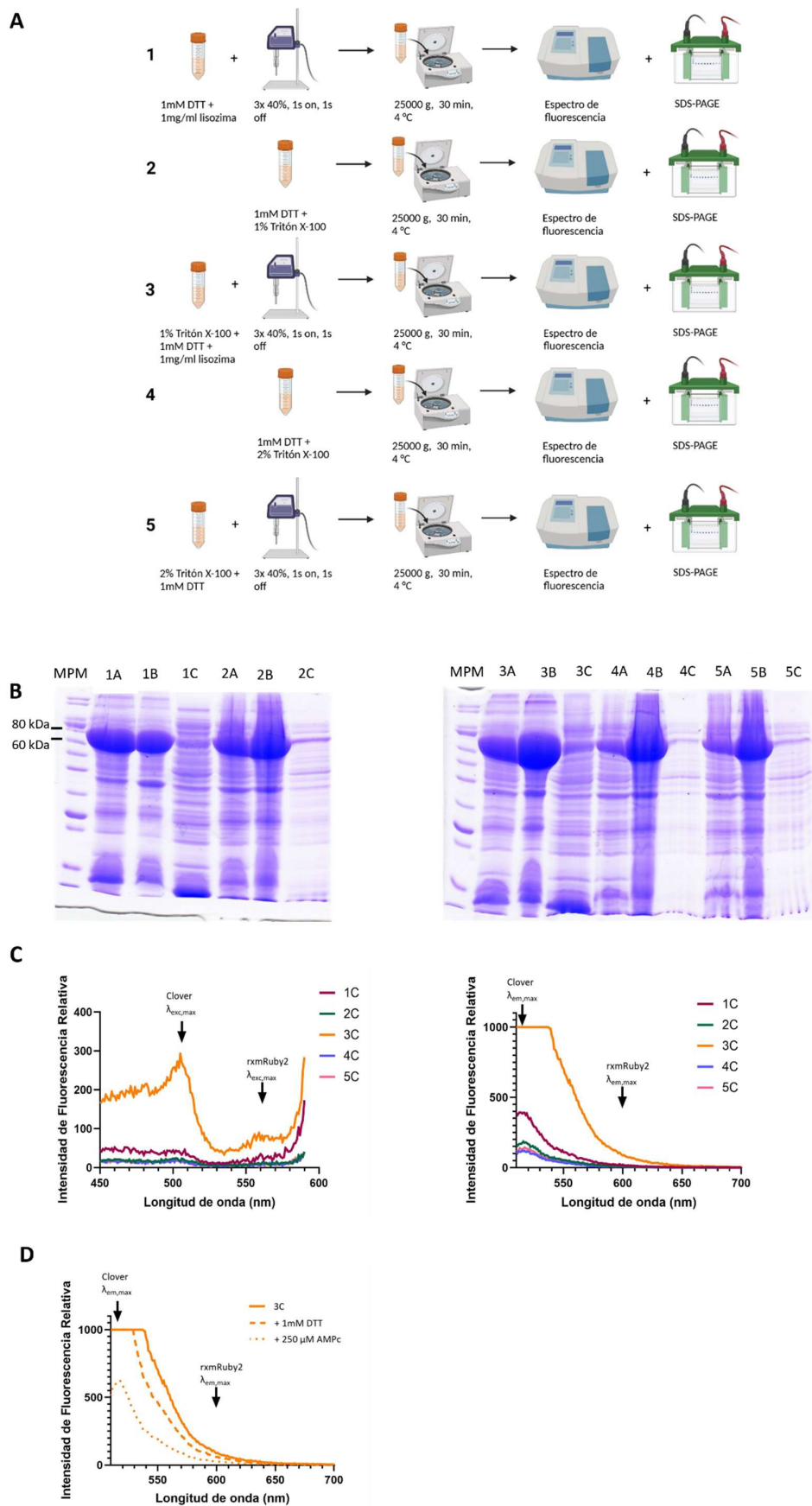


Figura 57. Estrategias de lisis celular y purificación de INF-RXM por IMAC. A) Esquema de las diferentes condiciones (1 a 5) de preparación de extractos de bacterias para aislamiento de biosensor recombinante (creado utilizando BioRender). B) Gel SDS-PAGE 10% de las fracciones A (post-lisis), B (pellet) y C (sobrenadante) para cada una de las condiciones de lisis. C) Espectro de excitación (izquierda, λ_{em} 600 nm) y emisión (derecha, λ_{exc} 503 nm) de las muestras. D) Espectro de emisión (λ_{exc} 503 nm) de la muestra 3 no tratada (línea sólida), o incubada 10 min con DTT (1 mM; línea rayada) o DTT y AMPc (250 μ M; línea punteada).

En el segundo conjunto de experimentos decidimos explorar otras variables que podrían mejorar tanto la expresión como la integridad estructural de la forma soluble del biosensor. Por un lado y de manera similar a lo aplicado durante el proceso de purificación de rxCUTie2, optamos por sustituir el método de lisis por ultrasonido por el de la prensa francesa ante la eventualidad que el primero estuviera desnaturalizando parcialmente a la proteína biosensora.

Por otro lado, exploramos sistemas de co-expresión de chaperonas del tipo GroEL/ES que favorecerían el plegamiento de proteínas insolubles. Las chaperonas son proteínas que se unen a la cadena de polipéptido saliente del ribosoma, asisten al correcto plegamiento de la estructura nativa de la proteína blanco y de esa forma evitan su agregación por mal plegamiento. *E. coli* cuenta con dos sistemas de chaperonas, el GroES (HSP60) - GroEL y el DnaK (HSP70) / DnaJ / GrpE. Son numerosos los reportes que muestran la mejoría en la producción de diferentes proteínas solubles mediante la co-expresión de chaperonas (Saibil, 2013). La sobreproducción de proteínas recombinantes heterólogas está frecuentemente asociada con su mal plegamiento y agregación (De Marco, 2007). En otros casos, la agregación de proteínas durante su síntesis, lo cual da lugar a los cuerpos de inclusión, puede ocurrir como un mecanismo intrínseco para contrarrestar la toxicidad de una proteína o evitar su proteólisis. Los problemas de plegamiento pueden deberse a una limitada capacidad de las chaperonas de las células huésped a asistir ese proceso demandante. En el trabajo de (De Marco, 2007), se proponen cinco diferentes combinaciones de plásmidos para sobre-expresar de manera controlada las chaperonas en *E. coli* bajo inducción por IPTG. En este contexto se seleccionó el plásmido pBB542 (combinación 4) que sobre-expresa KJE, ClpB y ELS en grandes cantidades, el mismo fue adquirido de AddGene.

Además, dentro de la misma estrategia, se evaluó la posibilidad de realizar una inducción endógena de chaperonas en la bacteria sometiénola a un shock térmico, ya reportado por (Arsene, 2000) y (Yura, 2019). También decidimos incluir como huésped de expresión a la cepa BL21 C3010 que fue ingenierizada para ser deficiente en proteasas y para evitar la expresión basal (es decir no inducidas) de secuencias ectópicas que se hayan bajo el control de expresión

de un promotor de T7. Se ha reportado que de esta forma se logran evitar potenciales efectos tóxicos de proteínas exógenas (New England Biolabs).

Una tercera variable que exploramos fue la velocidad de agitación. Una etapa crítica en la síntesis de la mayoría de las proteínas fluorescentes es la maduración de su cromóforo. Este proceso suele ocurrir post-traduccionamente e implica una secuencia de reacciones autocatalizadas que incluye una etapa de plegamiento ($t_{1/2} \sim 10$ min), una etapa de ciclación y deshidratación ($t_{1/2} \sim 3$ min) y finalmente una etapa de oxidación aeróbica ($t_{1/2} \sim 19 - 83$ min) (Tsien, 1998) de los tres residuos que forman parte del cromóforo. Completado este proceso la proteína es capaz de absorber y emitir fluorescencia. La cinética de maduración es muy variable para diferentes proteínas fluorescentes (Iizuka, 2011), (Balleza, 2017), se ha visto que factores externos como la temperatura, el pH, o la especie de bacteria seleccionada para expresar la proteína fluorescente pueden afectarla (Hebisch, 2013).

En vista de esta diversidad, si comparamos los datos reportados para las proteínas fluorescentes que componen el biosensor IFN-RXM podemos notar que el tiempo de maduración media (t_{50}) es de 22 minutos para Clover y de 130 minutos para mRuby3 (Balleza, 2017). Estimamos que la rxmRuby2 posee un tiempo similar de maduración que la mRuby3, más teniendo en cuenta que para otras proteínas fluorescentes con corrimiento al rojo, como mCherry (Hebisch, 2013) o DsRed (Shaner, 2004), también se reportan t_{50} mayores a 70 minutos. A pesar de que poco se conoce sobre el mecanismo detrás de las diferentes cinéticas de maduración, se intuye que en el entorno de aminoácidos que rodean al cromóforo tienen un rol clave en la maduración del mismo. La proteína mRuby2, al igual que la GFP inicia el proceso de maduración con una reacción de ciclación, sin embargo, requiere de más reacciones en comparación a la maduración de la GFP (Lam, 2012). Por otro lado, se ha visto que la maduración de mCherry es fuertemente dependiente de la disponibilidad de oxígeno (Hebisch, 2013). Si esto también fuera trasladable a la rxmRuby2, en condiciones de alto nivel de expresión de la proteína recombinante, el oxígeno podría tornarse el cuello de botella afectando o retrasando la maduración del cromóforo. Teniendo esto en cuenta, decidimos incrementar la velocidad de agitación de 160 (**Figura 56 A**) a 200 rpm (**Figura 58 A**) durante la etapa de inducción de la expresión.

Por otro lado, recientemente se reportaron condiciones de expresión en *E. coli* para un biosensor basado en el par ECFP-mCitrine para detectar niveles de glucosa, que fue caracterizado in vitro y luego empleado como reportero en *Trypanosoma brucei* (Voyton, 2018). El sistema de expresión incluye al vector pRSET y bacterias BL21 (DE3), mientras que el

protocolo de producción se realiza en medio LB con crecimiento a 30°C hasta densidad óptica de 0,6 seguido de inducción con 0,7 mM IPTG a 18°C por 24 h. La lisis se realiza con prensa francesa y la purificación por IMAC. Considerando esas evidencias satisfactorias, decidimos replicar dichas condiciones para la expresión de IFN-RXM.

A manera de resumen y como se esquematiza en la **Figura 58 A**, empleamos como huésped de expresión *E. coli* BL21 C3010 (T7 express LysY; NEB) y BL21 (DE3) pBB542 (Addgene; co-expresa GroEL/GroES, DnaK/DnaJ), medio de cultivo LB, y temperatura de crecimiento exponencial de las bacterias de 30°C, y no 37°C como se venía utilizando, hasta alcanzar una OD de 0,4 (aprox. 3 - 4 h) para luego inducir la expresión con 0,7 mM IPTG durante 20 h a 18°C. Las células se lisaron por prensa francesa y la proteína fue purificada por IMAC.

Con estas cepas y protocolo de expresión se pudo obtener una banda de 70 kDa (compatible con el peso molecular de IFN-RXM = 72 kDa) en la fracción final de elución de la cromatografía de afinidad (Eluido 3, pureza $\geq 85\%$, **Figura 58 B**), que al ser analizada por espectrofluorimetría mostró los picos de excitación y emisión de Clover y solo uno de excitación significativamente menor que corresponde a rxmRuby2 (**Figura 58 C**).

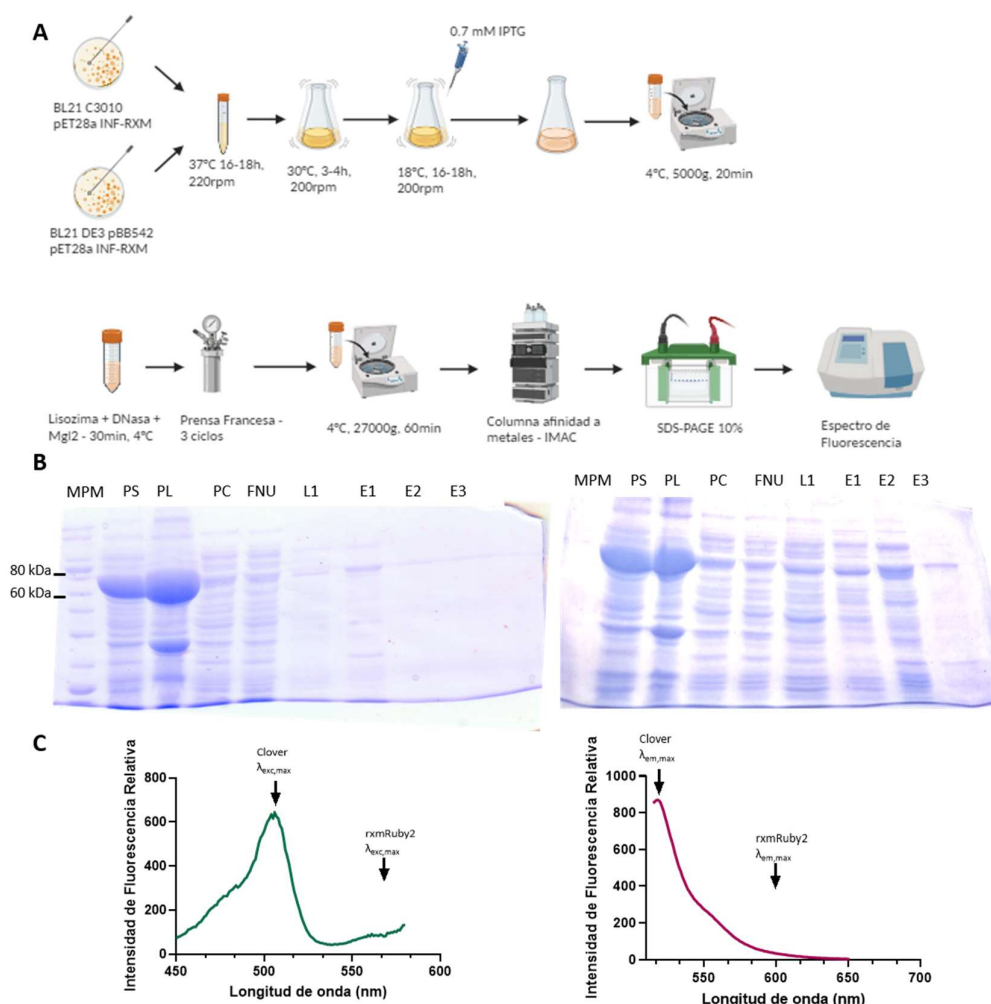


Figura 58. Expresión y purificación de IFN-RXM a partir de cepas de *E. coli* BL21 C3010 y pBB5442. A) Esquema de los protocolos de expresión y purificación utilizados (creado en Biorender). B) Gel SDS-PAGE 10% correspondiente a muestras de sistema de expresión BL21 C3010/pET28a INF-RXM (izquierda) y BL21 pBB542/pET28a INF-RXM (derecha). MPM (marcador de peso molecular), PS (post-sonicado), PL (pellet), PC (pre-columna), FNU (Fracción no unida), L1 (Lavado 1), E1-E3 (Eluido 1-3). C) Espectro de excitación (izquierda, λ_{em} 600 nm) y emisión (derecha, λ_{exc} 505 nm) representativo de IFN-RXM expresado y purificado en la cepa BL21 pBB542.

Finalmente, el tercer experimento consistió en evaluar la expresión de IFN-RXM en la cepa de bacterias C41 (DE3; OverExpress® de Lucigen). Las bacterias C41 (DE3) OverExpress® derivan de la cepa BL21 (DE3), la cual posee una mutación que reduce el nivel de actividad de la T7 ARN Polimerasa, previniendo la muerte celular asociada a la sobreexpresión de diferentes proteínas recombinantes tóxicas. Además, la cepa C41 contiene otras mutaciones genéticas que fueron seleccionadas fenotípicamente para proveer tolerancia a proteínas tóxicas (Miroux, 2004) (Studier, 2005) (Dumon-Seignovert, 2004). Esta cepa permitió la expresión eficiente de

proteínas tóxicas de distintas clases de organismos (ej. bacteria, levadura, plantas, virus y mamíferos; (Biosearch technologies)). Al igual que la cepa BL21 (DE3), la C41 (DE3) es un lisógeno de λ DE3, que porta una copia cromosomal del gen de la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor lacUV5. Por ende, para expresar genes heterólogos se deben emplear vectores donde la secuencia génica de interés esté corriente abajo de un promotor de T7. Es importante mencionar que el nivel de expresión esperable utilizando la cepa OverExpress® puede llegar a ser menor que el alcanzado en la cepa BL21 (DE3).

Luego de transformar las bacterias quimiocompetentes, se emplearon las condiciones de crecimiento e inducción indicadas en la **Figura 59 A**. Una muestra de la suspensión de bacterias previo al paso de lisis fue analizada al microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81, 100x) pudiéndose observar fluorescencia de Clover y rxmRuby2, con un buen grado de solapamiento (**Figura 59 B**). El espectro de fluorescencia de la fracción soluble del extracto celular clarificado por centrifugación mostró los picos de excitación y emisión correspondientes a la Clover, y solo el de absorción de la rxmRuby2 (**Figura 59 C**). Con el fin de descartar que la ausencia del pico de emisión de rxmRuby2 se debiera a la oxidación de la proteína, lo cual disminuye su intensidad de fluorescencia (**Figura 32**), la muestra fue incubada con 2 mM de DTT durante 5 y 10 minutos. Como se observa en el panel derecho de la **Figura 59 C**, no se observa la aparición de un pico de emisión en la región de los 600 nm en la muestra con agente reductor.

Un estudio detallado sobre la maduración de Clover-mRuby2 realizado por (Fussell, 2018) destacó que mRuby2 es el factor limitante en la maduración de este par FRET. La proteína mRuby2 requiere de al menos 6 horas para madurar por completo a 30°C. Esto se verificó mediante el incremento temporal de la intensidad de fluorescencia de mRuby2 (λ_{em} 595 nm) tanto excitando directamente a esta proteína (λ_{exc} 559 nm) o Clover (λ_{exc} 505 nm) y midiendo el FRET.

Sin embargo, mRuby2 es altamente sensible al calor iniciando su autodegradación luego de 10 h a 30°C. También encontró que la maduración de mRuby2 muestra un comportamiento errático

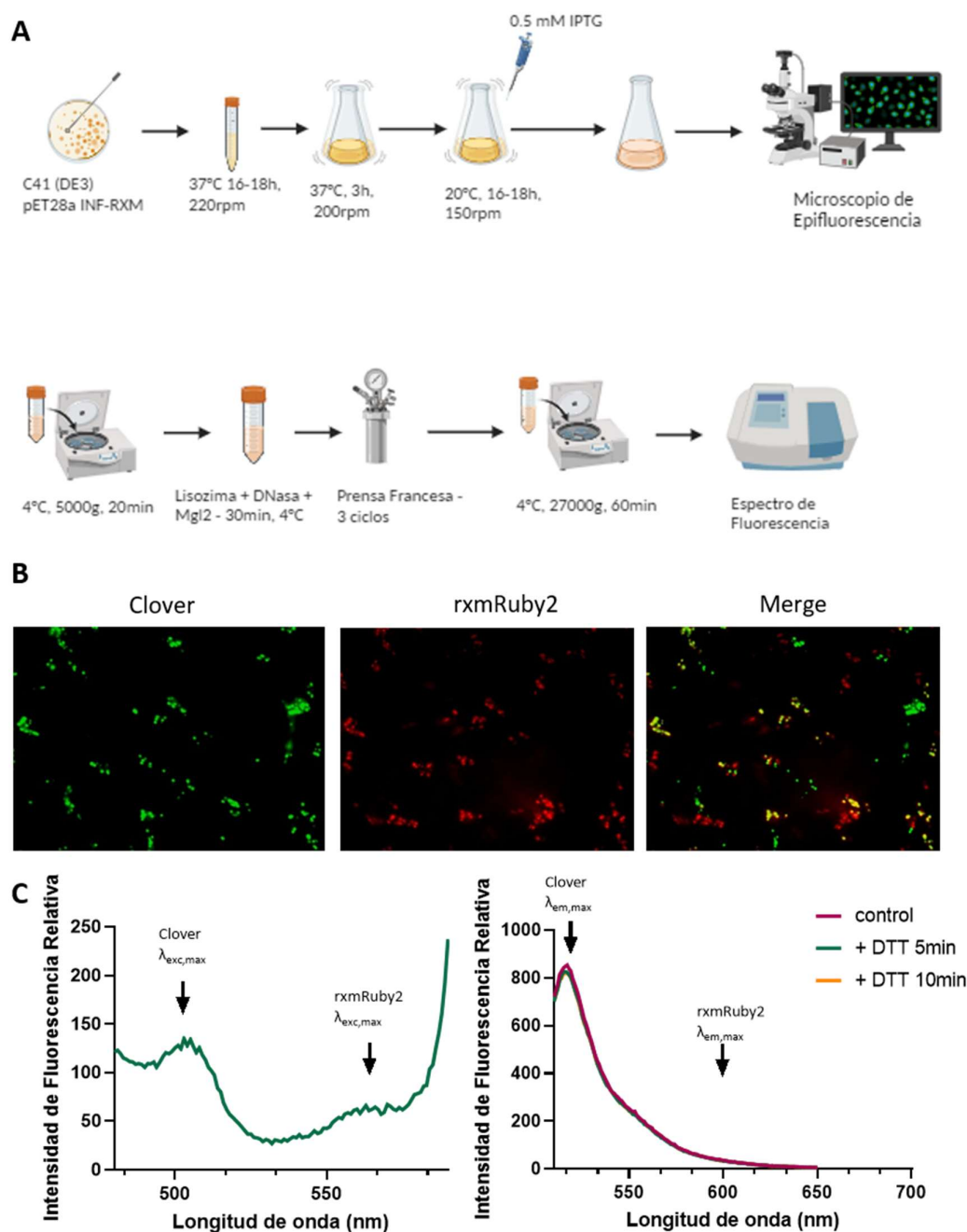


Figura 59. Experimento 3 de expresión del sensor dual INF-RXM. A) Esquema del proceso de expresión y purificación (creado utilizando BioRender). B) Imágenes de epifluorescencia de una muestra del cultivo previo a la cosecha, adquiridas en el microscopio Olympus IX81 con el objetivo de inmersión 100x: Clover (λ_{exc} 470-495 nm / λ_{em} 510-550 nm) y rxmRuby2 (λ_{exc} 530-550 nm / λ_{em} 570 nm). C) Espectro de excitación del sensor FRET (izquierda, λ_{em} 600 nm) y de emisión (derecha, λ_{exc} 505 nm) del extracto de proteína lisado y clarificado.

e impredecible a concentraciones de sales ≥ 12 mM NaCl (Fussell, 2018).

Nuestros resultados no sugieren problemas de maduración del cromóforo de la rxmRuby2 tanto en su forma libre (**Figura 32**) o como parte integral de IFN-RXM (**Figura 56B y 59B**), ya que bajo diferentes condiciones de expresión logramos observar su fluorescencia en muestras de bacterias intactas, en el último caso, co-localizando con la señal de Clover. Además, por espectrofluorimetría pudimos comprobar que el cromóforo de rxmRuby2 de IFN-RXM tiene capacidad de absorber fluorescencia en la longitud de onda esperada sea que por excitación directa de su cromóforo (**Figura 56 C, 57 C, 58 C y 59 C**) o por FRET luego de excitar a Clover (**Figura 57 D**). Por otro lado, para la extracción y purificación de rxmRuby2 empleamos altas concentraciones de NaCl (300 mM) sin que esto tuviera un efecto aparente negativo en la recuperación de proteína funcional (ver sección **3.3.1**). Por lo tanto, en principio, podríamos descartar estos factores como principales causas del apantallamiento de emisión de fluorescencia de rxmRuby2 observado cuando IFN-RXM se extrae y purifica de las bacterias. Sin embargo, un factor limitante en la producción del biosensor común a todas las aproximaciones antes ensayadas es el muy bajo rendimiento de proteína recombinante soluble, obteniéndose de manera sistemática una gran cantidad de la misma en la fracción insoluble, como cuerpos de inclusión.

Con la finalidad de mejorar ese condicionante, estudiamos la expresión de IFN-RXM a partir de los vectores pET32a (+) (Novagen) y pT7pelB (Ortega, 2018). El primero de ellos, permite la expresión del gen de interés como fusión a la proteína tiorredoxina de *E. coli*. Esta es una proteína de bajo peso molecular (109 aminoácidos) y altamente soluble que se puede expresar en muy altos niveles y facilita la solubilización de proteínas que formen parte del mismo polipéptido (Correa, 2015). El vector pT7pelB desarrollado por (Ortega, 2018) dirige la expresión de la proteína de interés al periplasma bacteriano, el cual es un ambiente oxidativo que favorece la formación e isomerización de disulfuros mediado por enzimas especializadas (Berkmen, 2012). Para lograr esto, el vector posee una secuencia líder de 22 aminoácidos, pelB, correspondiente al extremo N-terminal de la proteína pectato liasa B de *Erwinia carotovora* CE (Lei, 1987) que durante la translocación de la proteína al periplasma es removida por una peptidasa. La purificación de las proteínas del periplasma es más sencillo que a partir del citosol bacteriano, por el menor contenido de proteínas que existe en el primer compartimento (Ortega, 2018).

La secuencia codificante para INF-RXM fue insertada en estos vectores mediante una técnica que no emplea enzimas de restricción o RFC (del inglés *Restriction free cloning*, (Unger, 2010).

Brevemente, los cebadores se diseñaron de acuerdo con (Unger, 2010), se optimizaron los parámetros para la primera reacción de PCR y los megacebadores obtenidos se purificaron (**Figura 60 A**) y emplearon en la segunda reacción de PCR. El ADN obtenido de esta última PCR fue digerido con DpnI para eliminar el ADN parental y empleado para transformar bacterias competentes XL1 o DH5. El ADN plasmídico obtenido de estas bacterias fue digerido con enzimas de restricción y visualizado en gel de agarosa para confirmar la inserción de la secuencia de interés.

La construcción pET32a (+) - INF-RXM fue obtenida de manera exitosa confirmándose la presencia del inserto (banda 2000 pb) en 5 colonias luego de la digestión con BamHI (**Figura 60 B**).

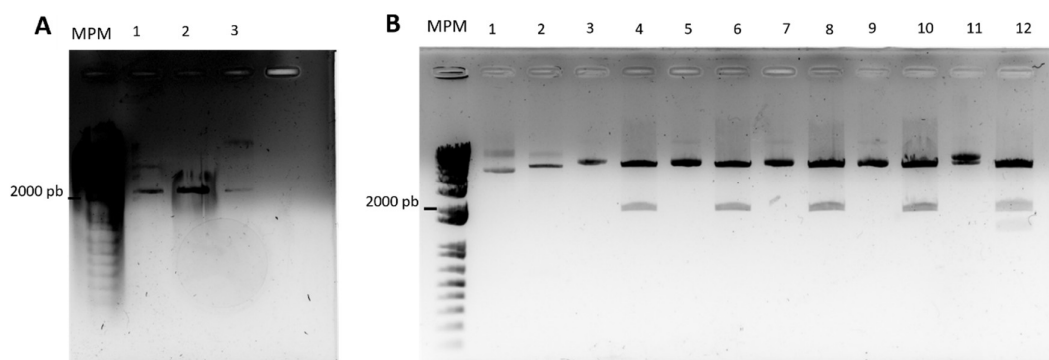


Figura 60. Generación de la construcción pET32a(+) - INF-RXM. Geles de agarosa al 0,8% correspondientes a: A) mega-cebador purificado de la primera reacción de PCR obtenido empleando temperaturas de hibridación de 66, 68, 70 y 72 °C y 10^{-4} moléculas de ADN (carril 1) o 10^{-5} moléculas de ADN (carril 2) del ADN molde. Carril 3: ADN molde utilizado en la primera PCR (pTCINDEX INF-RXM) digerido con BamHI (90 min a 37°C), se observa banda de 2000 pb (inserto) y esqueleto del vector (5900 pb). MPM (marcador de peso molecular 1kb). B) ADN plasmídico extraído de 5 colonias de bacterias XL1 transformadas con el producto de la segunda PCR. MPM (marcador de peso molecular 1kb); carril 1 y 2: vector vacío; carril 3 y 4: colonia 1; carril 5 y 6: colonia 2; carril 7 y 8: colonia 3; carril 9 y 10: colonia 4; carril 11 y 12: colonia 5. Los carriles con números impares corresponden a muestras sin digerir y los pares a las mismas muestras digeridas con BamHI (90 min a 37°C).

Con este plásmido se transformaron las cepas de expresión de *E. coli*: BL21 (DE3), Rosetta (DE3) y BL21 codon plus. Se evaluaron diferentes condiciones de expresión (temperatura de escalado, concentración de IPTG, temperatura de inducción). En todos los casos el biosensor se expresó en muy buenos niveles pero principalmente cuerpos de inclusión, siendo la cantidad del mismo en la fracción soluble (**Figura 61 A-E**) similar a la obtenida con los sistemas explorados anteriormente. En una oportunidad (**Figura 61 E**) una pequeña porción soluble de

la proteína fue evaluada por fluorimetría (**Figura 61 F**), dónde se obtuvo un perfil espectral similar a los observados anteriormente (**Figura 56 a 59**).

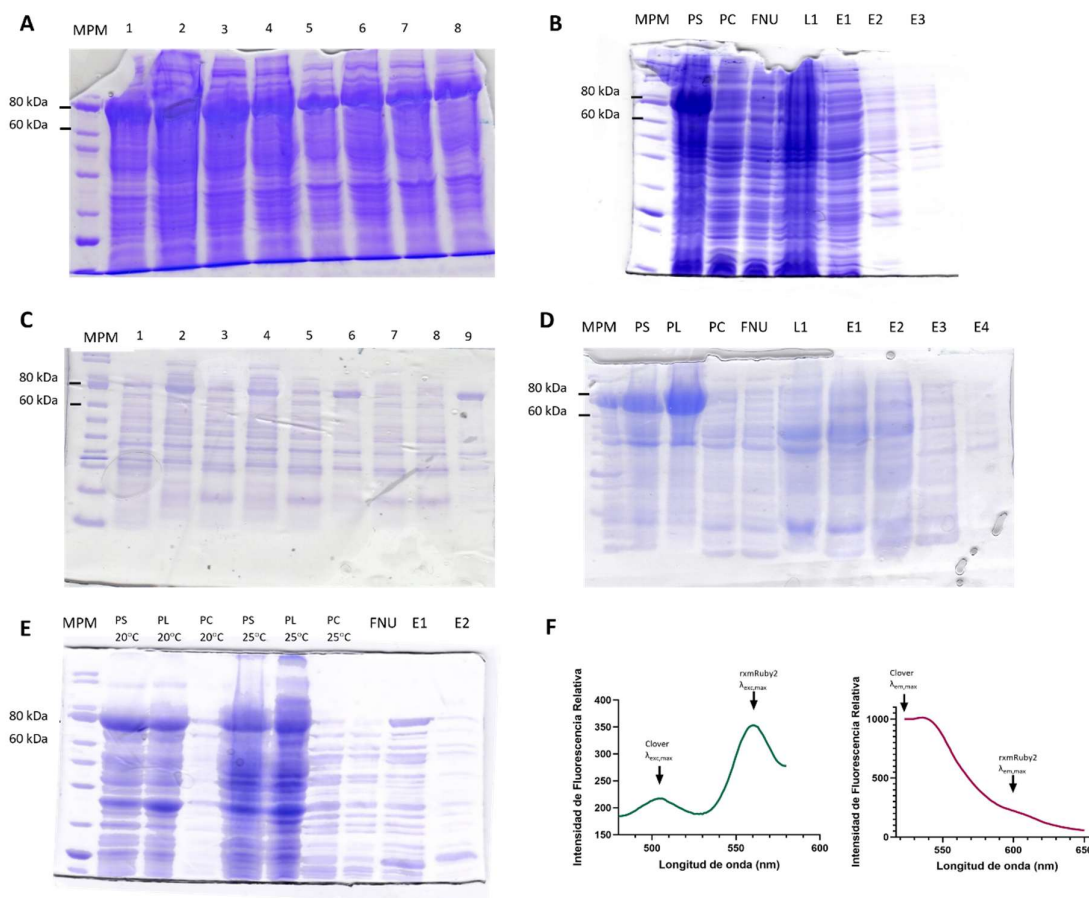


Figura 61. Expresión y purificación de IFN-RXM a partir del vector pET32a(+). Geles SDS-PAGE 10 % correspondientes a: A) muestras de bacterias BL21 (DE3) inducidas con 0,5 mM IPTG a 20 °C (carril 1 y 3) y 30 °C (carril 2 y 4); los carriles 1 y 2 corresponde a la colonia 2, y el 3 y 4 a la colonia 4; B) purificación por IMAC de extracto de bacterias BL21(DE3) inducidas con 0,5 mM IPTG por 16-18 h a 20 °C. PS (post-sonicado), PC (pre-columna), FNU (Fracción no unida), L1 (Lavado 1), E1-E3 (Eluido 1-3); C) bacterias BL21 codon plus sin inducir (carril 1) o crecidas a 18 °C por 16-18 h con 0,1 mM IPTG (carril 2: pellet y carril 3: sobrenadante) o 1 mM IPTG (carril 4: pellet y carril 5: sobrenadante), o bien crecidas a 25 °C por 16 - 18 horas con 0,1 mM IPTG (carril 6: pellet y carril 7: sobrenadante) o con 1 mM IPTG (carril 8: sobrenadante y carril 9: pellet); D) purificación por IMAC de extracto de bacterias Rosetta (DE3) inducidas con 0,5 mM IPTG por 16 - 18 horas a 20 °C. MPM (marcador de peso molecular), PS (post-sonicado), PL (pellet), PC (pre-columna), FNU (Fracción no unida), L1 (Lavado 1), E1 - E4 (Eluido 1-4); E) purificación por IMAC de extracto de bacterias BL21 (DE3) inducidas a 20 °C o 25 °C. MPM (marcador de peso molecular); PS 20 °C / PL 20 °C / PC 20 °C: muestra de post-sonicado, pellet y pre-columna de bacterias crecidas e inducidas a 20 °C con 0,2 mM IPTG 16 - 18 h, respectivamente; PS 25 °C / PL 25 °C / PC 25 °C: muestra de post-sonicado, pellet y pre-columna de bacterias crecidas e inducidas a 25 °C con 0,2

mM IPTG 16 - 18 horas, respectivamente; FNU (fracción no unida); E1 - E2 (Eluido 1 y 2). En todos los casos MPM refiere al marcador de peso molecular. F) Espectro excitación (izquierda, λ_{em} 600 nm) y espectro de emisión (derecha, λ_{exc} 503 nm) de la fracción Eluido 1 (E1) del panel E.

Mientras que para la construcción pT7pelB INF-RXM se logró obtener los megacebadores y obtener colonias XL1 transformadas con el ADN proveniente del producto de la segunda PCR (al igual que **Figura 60**), no se logró obtener colonias de bacterias BL21 (DE3) transformadas con el plásmido extraído de las bacterias XL1.

Una alternativa que quedó sin explorar en este trabajo de tesis de doctorado es la purificación y re-naturalización del sensor dual a partir de los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión recuperados del lisado celular por centrifugación a baja velocidad pueden presentar un gran contenido de proteínas contaminantes provenientes de componentes de la pared celular y de la membrana externa. Estos contaminantes pueden ser removidos mediante lavados por centrifugación con bajas concentraciones de detergentes o agentes caotrópicos como la Urea o el cloruro de guanidinio. Estos tratamientos mejoran significativamente la pureza de la proteína recombinante, pudiéndose obtener un 60 – 70% del pellet enriquecido en la proteína de interés. Sin embargo, el desafío de trabajar con cuerpos de inclusión no radica en el paso de purificación de la proteína recombinante sino tener éxito en las etapas de solubilización y renaturalización para obtener una proteína biológicamente activa (Correa, 2015); (Palmer, 2004); (Cabrita, 2004). Existen en la bibliografía diversos protocolos de purificación de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión que se podrían haber evaluado con el fin de mejorar la cantidad del sensor dual recombinante en estado soluble. (Palmer, 2004).

Si bien la falta de emisión de fluorescencia de la rxmRuby2 en la forma recombinante y purificada de células procariotas de INF-RXM nos impidió abordar su caracterización funcional *in vitro*, el hecho de haber observado señal de esa proteína fluorescente en células intactas nos estimuló a seguir adelante con la generación de líneas reporteras de células eucariotas y proceder a la caracterización *in cellula* del biosensor.

4.3.3 Generación de líneas celulares de *Trypanosoma cruzi*, y de *Leishmania tarentolae* reporteras del biosensor Clover-AMPC-rxmRuby2.

Las especies de tripanosomátidos sobre las cuales generar líneas reporteras con IFN-RXM fueron seleccionadas por los motivos que se comentan a continuación. *T. cruzi* es un patógeno humano, y *L. tarentolae* de animales domésticos (perros), de gran relevancia sanitaria. Consideramos de suma relevancia poder comprender los mecanismos de señalización por nucleótidos cíclicos y redox de estos patógenos en su interacción con el medio ambiente y el hospedero mamífero no solo para comprender la biología de los mismos y la fisiopatología de la infección sino también para guiar la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas contra las enfermedades que ellos producen. *L. tarentolae* es un organismo eucariota modelo, no patógeno para humanos inmunocompetentes, que en los últimos años ha ganado interés como sistema robusto y económico para la producción de altos niveles de proteínas recombinantes complejas por su organización estructural o patrón de glicosilación ((Basile, 2009); (Abreu, 2024); (Oliveira, 2019); (Doukas, 2019) (Taheri, 2016)). Por lo tanto, esta especie nos ofrecería adicionalmente la posibilidad de poder obtener la forma recombinante de IFN-RXM en caso los rendimientos de expresión sean aceptables.

En primer lugar, se procedió a electroporar *T. cruzi* (cepa CL Brenner) con el vector pTcINDEX-IFN-RXM lográndose seleccionar una población clonal resistente al antibiótico de selección higromicina. Los parásitos pudieron ser subcultivados por un tiempo prolongado (2 meses) con agente de selección, indicando que el gen había sido integrado en su genoma mientras que el control sin transfectar y el transfectado con PBS sucumbieron a la higromicina (200 µg/mL). El análisis de la población resistente al antibiótico se realizó por citometría de flujo (**Figura 62 A**) y microscopía confocal (**Figura 62 B**). La primera técnica de análisis mostró que aproximadamente solo un 1% de las células expresan la proteína Clover mientras que fue insignificante la subpoblación de parásitos doble positivos a señal Clover y rxmRuby2, representando ésta solo un 0,2 - 0,3% de eventos (Q2, **Figura 62 A**). Realizar un enriquecimiento de esta subpoblación hubiera implicado escalar los cultivos celulares a volúmenes de varios litros y aplicado varias rondas de FACS (del inglés *fluorescence-activated cell sorting*) de tiempo prolongado (por el bajo porcentaje de células de interés). Además las chances de haber obtenido un buen número de parásitos doble positivos viables hubiesen sido bajas porque durante ese proceso (fluctuaciones de presión: 20 - 70 psi) las células están sometidas a estrés mecánico que puede provocar daño irreversible. Sumado a esto, la proliferación de la forma epimastigota de *T. cruzi* (sobre la cual se realizan los procedimientos de manipulación genética por su sencillez para cultivarla y baja infectividad) es altamente dependiente de la densidad celular del cultivo, siendo muy baja su tasa de recuperación de la proliferación a densidades de $< 10^6$ células/ml. Tomando los datos obtenidos en la **Figura 62 A**,

de un cultivo de 1×10^7 células, solamente 20.000 expresan ambas proteínas fluorescentes, para poder obtener una población enriquecida en rxmRuby2/Clover de al menos 1.000.000 células, se debería partir de un cultivo con 5×10^8 parásitos. Nuestra experiencia indica que aun así la probabilidad de lograr una población enriquecida viable hubiese sido baja ya que durante (Sardi, 2016) realizamos un enriquecimiento por FACS de una población que representaba el 50% de los eventos de interés (biosensor hGrx-roGFP2), y no fue posible recuperar parásitos viables, si bien a las 24 horas *post-sorting* se observaban células en buen estado, al cabo de una semana este cultivo no proliferó.

La segunda técnica de análisis mostró parásitos que expresan la proteína Clover pero que tienen una muy baja expresión de la proteína rxmRuby2, similar a los resultados observados por FACS (Figura 62 A).

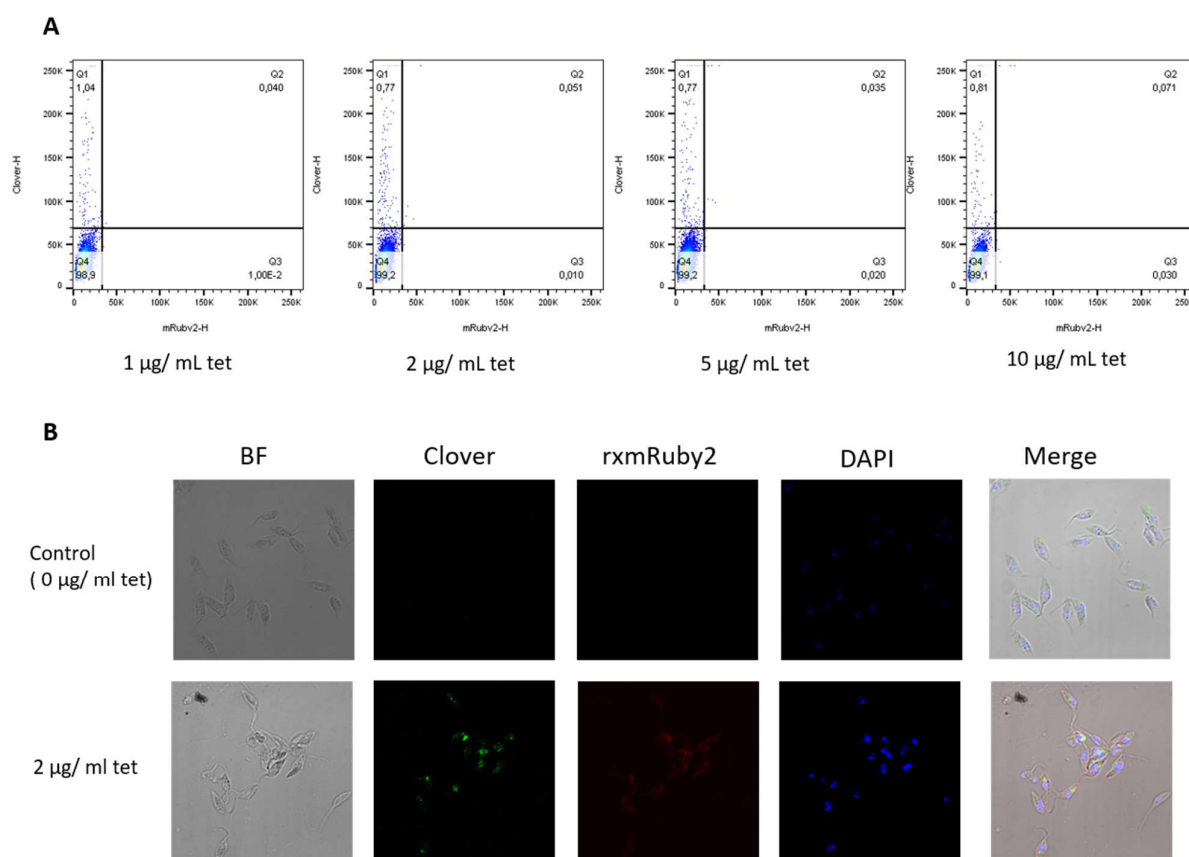


Figura 62. Evaluación de la expresión del biosensor IFN-RXM en *T. cruzi* CL Brener. A) Gráficos Dot plot de parásitos expuestos a 0, 2,5 y 10 µg/ml de tetraciclina y analizados en citómetro BD FUSION. **B)** Imágenes de fluorescencia de parásitos no inducidos (panel superior) o inducidos (panel inferior) adquiridas en microscopio confocal ZEISS LSM 880 con lente de inmersión en aceite de 63x. BF: imagen

de campo claro; Clover: láser y filtro con $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 488 / 510 - 550 nm; rxmRuby2: láser y filtro con $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 561 / LP 615; DAPI: láser y filtro con $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 355 / 455 - 500 nm.

L. tarentolae (cepa LEXSY-Host-P10) fue electroporada con el vector pLEXSYHyg2-IFN-RXM, cuya generación fue ordenada a la empresa Genscript. Este vector permite la integración del gen de interés en el locus 18S ARNr (ssu) mediante recombinación homóloga y presenta el gen de la higromicina fosfotransferasa. Se obtuvieron 36 colonias distribuidas en 6 placas de agar BHI, las cuales fueron transferidas a una placa de cultivo de 24 pocillos con medio de cultivo líquido BHI suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina y, luego de alcanzada una buena densidad celular, analizados por citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia (**Figura 63**).

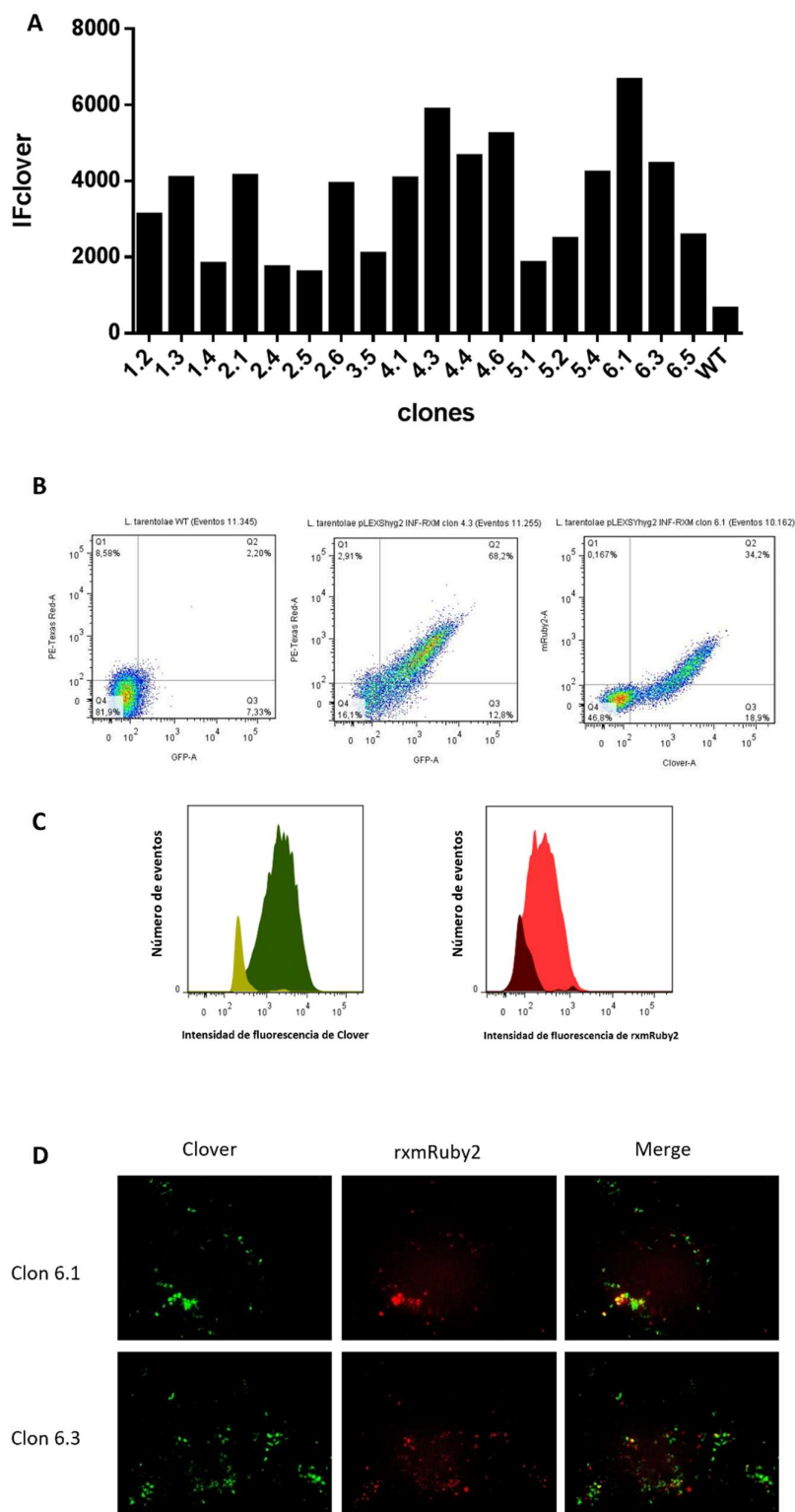


Figura 63. Evaluación de la expresión de IFN-RXM en *L. tarentolae*. A) Gráfica de barras de intensidad de fluorescencia (IF) Clover de 18 clones obtenidos por citometría de flujo en el C6 Accuri. B) Gráficos *Dot plot* de la IF rxmRuby2 (PE-Texas red) vs IF Clover (GFP) adquiridos por citometría de flujo en el BD FUSION para la cepa no transfectada (WT) y, a modo representativo, los clones 4.3 y 6.1. C) Gráficos de

histograma de la IF Clover vs número de eventos (derecha) y de la IF rxmRuby2 vs número de eventos (izquierda) para el clon 4.3 (verde oscuro y rojo claro) y para la cepa WT (verde claro y rojo oscuro), respectivamente. D) Imágenes de epifluorescencia de un par de clones representativos (clon 6.1 y 6.3) adquiridas en el microscopio Olympus IX81 con objetivo de inmersión 100x: Clover (λ_{exc} 470 - 495 nm / λ_{em} 510 - 550 nm) y rxmRuby2 (λ_{exc} 530 - 550 nm / λ_{em} 570 nm).

Todos los clones analizados mostraron señal de fluorescencia para Clover en niveles 4 a 10 veces superiores al de autofluorescencia de la línea celular parental (no transfectada; **Figura 63 A**). Además empleando un citómetro y microscopio equipados con fuentes de luz y juegos de filtros que solapan el espectro de excitación y emisión de fluorescencia de rxmRuby2 fue posible detectar la señal de esta proteína fluorescente en todos estos clones. En la **Figura 63 B, C y D** se muestran los resultados obtenidos para un par de clones representativos.

4.3.4 Caracterización biológica de la línea reportera de *L. tarentolae* INF-RXM.

El estudio funcional de la línea reportera IFN-RXM de *L. tarentolae* tuvo dos etapas. La primera consistió en una caracterización preliminar de la respuesta frente a estímulos redox y de producción de AMPc (realizada sobre 4 clones: 4.3, 5.4, 6.1 y 6.3) que a su vez permitió optimizar las condiciones y parámetros de adquisición y análisis por citometría de flujo. En la segunda etapa se profundizaron los estudios de respuesta FRET en 2 clones (4.3 y 6.3) regulando a la baja y alta los niveles de AMPc.

Estudios realizados con *Leishmania donovani* demostraron que parásitos expuestos a pH ácido y temperatura corporal incrementan rápidamente sus niveles de AMPc (3 a 4 veces respecto al estado basal) y de actividad de PKA (Bhattacharya, 2009). Esto se explica porque durante la diferenciación de la forma promastigota a la amastigota intracelular el parásito sufre un golpe térmico (de 22°C en el intestino del insecto a 37°C en el huésped mamífero) y de pH (de 7,2 en el intestino del insecto a 5,5 en la vacuola parasitófora del macrófago) drástico que actuarían como estímulos fisicoquímicos que activarían distintas vías de señalización que desencadenan el arresto en la fase G1 del ciclo celular, la reprogramación génica y diferenciación.

Por lo tanto, para inducir la producción de AMPc citosólico la línea reportera de *L. tarentolae* fue incubada en PBS pH 5,5 y 37°C durante 40 minutos, mientras que la muestra control fue incubada por el mismo tiempo pero en PBS pH 7,2 y temperatura ambiente (~ 18°C; TA).

Como estímulos redox se emplearon la diamida (10 - 200 μ M), el peróxido de hidrógeno (1 mM) y el DTT (1 - 10 mM) en incubaciones de 60 minutos máximo y en PBS pH 7,4.

Para este primer conjunto de experimentos se observa una buena respuesta del clon 4.3 a los estímulos redox con una oxidación del 35% del biosensor (módulo rxmRuby2) cuando las células son tratadas con H_2O_2 por 22 minutos y del 90% y 100% frente a la exposición a diamida por 10 minutos y 40 minutos, respectivamente (**Figura 64 A**). La oxidación inducida por diamida se pudo revertir en un 60% al cabo de 20 minutos de incubación de la muestra con DTT. El clon 5.4 mostró cierta resistencia o cinética lenta frente a estos mismos estímulos, no respondiendo al desafío con H_2O_2 (100% reducción) y 25% oxidación luego de 10 minutos de tratamiento con diamida. Recién a los 40 minutos de exposición a este oxidante se alcanza un 100% de oxidación la cual no revierte con el agregado de DTT. Con respecto a la respuesta FRET del biosensor bajo ninguna de las condiciones ensayadas se pudo observar un aumento significativo de esta señal respecto a la condición control (pH 7,4, TA) (**Figura 64 B y C**). Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, llamó la atención que para ambos clones los valores de % FRET de las muestras incubadas a pH 7,4 y tanto a 37°C como a TA, estuvieron por encima de las cifras obtenidas en el resto de condiciones ensayadas.

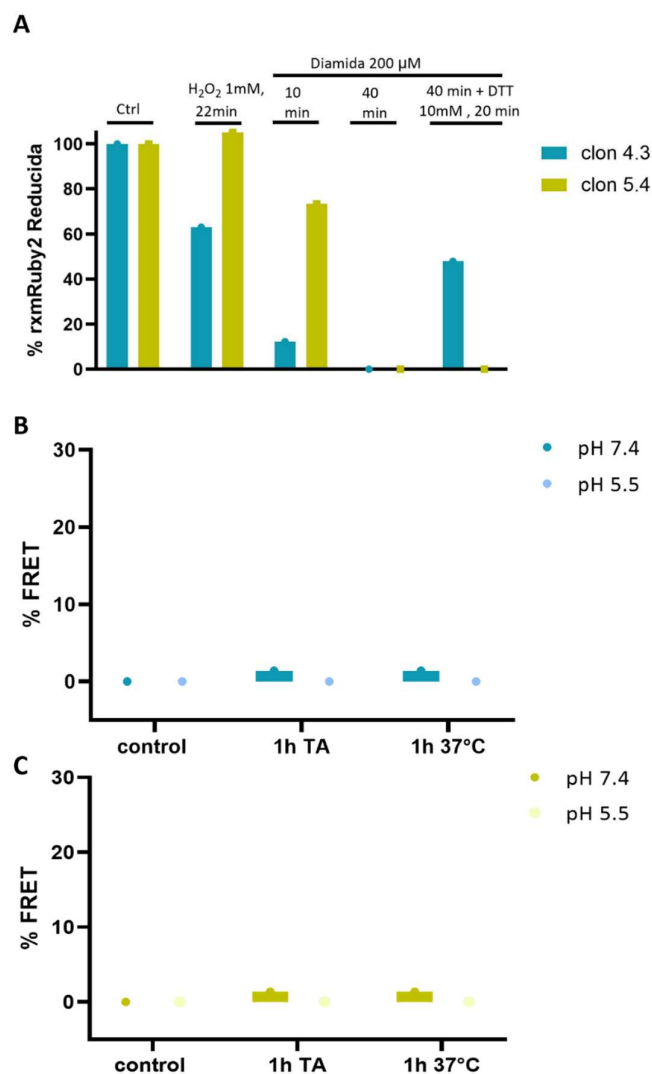


Figura 64. Respuesta de los clones 4.3 y 5.4 a estímulos redox y de AMPc. A) Los porcentajes de reducción del biosensor (módulo rxmRuby2) en los clones 4.3 y 5.4 para los diferentes estímulos ensayados se expresa normalizado a la IF de células tratadas con 200 μM diamida por 40 minutos (0% reducción) e IF de células tratadas con 10 mM DTT por 30 minutos (100% reducción). % FRET en B) clon 4.3 y C) clon 5.4 incubados a diferentes pHs y temperaturas. El % FRET se calcula como la diferencia entre la relación de IF rxmRuby2 / IF Clover respecto a la condición control.

A diferencia de los clones anteriores, el biosensor presentó un estado basal significativamente oxidado (clon 6.1 40% reducción y clon 6.3 58% reducción) en las líneas celulares 6.1 y 6.3 (**Figura 65**, barra Ctrl). Esto sugiere cierta acumulación intracelular de especies de bajo peso molecular oxidadas. La exposición a H₂O₂ por 40 minutos indujo una oxidación del 10% en el biosensor expresado por el clon 6.3 mientras que el clon 6.1 mostró una aparente insensibilidad a este estímulo. A pesar del estado basal oxidado del biosensor, en ambos

clones se observó una disminución del % de reducción del mismo cuando fueron expuestos por 30 minutos a diferentes concentraciones de diamida, aunque con diferencias notorias respecto a la relación entre la magnitud de la oxidación y la concentración de oxidante.

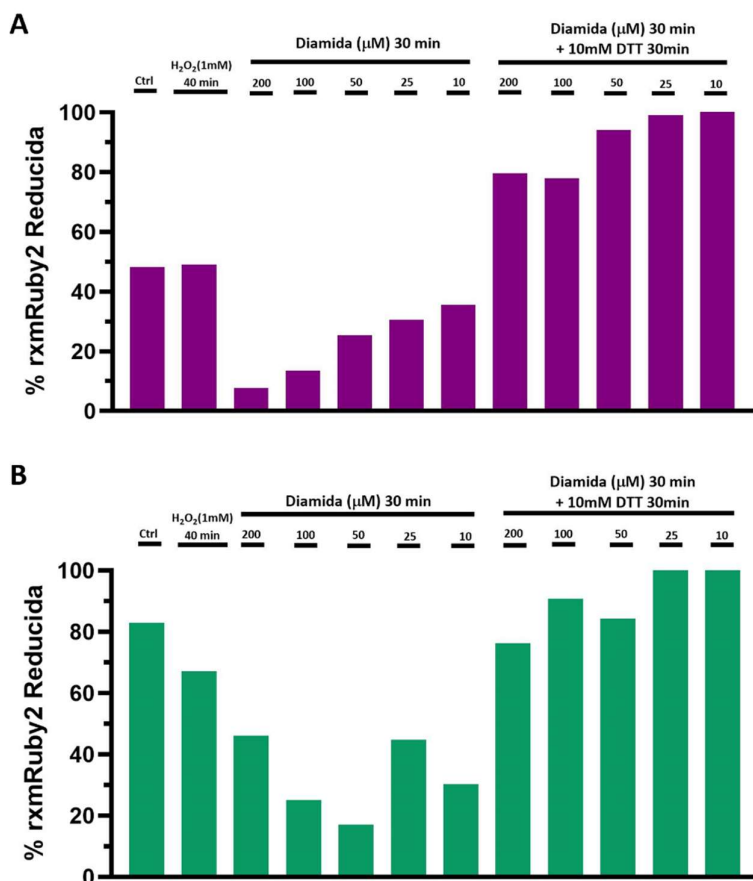


Figura 65. Evaluación de estado redox del biosensor en los clones 6.1 y 6.3. Los clones A) 6.1 y B) 6.3 fueron tratados con H₂O₂ (1 mM, por 40 min) o diamida (10 - 200 μM por 30 min) y, en el último caso, expuestos a DTT (10 mM) por 30 minutos adicionales. Células no tratadas se incluyen como control (Ctrl). Los valores de % reducción de rxmRuby2 se calcularon normalizados contra los valores de IF obtenidos con 200 μM diamida, 40 minutos (0% reducción) y 10 mM DTT, 30 minutos (100% reducción). Los datos fueron adquiridos en citómetro de flujo BD FACSAria™ Fusion con el láser 561 nm y el filtro 610 ±20 nm.

Por ejemplo, el clon 6.1 mostró una muy buena relación dosis-respuesta presentando un degradé de oxidación del 5 – 30% para el rango de concentraciones de 200 - 10 μM (**Figura 65 A**). Por el contrario, la respuesta del biosensor en el clon 6.3 mostró un comportamiento errático obteniéndose, por ejemplo, valores similares de reducción para concentraciones que diferían en un orden de magnitud (30% reducción a 200 y 25 μM o ~ 20% reducción a 100 y 10 μM; **Figura 65 B**). Concordando con este patrón de respuesta a diamida, en el clon 6.1 se

observó un nivel destacado de reversión de la oxidación al incubar con DTT por 30 minutos (70 - 85% reducción) a las muestras tratadas con distintas concentraciones de diamida (**Figura 65 A**). Para todas las muestras del clon 6.3 se observó una reversión marcada de la oxidación del biosensor (55 - 80% reducción) cuando fueron tratadas con DTT. Excepto por la muestra tratada con 100 μM diamida, en el resto de las muestras, el nivel de reducción máximo alcanzado correlacionó negativamente con el de la oxidación inicial (**Figura 65 B**), es decir a mayor oxidación inducida por diamida, menor nivel de reducción.

De manera similar a lo observado en los ensayos preliminares realizados con los clones 4.3 y 5.4, bajo ninguna de las condiciones fisicoquímicas evaluadas se pudo detectar señal de FRET (**Figura 66 A y B**). Dado que en esos mismos experimentos monitoreamos de manera independiente la señal no FRET de rxmRuby2 mediante la excitación directa de su cromóforo a 561 nm, pudimos analizar si los cambios en el pH y temperatura afectan el estado redox del biosensor.

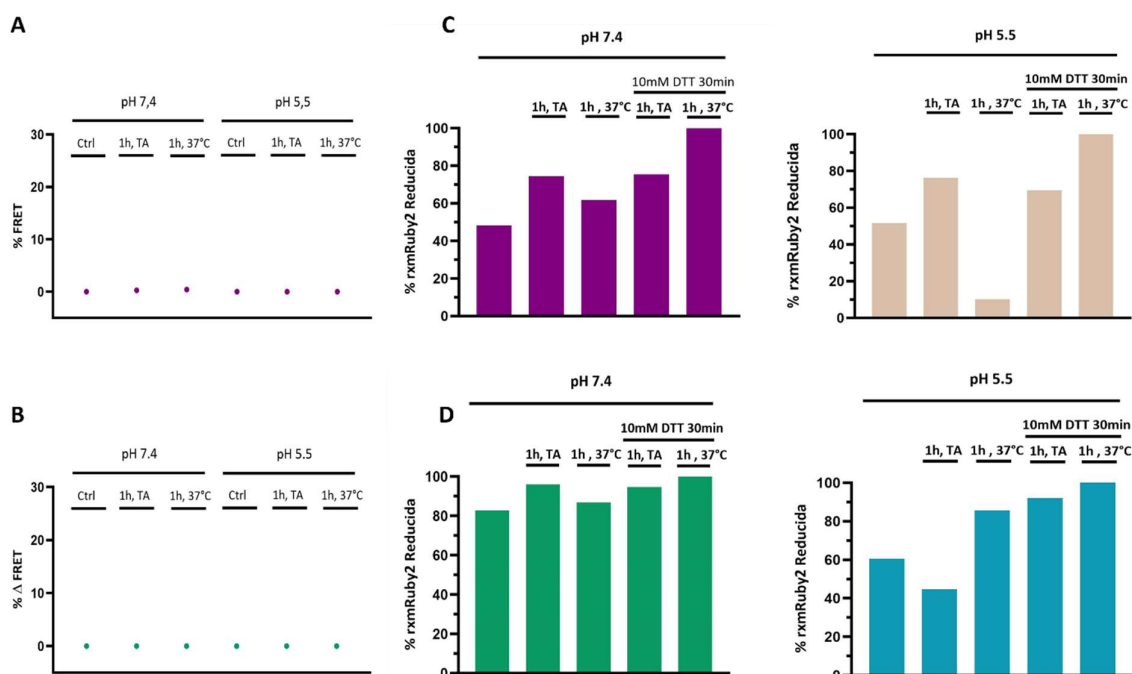


Figura 66. Evaluación de señal FRET y estado redox de clones 6.1 y 6.3. % FRET en clon A) 6.1 y B) 6.3 incubado a diferentes pHs y temperaturas. El % FRET se calcula como la diferencia entre la relación de IF rxmRuby2 / IF Clover respecto a la condición control. % rxmRuby2 reducida en clon C) 6.1 y D) 6.3 incubado a diferentes pHs y temperaturas. Los valores de % reducción de rxmRuby2 se calcularon normalizados contra los valores de IF obtenidos con 200 μM diamida, 40 minutos (0% reducción) y 10 mM DTT, 30 minutos (100% reducción). Los datos fueron adquiridos en citómetro de flujo BD FACSaria™ Fusion con el láser 561 nm y el filtro 610 ± 20 nm.

Esto es relevante, ya que una marcada oxidación podría comprometer la detección de señal FRET debido a la menor fluorescencia de la forma oxidada de rxmRuby2 (sección 4.1.3, **Figura 32**). Por un lado, la incubación de ambas líneas celulares a pH fisiológico durante 1 hora, tanto a TA como a 37°C no indujo oxidación de rxmRuby2 respecto a la condición basal (**Figura 66 C y D**, paneles izquierdos). Por el contrario, ese tiempo de incubación permite una reversión parcial (40 % para el clon 6.1 a 37°C y 15% para el clon 6.3 a 37 °C) del estado reducido de esta proteína. Notablemente, al incubar estas muestras con DTT (10 mM, 30 min) solo se evidencia una recuperación total del estado 100% reducido de la rxmRuby2 en la muestra incubada a 37°C, mientras que aquella incubada a TA es completamente insensible al efecto del agente reductor.

Las incubaciones realizadas a pH 5,5 mostraron resultados dispares entre ambos clones (**Figura 66 C y D**, paneles derechos). La incubación a TA induce un 65% de oxidación del biosensor en el clon 6.3, mientras que en el clon 6.1 sucede lo opuesto, observándose un **25%** de reducción. Al incubar estas muestras con DTT el biosensor expresado por el clon 6.1 es insensible al agente reductor manteniendo la rxmRuby2 su nivel de reducción (~ 75%), mientras que para el clon 6.3 se observa un 45% de recuperación en su estado reducido.

Llamativamente, cuando la incubación se realiza a 37°C los clones vuelven a mostrar cambios opuestos. Para el clon 6.1 se observa una marcada oxidación de la rxmRuby2 que es completamente revertida (100% reducción) cuando la muestra se incuba con DTT. Mientras que en el clon 6.3 se observa una reducción (15%), en lugar de una oxidación del biosensor, la cual incrementa un 15% adicional durante la incubación con DTT.

Excepto por el experimento mostrado en la **Figura 64**, en el resto de los ensayos (**Figura 65 y 66**), todos los clones evaluados mostraron un nivel de oxidación basal de rxmRuby2, el cual, como lo mencionamos arriba y lo demostramos para el biosensor rxCUTie (**Figura 51**), va a afectar negativamente la intensidad de la señal FRET de IFN-RXM. Por este motivo, decidimos re-evaluar los estímulos de pH y temperatura pero en presencia de DTT (10 mM) de manera de propiciar el estado reducido de la rxmRuby2 y disminuir el impacto de la baja IF sobre la capacidad de hacer FRET entre las proteínas fluorescentes. Estos estudios fueron realizados con los clones 4.3 y 6.1 por haber mostrado una respuesta reproducible, dosis-dependiente y reversible del módulo rxmRuby2 del biosensor (**Figura 64 y 65**). Al igual que en los ensayos anteriores, se comparó la respuesta a la condición control pH 7,4 sin tratamiento con DTT y se desafió la capacidad del DTT de limitar la oxidación de la rxmRuby2 mediante el agregado de 200 μ M diamida en el último punto del curso temporal.

El análisis del curso temporal del estado redox del biosensor muestra niveles elevados de reducción del biosensor (> 90% y > 70%) en la muestra control (pH 7,4 y TA) con y sin tratamiento con 10 mM DTT, respectivamente para ambos clones, los cuales se mantienen en el tiempo hasta el min 65 cuando se agrega diamida que induce una oxidación completa de la rxmRuby2 en la muestra control sin DTT. Esto confirmó la funcionalidad del biosensor en ambos clones (**Figura 67 A y C**).

En condiciones de pH ácido e independientemente de la temperatura y el clon, el estado basal de reducción de rxmRuby2 fue el más bajo (40 - 50% reducción) registrado para todas las muestras. Por otro lado, al agregar DTT, el estado redox del biosensor en el tiempo no sufre cambios (clon 4.3 a TA; clon 6.1 a 37°C y TA) o bien estos son marginales (10% reducción en clon 4.3 a 37°C). A pH fisiológico, se observa un incremento temporal de la reducción del biosensor en presencia de DTT que inicia en 53% (a 37°C en ambos clones) a tiempo 0 y a los 80 minutos asciende hasta un 90% en el clon 4.3 y hasta 73% en el clon 6.1. El agregado de diamida (250 μ M por 15 min) luego de transcurridos 65 minutos de ensayo, en todas las condiciones en las que se había tratado con DTT, no desencadenó una significativa oxidación de rxmRuby2 sino que, por el contrario, parecería que la co-incubación con DTT tendría un rol de protección frente a estímulos oxidantes fuertes.

Este conjunto de resultados revela información muy relevante, por un lado que a pH 5,5 la rxmRuby2 presenta niveles bajos de fluorescencia y pierde sensibilidad al agente reductor de manera significativa. Esto nos lleva pensar que probablemente el cromóforo de esta proteína esté parcialmente afectado por la acidificación del medio.

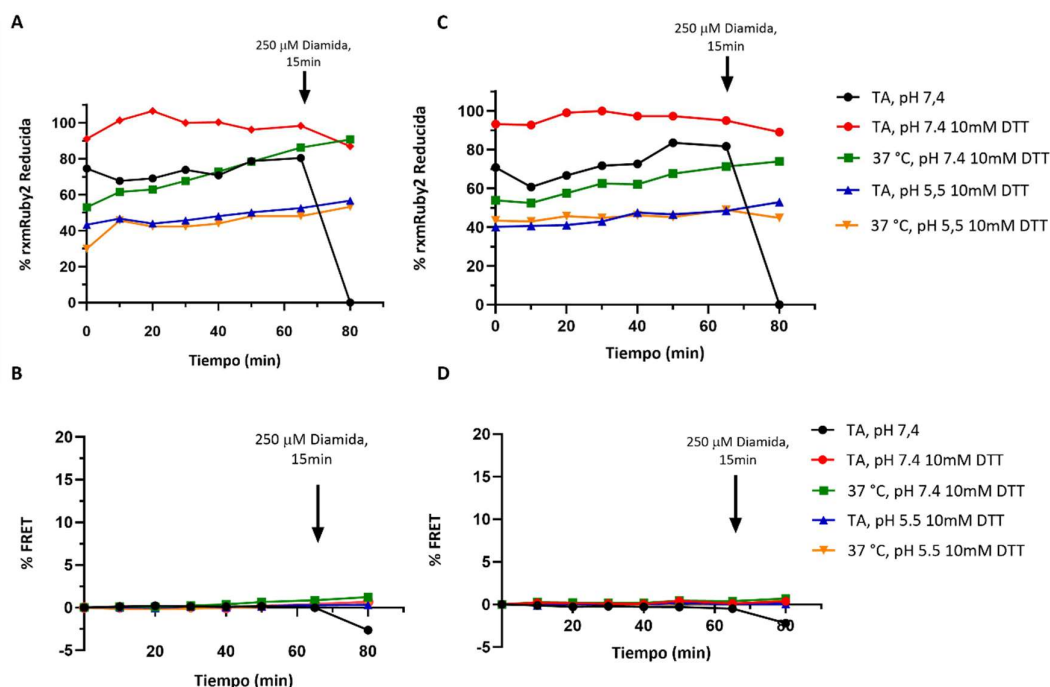


Figura 67. Curva de respuesta redox y FRET para el clon 4.3 (A y B) y para el clon 6.1 (C y D). El cálculo de FRET es la diferencia entre la relación de IF rxmRuby2 / IF Clover respecto a la condición control (TA, pH 7.4). El 0% (IF rxmRuby2 ox) corresponde a la condición 250 μ M Diamida, 15 min; el 100% (IF rxmRuby2 red) corresponde a la condición pH 7,4, TA, 10 mM DTT, 30 min.

Tal como se puede inferir de la curva de titulación de la rxmRuby2 a diferentes pHs (**Figura 35**), su intensidad de fluorescencia se reduce a un 10 – 25% a pH 5,5. Los niveles de fluorescencia registrados *in cellula* están por encima de esos valores, lo cual tiene coherencia con la capacidad de las células para amortiguar, por cierto tiempo y parcialmente, su pH interno. No obstante, el incremento nulo o marginal de fluorescencia de la rxmRuby2 cuando las células son expuestas por un tiempo prolongado a DTT indica fuertemente la pérdida de funcionalidad del cromóforo de esta proteína.

La señal de FRET no mostró grandes cambios en el curso del tiempo para todas las condiciones ensayadas. Solo se pudo distinguir un leve incremento (1 – 2%) de FRET en muestras de clones incubados a pH 7,0 y tanto a 37°C como a TA, a partir de los 40 - 50 minutos de incubación (**Figura 67 B y D**), lo cual coincide con niveles de reducción del biosensor $\geq 60\%$ (**Figura 67 A y C**). No obstante, este incremento en FRET es 10 veces más bajo al predicho por cálculos computacionales para la forma holo de IFN-RXM (FRET 15 - 20%). El análisis temporal (0 a 80 min) también nos permitió descartar que la falta de FRET observada en experimentos

anteriores (ensayos de punto final de 60 minutos) se hubiera debido a no haber realizado la determinación en la ventana de tiempo adecuada.

Además de las razones señaladas anteriormente, otra causa de la falta de inducción de señal FRET podría ser que en *L. tarentolae* (un parásito de un organismo réptil y poiquiloterma) los estímulos aplicados no den lugar a la formación de AMPc. Por este motivo realizamos una búsqueda bibliográfica para identificar otras formas más selectivas de inducir la producción y acumulación de AMPc a nivel intracelular. Como fuera comentado en la introducción, las fosfodiesterasas (PDEs) son responsables de “apagar” rápidamente la señal disparada por estímulos mediante una eficiente hidrólisis de los segundos mensajeros: los nucleótidos cíclicos. Esta función es tan importante como la señal misma ya que permite que las vías de señalización funcionen como tales y no permanezcan prolongadamente activadas. El rol de las PDE en tripanosomátidos no es totalmente entendido, pero se ha reportado que la señalización por AMPc está involucrada en la patogénesis de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Giardia lamblia* (Koning, 2012), (King-keller, 2010), (Kunz, 2017). En *Leishmania donovani*, la indispensabilidad de las PDE para la supervivencia del parásito quedó demostrada mediante el uso de inhibidores de estas proteínas que alteraron los niveles de AMPc y condujeron a la muerte celular (Bhattacharya, 2009). Estas evidencias atrajeron interés por las PDE como potenciales blancos terapéuticos de tripanosomátidos (Makin, 2015). En ese sentido, el grupo de Carmen Gil del CIB de España, evaluó el potencial anti-tripanosomátido (*T. brucei brucei*, *T. cruzi* y *L. infantum*) de una pequeña librería de 30 compuestos químicos inhibidores de la PDE7A y PDE10A de humanos (Sebastián-Pérez, 2018). De las distintas estructuras ensayadas (quinazolinas, furanos, iminotiodiazoles, sulfuros e imidazoles), solamente (cuatro) compuestos imidazólicos mostraron potencial inhibitorio de la forma amastigota intracelular de *L. infantum* y *T. cruzi*, cuatro de ellos siendo no tóxicos contra una línea celular de fibroblastos pulmonares (Sebastián-Pérez, 2018). En ese estudio, se profundizó la caracterización del compuesto 35 (ACG 29.3), determinándose que es capaz de promover un aumento de los niveles intracelulares de AMPc en promastigotas de *L. infantum* luego de 3 h de incubación a concentraciones 2X y 5X su IC₅₀ contra la forma amastigota (5,1 µM). De acuerdo a los autores, este efecto fue consistente con la inhibición de una o más PDEs y se produjo en el mismo rango de concentración que el de su actividad anti-leishmania.

Teniendo en cuenta el alto grado de conservación de las PDEs entre diferentes especies de *Leishmania* (Wang, 2007), (Sebastián-Pérez, 2018), decidimos ensayar el efecto de este compuesto en las líneas reporteras de IFN-RXM de *L. tarentolae*. En el primer ensayo, los clones 4.3 y 6.1 fueron tratados durante 90 min con ACG 29.3 (25 µM), gentilmente provisto

por el grupo español, en presencia de DTT (10 mM), a pH fisiológico, tanto a TA como a 37°C. La única condición en la cual se observa un incremento progresivo, aunque bajo (máxima señal de FRET = 2%), de la señal FRET corresponde al tratamiento realizado a 37°C con compuesto (línea y símbolo rojo en **Figura 68 A y B**). Este nivel de FRET se correspondería con un 10% aproximadamente de la señal máxima que podría alcanzar el biosensor de acuerdo a las predicciones computacionales.

Ante estos resultados alentadores, decidimos extender el tiempo incubación con el compuesto (3 y 18 h a temperatura ambiente (TA)) y ensayar concentraciones $\leq 25 \mu\text{M}$ con y sin DTT desde el inicio del ensayo, ante la eventualidad de aparición de efecto citotóxico por los tiempos prolongados de exposición. Para todas estas condiciones y ambos clones, la citotoxicidad del compuesto siempre estuvo por debajo del 20% (**Figura 68 C y D**). Para las incubaciones a 3 h, en ambos clones se observa una respuesta de FRET que correlaciona muy bien con las concentraciones de compuesto probadas mostrando una amplitud de 1 a 8 % FRET para el clon 4.3 y algo menor para el clon 6.1: 1 a 5 % FRET. El DTT no influyó de manera significativa en la señal FRET, excepto por las muestras del clon 6.1 tratadas con 10 y 25 μM ACG 29.3 donde el agente reductor produjo un leve (1%) incremento de la señal. La exposición de estas líneas reporteras durante 18 h a ACG 29.3 tuvo un efecto notorio en el registro de la señal FRET a temperatura ambiente ($\sim 18^\circ\text{C}$) (**Figura 67 E y F**). En presencia de DTT, se observan niveles máximos de FRET (17 – 18%) en todo el rango de concentraciones del compuesto (1 - 25 μM) para el clon 4.3 y a partir de 5 μM para el clon 6.1. El efecto del DTT sobre los niveles de FRET es menor en ambos clones y en todo el rango de concentraciones, contribuyendo a elevar un 0,2 – 1% la señal. La única excepción en la cual el DTT tuvo un efecto significativo sobre la señal de FRET (10% de incremento) fue para el clon 4.3 tratado con 1 μM ACG 29.3. Para ambos clones, y a diferencia de la exposición por 3 h, a las 18 h de incubación y en ausencia de DTT la señal de FRET deja de ser dosis dependiente a concentraciones de ACG 29.3 superiores a 5 μM alcanzándose saturación de la señal. En el clon 4.3 incubado en presencia de DTT, ese *plateau* se alcanza incluso a la concentración más baja ensayada: 1 μM . Analizado desde la perspectiva del módulo redox del biosensor, estos resultados apuntarían a que durante estos períodos de incubación con diferentes concentraciones de compuesto, la inhibición de las PDEs no induce la oxidación del biosensor, excepto por el tratamiento con una concentración subletal de ACG 29.3 (1 μM) durante 18 h que generó una aparente disminución de fluorescencia en el clon 4.3.

Estos resultados nos permitieron confirmar la funcionalidad del biosensor para detectar AMPc.

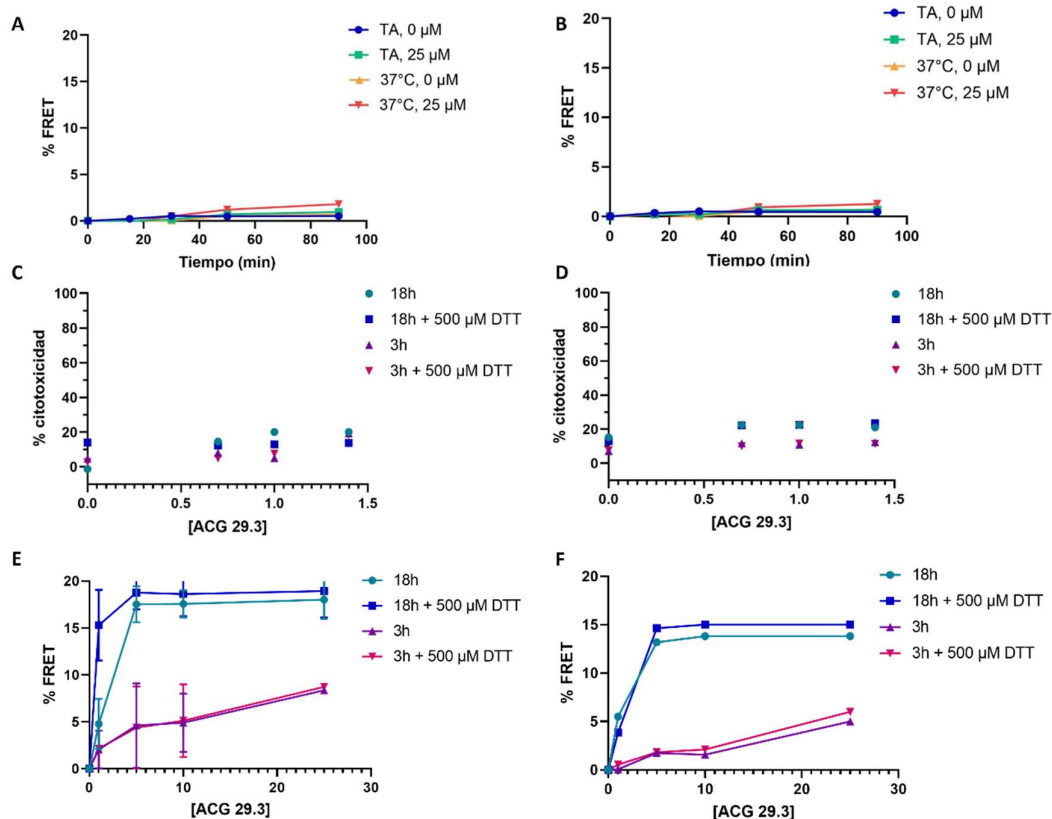


Figura 68. Análisis de respuesta FRET y citotoxicidad al ACG 29.3 de líneas reporteras IFN-RXM. A) y B) curso temporal de la señal FRET del clon 4.3 y 6.1, respectivamente, durante incubación por 90 minutos a TA y 37 °C, sin y con 25 μM ACG 29.3. C) y D) citotoxicidad de ACG 29.3 (0, 1, 5, 10 y 25 μM) sobre clon 4.3 y 6.1, respectivamente, luego de 3 h y 18 h de incubación en ausencia o presencia de 500 μM de DTT a TA. E) y F) señal FRET del clon 4.3 y 6.1, respectivamente, durante incubación por 3 h y 18 h a TA a diferentes concentraciones de ACG 29.3 (0, 1, 5, 10 y 25 μM) en ausencia o presencia de 500 μM de DTT. A todos los valores de FRET se le sustrajo el valor de FRET basal de las respectivas muestras incubadas en ausencia de ACG 29.3

No obstante el estado redox de la rxmRuby2 fue evaluado de manera directa, y no dependiente de la medición de FRET, mediante excitación de su cromóforo a 561 nm luego de incubar los clones con 10 μM de ACG 29.3 (concentración intermedia) por 3 y 18 horas en presencia y ausencia de 500 μM DTT a TA (**Figura 69 A y B**). Los resultados de estos ensayos muestran que el clon 4.3 bajo 3 y 18 horas de incubación, el compuesto induce una oxidación leve (2 – 8%) de rxmRuby2, confirmando las observaciones anteriores (**Figura 68 E**) y reafirmando que las señales de FRET previamente medidas corresponden a fluctuaciones directas en los niveles de AMPc producto de la inhibición de las PDEs. También pudo

comprobarse que en las situaciones donde el compuesto pueda estar desencadenando un cierto desbalance redox, la co-incubación con DTT permite neutralizar este efecto y obtener una medida no sesgada del FRET. Por otro lado, el clon 6.1 mostró un comportamiento similar al clon 4.3 luego de 18 horas de incubación con el compuesto, mientras que se observa una mayor oxidación (25%) de la rxmRuby2 luego de 3 horas de incubación con 10 μM de ACG 29.3, que no se revierte en presencia de DTT (**Figura 69 B**), indicando que la proteína se podría encontrar en un estado de oxidación irreversible (Rhee, 2012). El estado oxidado de la rxmRuby2 sería un artefacto sobre la medición de FRET del sensor INF-RXM, donde el valor de 1,5 % FRET obtenido (**Figura 68 F**) podría ser de mayor magnitud.

Un punto interesante, no explorado en esta tesis, sería evaluar estas mismas condiciones con el sensor rxmRuby2 *in vitro* por espectrofluorimetría (sección 4.1.3), a modo de poder profundizar en la caracterización de la respuesta e interacción del compuesto con el módulo redox sensible del sensor dual.

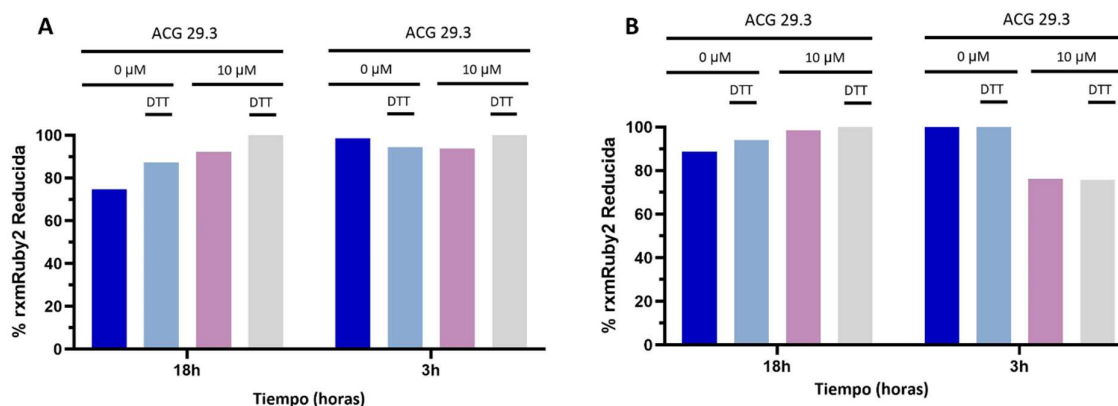


Figura 69. Estado redox de IFN-RXM en líneas reporteras de *L. tarentolae* expuestas a ACG 29.3. A) y B) % de reducción de rxmRuby2 en el clon 4.3 y 6.1, respectivamente, luego de incubación por 3 y 18 horas a TA con 0 o 10 μM ACG 29.3 y en ausencia o presencia de 500 μM de DTT. El 0% (IF rxmRuby2 ox) corresponde a la condición 200 μM Diamida, 15 minutos; el 100% (IF rxmRuby2 red) corresponde a la condición 10 mM DTT, 30 minutos.

Uno de los estímulos ampliamente usados en ensayos celulares para provocar un aumento intracelular en el contenido de AMPc consiste en activar la Adenilato ciclasa con el químico Forskolina (FSK) y simultáneamente inhibir las PDEs con el compuesto 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). La forskolina, presente predominantemente en la raíz de la planta *Coleus forskohlii*, es útil para el tratamiento de la hipertensión, las enfermedades respiratorias y la obesidad. La forskolina es un diterpenoide capaz de modular las concentraciones de la enzima adenilato

ciclasa y del monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (Pateraki, 2017). El IBMX es un derivado de metilado de la xantina que funciona como inhibidor competitivo no selectivo de fosfodiesterasas.

El uso de FSK como inductor de AMPC en tripanosomátidos es debatida en la literatura. Varios estudios han reportado que la unión de FSK a la ACs de tripanosomátidos se ve estéricamente impedida, lo cual determina que este compuesto no actúe como agonista de estas enzimas (Torruella, 1986), (Taylor M. C., 1999), (D'Angelo M. , 2002), (Tagoe, 2015), (Rolin, 1996), (Gould & de Koning, 2010). Sin embargo en otros trabajos realizados en estas especies, FSK ha sido utilizado como potencial modulador de los niveles de AMPC ((Santara, 2013), (Burchmore, 1995), (Blum J. J., 1999), (Vieria, 1997)). Nos pareció importante emplear nuestras líneas reporteras IFN-RXM para investigar esta controversia. Para ello, ambos clones (4.3 y 6.1) fueron tratados con FSK (50 μ M), FSK + IBMX (50 y 100 μ M, respectivamente) o FSK + ACG 29.3 (50, 100 y 10 μ M, respectivamente) durante 3 y 18 horas en presencia o ausencia de DTT (500 μ M). Como control se incluyeron células no tratadas o tratadas con ACG 29.3 (10 μ M) en presencia o ausencia de agente reductor. En relación a los resultados obtenidos en las muestras control, se observa que, en ambos clones, ACG 29.3 induce un aumento de FRET (1,5 - 2,5% a las 3 horas y 13 - 17% a las 18 horas) respecto a las células que no recibieron tratamiento (**Figura 70 A y B**). En presencia de DTT, esas señales de FRET sufren un leve aumento (0,2 - 1,5%), excepto para la muestra del clon 4.3 tratado por 3 horas con el compuesto, lo cual estaría indicando una oxidación menor del biosensor. En las muestras donde FSK se co-incubó con ACG 29.3, los niveles de FRET son prácticamente que idénticos a los obtenidos solo con el inhibidor de PDEs, lo cual sugiere que FSK no estimularía a las ACs de *L. tarentolae*. Cuando el estímulo probado es FSK junto a IBMX, la señal de FRET es nula en ambos clones y a los diferentes tiempos. En presencia de DTT, el nivel de FRET logra un incremento marginal (0,1 y 0,8% a las 3 y 18 horas, respectivamente) en el clon 4.3, mientras que el reductor no tiene efecto sobre el clon 6.1.

En resumen, estos datos experimentales, si bien preliminares, permitieron validar químicamente (por medio del inhibidor de PDEs de tripanosomátidos ACG 29.3) la funcionalidad del biosensor para detectar AMPC, así como la falta de actividad en *L. tarentolae* de estímulos clásicamente usados en mamíferos para estimular la acumulación de AMPC a nivel intracelular (FSK e IBMX).

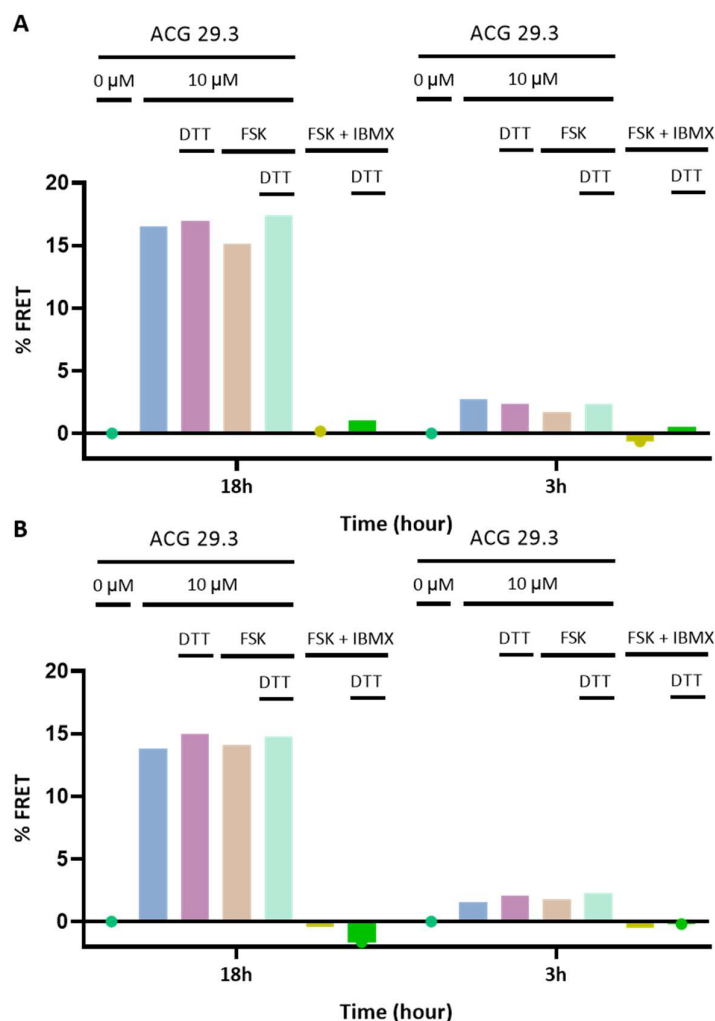


Figura 70. Análisis de respuesta FRET al tratamiento con FSK, IBMX y/o ACG 29.3 de líneas reporteras IFN-RXM. % FRET para el clon A) 4.3 y B) 6.1 no tratado (0 μ M) o tratado por 18 y 3 horas con ACG 29.3 (10 μ M), ACG 29.3 + FSK (10 μ M y 50 μ M, respectivamente) o FSK + IBMX (50 μ M y 100 μ M, respectivamente), en ausencia o presencia de DTT (500 μ M).

4.3.5 Conclusiones objetivo específico 3

A la fecha, no existen reportes de la generación de biosensores basados en proteínas fluorescentes que, siendo parte de un mismo polipéptido, tengan capacidad de detectar de manera simultánea cambios en los niveles citosólicos de AMPc y del pool de tioles de bajo peso molecular reducido/oxidado, en cualquier tipo celular. Este objetivo fue abordado en esta tesis, seleccionando como organismo modelo de interés diferentes especies de tripanosomátidos.

Aplicando diferentes estrategias y protocolos, se identificaron condiciones para expresar y purificar la forma soluble del biosensor en *E. coli*. No obstante, con rendimientos globales bajos. El biosensor recombinante presentó picos de absorción de fluorescencia concordantes con los de la proteína Clover y rxmRuby2 que lo integran. Esta forma del biosensor también emitió una fuerte señal de fluorescencia correspondiente a Clover pero no para rxmRuby2. Esto resultó llamativo porque en muestras de diferentes cepas de bacterias inducidas a expresar el biosensor mediante diferentes protocolos e intactas (es decir que no fueron lisadas) se observó señal de fluorescencia de rxmRuby2 al microscopio de epifluorescencia. Todo esto nos lleva a concluir que la pérdida de emisión de fluorescencia de este componente del biosensor no se debe a problemas de maduración del cromóforo en la proteína recombinante. Probablemente la cancelación de emisión de fluorescencia de la rxmRuby2 se deba a cambios en el entorno electrostático del cromóforo. Como para todas las proteínas fluorescentes derivadas de la GFP, la eficiencia en la emisión de fluorescencia depende de manera directa del estado de protonación del cromóforo (Meyer, 2010). La forma protonada del mismo presenta una menor intensidad de fluorescencia. Nuestra hipótesis es que durante el proceso de aislamiento y purificación del biosensor recombinante se producen cambios conformacionales en los residuos que interactúan con el cromóforo que seguramente favorecen y estabilizan su estado protonado. En ese sentido, la estructura cristalina de mRuby mostró la presencia de un ion acetato formando un puente de hidrógeno con el residuo Glu 222 que es parte integral del cromóforo (Petersen, 2003). mRuby y mRuby2 difieren solo en 4 aminoácidos (L15M, L102V, A119V, A131P), ninguno de ellos es parte del cromóforo ni se encuentra en su vecindad. Este hallazgo cristalográfico pone en evidencia la existencia de un espacio en torno al cromóforo de estas proteínas que podría ser ocupado tanto por pequeños iones, residuos circundantes o del mismo cromóforo, con eventuales consecuencias en sus propiedades espectrales. A pesar de esa limitación, que no nos permitió abordar una caracterización más completa del biosensor como la realizada para la rxmRuby2 (sección 4.1.3) o CUTie2 (sección 4.2.3), pudimos inferir que la capacidad de la forma recombinante de IFN-RXM por unir AMPc e inducir un cambio alostérico que deriva en FRET estaría conservada dado que la emisión de fluorescencia de Clover descendió de manera concentración-dependiente frente al agregado del nucleótido cíclico.

Otra gran dificultad enfrentada en este objetivo de la tesis fue expresar IFN-RXM en parásitos del género *Trypanosoma*. Si bien se obtuvo una línea celular de *T. cruzi* resistente al agente de selección presente en el casete de expresión del biosensor, no expresó a niveles detectables por citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia. Este no fue el caso para

construcciones de ADN realizadas sobre el mismo esqueleto de vector pero que expresan otros biosensores basados en GFP o proteínas fluorescentes (Sardi, 2016). En esta tesis, los sistemas de expresión seleccionados para tripanosomas fueron inducibles y no constitutivos, con la intención de poder modular no solo el nivel de expresión del biosensor sino también en que momento preciso esto debía ocurrir. Sobre todo teniendo en cuenta un posible efecto deletéreo de la expresión del transgen, como lo discutimos para CUTie2. Sin embargo, estos sistemas inducibles presentan fugas de la expresión en condiciones de no inducción, debido a una represión ineficiente del promotor (Sardi, 2016), (Taylor, 2006). Por lo tanto, nuestra hipótesis para explicar la fallida expresión del biosensor en tripanosomas es que la expresión basal de IFN-RXM resulta tóxica al competir con eventos de señalización dependientes del AMPc que pueden ser vitales en situaciones de estrés, como lo es una electroporación.

A pesar de estos intentos infructuosos, logramos expresar y validar la funcionalidad de IFN-RXM *in cellula* mediante la generación de líneas celulares de *L. tarentolae* reporteras. Esta especie fue seleccionada como modelo de estudio por los menores requerimientos de bioseguridad para su manipulación, así como por su simpleza de cultivo. En estas células, la secuencia del biosensor se integró en su genoma de manera estable y su expresión fue constitutiva. Los niveles de producción de IFN-RXM alcanzados por diferentes clones fueron altamente satisfactorios y homogéneos. El biosensor expresado por estas líneas reporteras respondió de manera rápida (min) y reversible a estímulos redox que se originaron de manera espontánea o inducida. También logró detectar cambios en la concentración de AMPc en el citosol. Dos estímulos fisicoquímicos (la acidificación del medio y el incremento de la temperatura de cultivo) que han sido reportados como factores disparadores del incremento de los niveles de AMPc en la forma promastigota de especies de *Leishmania* patógenas para mamíferos (Bhattacharya, 2009), no resultaron efectivos en *L. tarentolae* ya que el biosensor no detectó cambios en los niveles de este nucleótido cíclico en períodos de incubación cortos (90 min máximo). En las especies patógenas, esos estímulos simulan los cambios ambientales a los cuales se enfrentan los promastigotas que habitan el insecto vector cuando invaden un huésped mamífero (37°C) y deben transformarse a la forma amastigota cuando invaden macrófagos para poder residir en su fagolisosoma (pH < 6). En su huésped natural, las lagartijas (organismos poiquiloterms), a *L. tarentolae* se la encuentra predominantemente en el torrente sanguíneo y el lumen intestinal, tanto en la forma promastigota como amastigota (Simpson, 1988) (Wilson, 1979) (Killick-Kendrick, 1986), aunque su capacidad de diferenciarse a esta última forma aún sea debatida. Raramente se ha detectado su presencia en células monocíticas de estos reptiles (Simpson, 1988) (Wilson, 1979). Esto podría explicar porque

estos estímulos no produjeron en este parásito efectos señalizadores mediados por AMPc o redox dependientes de tioles.

Un inhibidor PDEs de tripanosomátidos recientemente descubierto (Sebastián-Pérez, 2018), el compuesto ACG 29.3, resultó efectivo en inducir un incremento en la señal de FRET en las líneas reporteras de *L. tarentolae* lo cual se originó por la acumulación temporal de AMPc. Este incremento en el nucleótido cíclico fue detectado sin la necesidad de incluir estímulos adicionales y estaría indicando que el parásito, en condiciones de cultivo normales y en fase exponencial de crecimiento, mantiene una producción basal de AMPc seguramente para regular distintos procesos celulares. La máxima señal de FRET (~ 18%) detectada por IFN-RXM a nivel intracelular fue compatible con la estimada por cálculos computacionales, confirmando la robustez de las predicciones *in silico* y la funcionalidad del biosensor en un contexto biológico. Así como ACG 29.3 permitió validar funcionalmente a IFN-RXM, en contraposición, los resultados obtenidos en nuestro estudio permitieron confirmar, de manera no invasiva, el modo de acción o efecto sobre blanco molecular de este compuesto en *Leishmania*.

Finalmente, los ensayos realizados sobre estas líneas reporteras confirmaron que dos compuestos clásicamente usados para estimular la producción (forskolina) y acumulación de AMPc (IBMX) en células de mamífero no son efectivos en *Leishmania*. Estos resultados reafirman evidencias previas de la inactividad de FSK sobre ACs de tripanosomátidos (Makin, 2015) (Tagoe, 2015) y cierta divergencia estructural de las PDEs de estos organismos respecto de las de mamíferos (Gould M. K., 2011).

5. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Los tripanosomátidos son organismos ancestrales dentro de la rama eucariota que han sorteado exitosamente la adaptación a diferentes ambientes y huéspedes (Simpson A. , 2006). En particular aquellos que presentan un ciclo de vida di-genético, es decir con capacidad de habitar dos especies de huéspedes diferentes durante su ciclo de vida, sufren procesos de transformación metabólicos, moleculares y estructurales que los preparan para adaptarse a las nuevas condiciones que ofrecen cada uno de sus huéspedes (Sharma, 2009); (Barrett, 2003); (Brun, 2010). Esta diferenciación es disparada por distintos estímulos ambientales y es orquestada a nivel celular por una intrincada red de señalización que afectará la expresión de genes estadio-específicos tanto a nivel transcripcional como traduccional (Specker, 2021). Las tres principales vías de señalización que operan en las células son las que dependen de eventos de fosforilación/desfosforilación, de oxido-reducción y de transporte iones (Jones, 2010). En la primera de ella, receptores de membrana con especificidad por determinados ligandos (estímulos) son los que disparan la formación de nucleótidos cíclicos que actuarán como segundos mensajeros que (des)activarán sistemas de quinasas/fosfatasa para retransmitir la señal a los efectores finales. La segunda vía involucra la transmisión de señal mediante la oxidación de residuos de cisteína presentes en peroxidasas que funcionan como conmutadores que catalizarán y transferirán de manera blanco-específica esos equivalentes de oxidación a las proteínas efectoras (Jones & Sies, 2015). Un aspecto importante de todas estas vías de señalización es que la actividad de varios de sus componentes puede estar sometido a control redox mediante la acción de oxidorreductasas. Este tipo de regulación ortogonal permite modular el flujo de transmisión de señal de manera integrada a las necesidades metabólicas y condiciones del medio. Por ejemplo, bajo condiciones de estrés oxidativo la actividad de diversas fosfatasa (PTEN, Cdc25, PTP1B, PTP2-a y SHP-1 y 2) y quinasas (Sty1, PKA-R1, Src, PKG-1, ASK-1) (Han, 2017); (Thannickal, 2000); (Tonks, 2005); (Fujino, 2006); (Wright, 2009) de mamíferos es controlada por tiorredoxinas. Por otro lado, se ha reportado que las EROs son capaces de modular la respuesta de la vía de la insulina (Mahadev, 2001), de la señalización mitocondrial (Lee, 2006), de las fosfatasa PTEN y PIP3 (Kwon, 2004), de la proteína quinasa PKA y de señalización por AMPc (Humphries K. M., 2002); (Humphries, 2005).

Más allá de la conservación de aspectos básicos de la biología eucariota, un aspecto interesante de los tripanosomátidos es que durante su proceso evolutivo han desarrollado un gran número de características moleculares y bioquímicas únicas. Por ejemplo, si bien se tiene constancia que los diferentes estadios de los tripanosomátidos producen AMPc, la ausencia de

receptores acoplados a proteína G, la presencia de adenilato ciclasas estructuralmente diferentes, el escaso conocimiento sobre los efectores del AMPc, y la necesidad de una rigurosa regulación de AMPc, sugieren que en estos organismos esta vía es bioquímicamente diferente a la de los mamíferos. De manera similar, está muy bien documentado que los tripanosomátidos poseen un metabolismo redox dependiente de tioles que difiere significativamente del presente en la mayoría de los organismos eucariotas. Este metabolismo depende de un (di)tiol de bajo peso molecular ausente en mamíferos, el tripanotión, que junto con la dupla tripanotión reductasa y la oxidoreductasa triparredoxina aportan poder reductor a distintas funciones celulares anabólicas (ej. síntesis de ácidos nucleicos) o de protección contra oxidantes (ej. sistema de peroxidasas) (Ariyanayagam M. R., 2001), (Krauth-Siegel & Comini, 2008), (Manta B. , 2019), (Nogoceke E. , 1997), (Lüdemann, 1998). En su carrera evolutiva, los tripanosomátidos prescindieron totalmente de los genes codificantes para las principales reductasas dependientes de NADPH de mamíferos: la tiorredoxina reductasa y la glutatión reductasa (Berriman, 2005), (Ivens, 2005), (El-Sayed, 2005). El hecho que los parásitos sean capaces de soportar el ataque oxidativo durante el proceso de infección y se adapten a diferentes condiciones metabólicas y ambientales durante su ciclo de vida, indica que su sistema redox es bastante robusto a pesar de la configuración minimalista que caracteriza al mismo (Krauth-Siegel & Comini, 2008). Lo mismo aplicaría al sistema de señalización mediado por AMPc, el cual claramente responde eficientemente a los estímulos y necesidades de estos patógenos.

A la fecha de inicio de esta tesis (2017), no existían reportes sobre el desarrollo y empleo de biosensores redox basados en proteínas fluorescentes con corrimiento espectral al rojo que permitieran monitorear el estado redox de tioles de bajo peso molecular. Tampoco se había descrito el diseño de biosensores FRET capaces de monitorear en simultáneo ambas vías de señalización en parásitos patógenos para el ser humano y el ganado, como son *Leishmania sp.*, *T. cruzi* y *T. brucei*. Además de constituir un aspecto innovador, consideramos que el desarrollo de estas herramientas permitiría indagar sobre aspectos desconocidos o aún no abordados en profundidad sobre los mecanismos de señalización y la biología de estos patógenos.

Mediante bioinformática, tecnología de proteína recombinante y técnicas bioquímicas se logró desarrollar y caracterizar el sensor rxmRuby2, un sensor redox con corrimiento al rojo, basado en la proteína mRuby2. Las propiedades de este sensor (potencial redox, pKa del cromóforo y especificidad por sustrato), lo hacen óptimo para detectar fluctuaciones en el pool de

GSH/GSSG en compartimentos con altas concentraciones de GSH, donde prevalezcan condiciones reductoras y un pH 7 - 8 (como el citosol, núcleo o la matriz mitocondrial). Demostramos que, al igual que el ampliamente caracterizado biosensor roGFP2, la Grx aceleró el intercambio de tiol-disulfuro entre la rxmRuby2 y el par GSH/GSSG. Por lo tanto, para obtener por parte de rxmRuby2 una respuesta cinética confiable de los fenómenos redox intracelulares sería conveniente expresar el mismo en células y/o compartimentos subcelulares que contengan glutarredoxina. Eventualmente, como lo demostramos en estudios de expresión en la forma infectiva de *T. brucei*, rxmRuby2 puede fusionarse a la Grx para garantizar un control cinético de la óxido-reducción del biosensor independiente de la disponibilidad de Grx endógena.

Debido a que el cromóforo de la rxmRuby2 carece de un espectro ratiométrico, las determinaciones cuantitativas requieren de una calibración *in situ* del biosensor. Esto implica obtener los máximos y mínimos de intensidad de fluorescencia bajo condiciones reductoras y oxidantes. Hemos comprobado que los agentes químicos DTT y diamida permiten llevar a cabo dicha calibración por su buena permeabilidad de membrana y reactividad con disulfuros y tioles, respectivamente. No obstante, cuando se ensayen nuevas líneas celulares reporteras o condiciones de estudio es conveniente monitorear en el tiempo los cambios de fluorescencia del biosensor a diferentes concentraciones de estos agentes, así como la viabilidad celular. Esto permitirá establecer con precisión las condiciones que rinden valores máximos y mínimos de reducción del biosensor sin compromiso de la integridad celular. Además de su empleo como calibradores del sistema biosensor, DTT y diamida pueden emplearse en muestras incógnitas para verificar que los cambios en la intensidad de fluorescencia tienen una base redox y no son productos artefactuales (ej. apantallamiento y/o blanqueo de fluorescencia, variaciones célula-a-célula de los niveles de expresión del biosensor, etc). A diferencia de los biosensores ratiométricos o autocalibrables, las características intensiométricas de rxmRuby2 limitan su aplicabilidad en técnicas de imagenología de tejido profundo o *in vivo*, ya que resultaría complejo realizar una calibración del mismo a nivel tisular o de organismo completo. Sin embargo, la generación de proteínas verdes fluorescentes redox sensibles y ratiométricas (roGFP2 y roClover1) (Hanson, 2004), (Cannon & Remington, 2005), (Meyer, 2010), (Campbell, 2018) sugiere que similares estrategias de diseño podrían emplearse para ingenierizar la rxmRuby2 a una versión ratiométrica, de acuerdo a resultados preliminares obtenidos se requiere de mayores estudios sobre las características estructurales y espectrales del

cróforo y residuos circundantes. Este es uno de los grandes objetivos a ser abordado en futuros estudios.

Un resultado destacado de esta tesis ha sido el poder demostrar la aplicabilidad de la línea reportera de *T. brucei* para llevar a cabo un monitoreo *ex vivo* del proceso de infección animal. Los parásitos reporteros expresaron el biosensor bajo condiciones fisiológicas (infección), lo cual no alteró la infectividad y virulencia del patógeno. Totalmente compatible con el curso del proceso infeccioso y los mecanismos de defensa montados por el huésped, el biosensor puso en evidencia que el patógeno circulante en sangre está sometido a estrés oxidativo. Estos resultados son de gran relevancia dado que posibilitan la realización de estudios de monitoreo de cambios redox intracelulares aplicados a entender el proceso de interacción huésped-patógeno así como la evaluación de compuestos y terapias en modelos de infección complejos. Además de permitir el estudio de la bioquímica redox del patógeno, la expresión de la proteína fluorescente roja facilita la detección y cuantificación de parásitos en muestras biológicas tanto intactas como fijadas. Esto no solo reduce el tiempo e incrementa la precisión de las cuantificaciones (ej. parasitemia) sino que abre la puerta a la identificación de nuevos nichos colonizados por el parásito y a comprender mejor la dinámica del proceso infeccioso y patología.

Si bien, no se logró hacer para la tesis de doctorado, una perspectiva que se desprende de este trabajo es avanzar en la co-expresión con la roGFP2 fusionada a un péptido señal que la dirija a mitocondria, pudiendo monitorear en simultáneo, por canales diferentes de fluorescencia que no se solapan, dos compartimentos (citósol y mitocondria) frente a un estado de estrés oxidativo (Sardi, 2016), (Piattoni & Sardi, 2019).

En esta tesis también se desarrollaron biosensores FRET con afinidad por distintos nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc). Tomando como prototipo al biosensor FRET de AMPc creado por (Surdo, 2017), se generó un biosensor que opera por el mismo principio de FRET pero que tiene especificidad por GMPc, el cual se denominó CUTie2. La funcionalidad del biosensor fue validada mediante ensayos *in vitro* con la forma recombinante del mismo. Esto requirió la puesta a punto de la expresión y purificación del biosensor. El comportamiento FRET y afinidad de CUTie2 por GMPc se correspondió con lo inferido por análisis computacionales.

Un aspecto innovador de esta tesis constituyó el desarrollo de biosensores con capacidad de detectar, simultáneamente y en un mismo polipéptido, nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc) y fluctuaciones en la relación tiol/disulfuro de los tioles de bajo peso molecular. Estos

biosensores fueron diseñados sobre dos pares FRET diferentes: CFP/YFP y Clover/mRuby2, y aprovechando: i) la modularidad que ofrece la configuración de biosensor originalmente creada por (Surdo, 2017) y validada en esta tesis (Klein F. , 2021) y ii) la disponibilidad de proteínas fluorescentes redox sensibles caracterizadas previamente (rxYFP; (Ostergaard, 2001)) o en esta tesis (rxmRuby2; (Piattoni & Sardi, 2019)).

El biosensor denominado rxCUTie2 se compone, en el siguiente orden: del módulo rxYFP flanqueado por la región N- y C-terminal del dominio CNBD de la proteína quinasa G humana (PKG), isoforma I, con afinidad por GMPc, seguido de una región espaciadora y finalmente de la proteína dadora de FRET, la CFP. Se exploraron un gran número de condiciones de expresión para incrementar el rendimiento de proteína recombinante soluble, con escaso éxito. No obstante, fue posible obtener una cantidad suficiente para realizar ensayos preliminares que validaron la capacidad del mismo para hacer FRET de manera proporcional a la concentración de GMPc y de reaccionar frente a oxidantes con una disminución en la intensidad de fluorescencia de la rxYFP. No obstante, pudimos notar una interferencia cruzada de ambos procesos. Por ejemplo, la oxidación de rxYFP disminuye la aparente afinidad del CNBD por GMPc o el rendimiento de FRET, mientras que la unión de GMPc por el CNBD disminuye la sensibilidad de rxYFP a la oxidación. Dado que en ambos eventos está involucrada la rxYFP creemos que los cambios conformacionales que acompañan la oxidación de los residuos de cisteína de esta proteína y la unión de GMPc por el CNBD alteran de manera recíproca la dinámica del CNBD y la accesibilidad de oxidantes al sitio activo de la rxYFP, respectivamente. En este sentido, se requieren de mayores estudios para comprender las bases moleculares de estos fenómenos de manera tal que permitan re-ingenierizar este biosensor para optimizar su respuesta, por ejemplo, se podría modificar la configuración del biosensor haciendo un swap de módulos fluorescentes, de manera tal que la rxYFP esté ubicada en posición C-terminal (como lo está la CFP) y la CFP en el medio del CNBD.

Estos resultados son muy importantes para lograr caracterizar y estudiar la respuesta del sensor dual en un modelo celular, ya que van a permitir conocer las capacidades y limitaciones del sensor a la hora de detectar ambas vías de señalización y poder trabajar sobre la discriminación de las señales o conocer la interferencia entre ambas.

Lamentablemente, no se lograron obtener líneas celulares de tripanosomas con niveles de expresión de rxCUTie2 por encima del límite de detección de las técnicas convencionales empleadas: citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Esto nos impidió caracterizar su funcionalidad a nivel celular. Resultó llamativo que este fenómeno ocurriera con biosensores

de nucleótidos cíclicos, pero no con biosensores redox, y nos lleva a especular una posible citotoxicidad del sistema reportero que podría estar interfiriendo con eventos de señalización mediados por GMPc e involucrados en la proliferación celular o la adaptación a estrés (ej. como el originado por la electroporación). Estos interrogantes deberían ser abordados a futuro, así como la exploración de otros sistemas vector de expresión/huésped tripanosomático.

El segundo biosensor dual generado en esta tesis se denominó INF-RXM y se compone, en el siguiente orden: del módulo Clover flanqueado por la región N- y C-terminal del dominio CNBD de la subunidad reguladora IIB de la proteína quinasa A (PKA) con afinidad por AMPc, seguido de una región espaciadora y finalmente de la proteína aceptor de FRET y redox-sensible, la rxmRuby2. Como se podrá notar, en este caso, y por las evidencias obtenidas con rxCUTie2, optamos por intercambiar la posición de los módulos FRET, insertándose la proteína dadora de FRET en el dominio del CNBD. Hemos probado varias estrategias y condiciones de expresión y purificación diferentes que nos permitieron obtener, aunque con bajos rendimientos, la forma recombinante de INF-RXM. Sin embargo, a pesar de que esta forma del biosensor presentó los picos de absorción de fluorescencia correspondientes a cada uno de los módulos fluorescentes que lo componen, no se observó emisión de fluorescencia de rxmRuby2 pero si de Clover. Mediante un ensayo indirecto (medición de la pérdida de intensidad de fluorescencia de Clover por apantallamiento FRET con la rxmRuby2) pudimos inferir que el CNBD es capaz de ligar AMPc e inducir el correspondiente cambio conformacional que aproxima a ambas proteínas fluorescentes. Llamativamente, el biosensor no se comportó de esta forma a nivel intracelular (*E. coli* y *L. tarentolae*), ambiente en el cual fue posible detectar señal de fluorescencia de ambas proteínas.

Experimentos futuros podrían estar dirigidos a la caracterización del sensor dual en la bacteria *E. coli* transformada expresante de la proteína recombinante. Diferentes trabajos en la bibliografía demuestran la capacidad de caracterizar sondas fluorescentes intracelulares que expresan GFP en células procariotas (Jeon, 2022), (Jeon Y. , 2022), (Kang, 2018), (Yoon, 2018). Los diferentes trabajos tienen en común que crecen las bacterias hasta una determinada densidad óptica, y luego exponen las bacterias al estímulo correspondiente al biosensor que estén caracterizando y miden la intensidad de fluorescencia (EGFP) por medio de un espectrofluorímetro a diferentes tiempos de exposición o de respuesta.

Se generó y caracterizó con éxito una línea celular transgénica de la forma infectiva de *L. tarentolae*, la cual posee integrado en su genoma de manera estable el gen de INF-RXM. Si bien

se obtuvo una población celular de *T. cruzi* resistente al antibiótico de selección, tanto el número de parásitos y los niveles de expresión de IFN-RXM alcanzados en este huésped fueron significativamente inferiores a los logrados en la cepa de *L. tarentolae*, lo cual nos motivó a seguir adelante con la caracterización de las líneas celulares reporteras obtenidas en esta última especie. La respuesta de IFN-RXM en *L. tarentolae* frente a estímulos redox fue rápida (min) y reversible tanto de manera espontánea como químicamente inducida (DTT o diamida). En general la respuesta a diferentes estímulos oxidantes guardó una relación directa con la dosis y el mecanismo de acción o tipo de oxidante. Comprobamos que ciertos estímulos fisicoquímicos (temperatura, pH, forskolin o IBMX) descritos en la literatura como inductores de diferenciación y/o interferentes con la señalización mediada por AMPc en *Leishmania sp.* no resultaron efectivos para disparar una respuesta FRET del biosensor en *L. tarentolae*. Sin embargo, pudimos demostrar que la inhibición PDE-específica produjo un incremento tiempo-dependiente en la señal de FRET asociada a una acumulación intracelular de AMPc por inhibición de su degradación. Los estudios realizados con este inhibidor de la PDE de tripanosomátidos destacan la aplicabilidad de nuestro biosensor para validar el efecto “on-target” de compuestos químicos con potencial farmacológico.

Trabajos futuros deberían abordar la optimización de sistemas de expresión de los biosensores FRET recombinantes, tanto los simples como los duales, mediante el análisis de nuevos pares célula/vector o codones. Dado los buenos resultados de expresión de un biosensor dual obtenidos con la forma promastigota de *L. tarentolae*, sería importante tener en perspectiva la generación de una línea reportera de al menos una especie patógena para el ser humano, como ser *L. infantum* (causante de la leishmaniasis visceral), lo cual permitiría iniciar estudios de mayor valor traslacional acerca del rol de estas vías durante el proceso infeccioso y la patogénesis.

Otra alternativa a evaluar podría ser purificar la proteína de la línea transgénica de *L. tarentolae* pLEXSYhyg2 INF-RXM. Numerosos trabajos describen el desarrollo y uso del sistema basado en los parásitos no patogénicos de *Leishmania sp.*, para la expresión de proteínas recombinantes, y de nuevos candidatos vacunales. *L. tarentolae* es la especie más apropiada ya que presenta características únicas, como una alta tasa de crecimiento en comparación con las células eucariotas, medios de cultivo de bajo costo, nivel de bioseguridad bajo, posibilidad para introducir diferentes copias de genes exógenos en el genoma del parásito y producción de proteínas recombinantes con patrones de tipo N-glicosilación de células de mamífero (Niimi, 2012), (Sugino & Niimi, 2012). En comparación a otros sistemas, el sistema desarrollado

en *L. tarentolae* produce grandes rendimientos de proteína recombinante (0,1 – 30 mg/L) (Basile, 2009), se ha demostrado el uso de este sistema de expresión para la expresión de diferentes genes de otras especies de *Leishmania* sp. (LeBowitz, 1990), (Mizbani, 2009), (Mizbani, 2011), (Taheri T. , 2014), así como la expresión de genes heterólogos de otros géneros (Ben-Abdallah, 2011), (Katebi, 2015), (Pirdel, 2012), (Taheri, 2015), (Taromchi, 2013) y la capacidad de expresar proteínas recombinantes con diferentes localizaciones como citoplasmáticas, integrada a membrana y vía secretoria (Katebi, 2015), (Klatt, 2012), (Phan, 2009), (Soleimani, 2006).

Diferentes glicoproteínas recombinantes de uso farmacéutico como no-farmacéutico (ej: eritropoyetina humana, activador tisular de plasminógeno, laminina 332) han sido producidos en este sistema de expresión, y en todos los casos las proteínas mostraron ser biológicamente activas (Hemayatkar, 2010), (Phan, 2009), (Breitling, 2002). Un reciente trabajo de un grupo de investigación del Instituto Pasteur de Montevideo mostró que este parásito no patógeno es capaz de producir una proteína recombinante de uso veterinario, con buen rendimiento, calidad y pureza (Abreu, 2024). A diferencia de la línea celular generada en este trabajo de tesis de doctorado, (Abreu, 2024) utilizan una construcción con el vector pLEXSY-IE-Ble cherry4, dónde el gen de interés está fusionado a una péptido señal de secreción y a una cola de histidina en el extremo N- terminal, favoreciendo la expresión de la proteína recombinante en el sobrenadante del cultivo y su posterior purificación por IMAC. Esta estrategia podría ser exitosa dado que el sistema LEXSY tiene como principal propósito combinar características del sistema procariota (densidad celular alta) con ventajas del sistema eucariota (modificaciones postraduccionales). El mal plegamiento y la baja solubilidad son de los principales problemas asociados al sistema de expresión procariota. La mayoría de las proteínas de organismos eucariotas expresadas en el sistema LEXSY han sido correctamente plegadas y procesadas (Oliveira, 2019).

En resumen, los estudios realizados en esta Tesis permitieron confirmar la hipótesis de trabajo dando lugar a nuevas herramientas biosensoras codificadas genéticamente para el estudio de las vías de señalización por nucleótido cíclico y de control redox tanto en organismos procariotas como eucariotas, siendo nuestro modelo de estudio los tripanosomátidos. Se planteó el desafío biotecnológico de desarrollar un biosensor dual capaz de monitorear en simultáneo cambios redox y nivel de nucleótido cíclico, si bien no se logró caracterizar su respuesta *in vitro*, verificamos su capacidad para responder a estímulos específicos.

Por tanto, se cumplieron los objetivos específicos planteados, habiéndose generado herramientas biotecnológicas (líneas reporteras redox) con gran potencial de aplicación tanto en estudios de investigación básica sobre la biología de tripanosomátidos, incluyendo la interacción con el hospedero, como en líneas de células eucariota de relevancia para la salud humana. Estas herramientas podrían ser útiles para el descubrimiento y caracterización de mecanismo de acción de fármacos contra especies patogénicas, además de brindar información fundamental sobre la dinámica de la señalización celular en estos organismos de manera no invasiva y en tiempo real.

6. Bibliografía

- Abreu, C. (2024). Expression and functional characterization of chimeric recombinant bovine follicle-stimulating hormone produced in *Leishmania tarentolae*. *Microb Biotechnol*. doi:10.1111/1751-7915.14444
- Adams, S. R. (1991). Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells . *Nature*, 694-697.
- Agarwal, S. R. (2017). Compartmentalized cAMP responses to prostaglandin EP2 receptor activation in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 2784-2796. doi:10.1111/bph.13904
- Alibu, V. P. (2005). A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 75-82. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.10.002
- Alice, J. I. (2021). Ensemble learning application to discover new trypanothione synthetase inhibitors. *Mol Divers.*, 1361-1373. doi:10.1007/s11030-021-10265-9
- Allen, M. D. (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun*, 716-721. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.136
- Allen, E. M. (2012). Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins. *Antioxid Redox Signal*, 1748-1763. doi: 10.1089/ars.2012.4644
- Alloatti, A. (2010). Genetic and chemical evaluation of *Trypanosoma brucei* oleate desaturase as a candidate drug target. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0014239
- Alonso, G. D. (2007). TcrPDEA1, a cAMP-specific phosphodiesterase with atypical pharmacological properties from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 72-79. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.12.002
- Alvarez, B. (2022). Basics Concepts of thiol chemistry and biology. En B. Alvarez, M. Comini, G. Salinas, & M. Trujillo, *Redox Chemistry and Biology of Thiols*. Academic Press.
- Ammerman, M. L. (2013). A core MRB1 complex component is indispensable for RNA editing in insect and human infective stages of *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0078015
- Antoine, J. C. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol*, 392-401. doi:10.1016/s0966-842x(98)01324-9
- Aphasizhev, R. (2011). Mitochondrial RNA processing in trypanosomes. *Res Microbiol*, 655-663. doi:10.1016/j.resmic.2011.04.015
- Arias, D. G. (2015). Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin II. *Proteomics*, 95-104. doi:10.1016/j.jprot.2015.03.001

- Ariyanayagam, M. R. (2003). Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 27612-27619. doi:10.1074/jbc.M302750200
- Ariyanayagam, M. R. (2001). Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*, 189-198. doi:10.1016/s0166-6851(01)00285-7
- Arsene, F. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*, 3-9. doi:10.1016/s0168-1605(00)00206-3
- Arumugam, P. (2019). The MmpS6-MmpL6 Operon Is an Oxidative Stress Response System Providing Selective Advantage to *Mycobacterium tuberculosis* in Stress. *J Infect Dis.*, 459-469. doi:10.1093/infdis/jiy526
- Bachmaier, S. (2023). Novel kinetoplastid-specific cAMP binding proteins identified by RNAi screening for cAMP resistance in *Trypanosoma brucei*. *Front Cell Infect Microbiol*. doi:10.3389/fcimb.2023.1204707
- Bacskai, B. J. (1993). Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science*, 222-226. doi:10.1126/science.7682336
- Baird, G. S. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11984-11989. doi:10.1073/pnas.97.22.11984
- Bajar, B. (2016). Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Sci Rep*. doi:https://doi.org/10.1038/srep20889
- Baker, D. (2004). Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol Microbiol*, 1229-1242. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04067.x
- Balleza, E. (2017). Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nat Methods*, 47-51. doi:10.1038/nmeth.4509
- Banach-Latapy, A. (2013). Redox-sensitive YFP sensors for monitoring dynamic compartment-specific glutathione redox state. *Free Radic Biol Med*, 436-445. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.033
- Banerjee, U. (2015). Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian *rapgef3* gene: Structure, function and therapeutics. *Gene*, 157-167. doi:10.1016/j.gene.2015.06.063
- Bao, Y. (2008). Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 4757-4763. doi:10.1128/IAI.00527-08
- Barford, D. (2004). The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol*, 679-686.

- Barrett, M. P. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet*, 1469-1480. doi:10.1016/S0140-6736(03)14694-6
- Basile, G. (2009). Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol*, 273-278. doi:10.1007/s12033-009-9213-5
- Bastug-Özel, Z. (2019). Heart failure leads to altered β 2-adrenoceptor/cyclic adenosine monophosphate dynamics in the sarcolemmal phospholemman/Na,K ATPase microdomain. *Cardiovasc Res.*, 546-55. doi:10.1093/cvr/cvy221
- Basu, S. (2013). Divergence of Erv1-associated mitochondrial import and export pathways in trypanosomes and anaerobic protists. *Eukaryot Cell*, 343-355. doi:10.1128/EC.00304-12
- Beavo, J. A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*, 725-748. doi:10.1152/physrev.1995.75.4.725
- Belousov, V. V. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods*, 281-286. doi:10.1038/nmeth866
- Ben-Abdallah. (2011). Production of soluble, active acetyl serotonin methyl transferase in *Leishmania tarentolae*. *Protein Expr Purif*, 114-118. doi:10.1016/j.pep.2010.07.011
- Bender, A. T. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, 488-520. doi:10.1124/pr.58.3.5
- Benítez, D. (2024). Expanding the applications of a bioluminescent mouse infection model of acute African trypanosomiasis. *Front. Chem. Biol.* doi:https://doi.org/10.3389/fchbi.2024.1433511
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.*, 240-251. doi:10.1016/j.pep.2011.10.009
- Berman, H. M. (2004). The cAMP binding domain: An ancient signaling module. *PNAS*, 45-50. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.040857910
- Berrera, M. (2008). A toolkit for real-time detection of cAMP: insights into compartmentalized signaling. *Handb Exp Pharmacol*, 285-298. doi:10.1007/978-3-540-72843-6_12
- Berriman, M. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 416-422. doi: 10.1126/science.1112642.
- Bhaskar, A. (2014). Reengineering redox sensitive GFP to measure mycothiol redox potential of *Mycobacterium tuberculosis* during infection. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1003902
- Bhattacharya, A. (2009). Role of a differentially expressed cAMP phosphodiesterase in regulating the induction of resistance against oxidative damage in *Leishmania donovani*. *Free Radic Biol Med.*, 1494-1506. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.025

- Bilan, D. S. (2013). HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chem Biol*, 535-542. doi:10.1021/cb300625g
- Bilan, D. S. (2016). New tools for redox biology: from imaging to manipulation. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.004
- Biosearch technologies*. (s.f.). Obtenido de <https://shop.biosearchtech.com/competent-cells-for-transformation/protein-expression/overexpress-chemically-competent-cells/p/COMCEL-004>
- Biswas, A. (2017). Role of leishmanial acidocalcisomal pyrophosphatase in the cAMP homeostasis in phagolysosome conditions required for intra-macrophage survival. *Int J Biochem Cell Biol*, 1-13. doi:10.1016/j.biocel.2017.03.001
- Björnberg, O. (2006). Measuring intracellular redox conditions using GFP-based sensors. *Antioxid Redox Signal*, 354-361. doi:10.1089/ars.2006.8.354
- Blaazer, A. R. (2015). Fragment-based screening in tandem with phenotypic screening provides novel antiparasitic hits. *J Biomol Screen.*, 131-140. doi:10.1177/1087057114549735
- Blum, B. (1990). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell*, 189-198. doi:10.1016/0092-8674(90)90735-w
- Blum, J. J. (1999). Kinetics of release of amino acids by *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.*, 101-104. doi:10.1016/s0166-6851(99)00071-7
- Bonilla, M. (2016). Selenoproteins of African trypanosomes are dispensable for parasite survival in a mammalian host. *Mol Biochem Parasitol*, 13-19. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.03.002
- Boveris, A. (1980). Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.*, 643-648. doi:10.1042/bj1880643
- Boveris, A. (1977). Evaluation of the horseradish peroxidase-scopoletin method for the measurement of hydrogen peroxide formation in biological systems. *Anal Biochem*, 145-158. doi:10.1016/0003-2697(77)90634-0
- Bräutigam, L. (2016). Hypoxic Signaling and the Cellular Redox Tumor Environment Determine Sensitivity to MTH1 Inhibition. *Cancer Res*, 2366-2375. doi:https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2380
- Breckwoldt, M. O. (2014). Multiparametric optical analysis of mitochondrial redox signals during neuronal physiology and pathology in vivo. *Nat Med.*, 555-560. doi:10.1038/nm.3520
- Breitling, R. (2002). Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr Purif.*, 209-218. doi:10.1016/s1046-5928(02)00001-3

- Brigelius-Flohé, R. (2011). Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*, 2335-2381.
- Brun, R. (2010). Human African trypanosomiasis. *Lancet.*, 148-159. doi:10.1016/S0140-6736(09)60829-1
- Bundey, R. A. (2006). Adenylyl cyclase 6 overexpression decreases the permeability of endothelial monolayers via preferential enhancement of prostacyclin receptor function. *Mol Pharmacol.*, 1700-1707. doi:10.1124/mol.106.028035
- Burchmore, R. J. (1995). Glucose transport in amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, 77-86. doi:10.1016/0166-6851(95)02485-9
- Butt, E. (1993). The cGMP-dependent protein kinase--gene, protein, and function. *Neurochem Res*, 27-42. doi:10.1007/BF00966920
- Cabiscol, E. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3-8.
- Cabrita, L. (2004). Protein expression and refolding--a practical guide to getting the most out of inclusion bodies. *Biotechnol Annu Rev*, 31-50. doi:10.1016/S1387-2656(04)10002-1
- Campbell. (2018). Crystal Structure of Green Fluorescent Protein Clover and Design of Clover-Based Redox Sensors. *Structure*, 225-237. doi:10.1016/j.str.2017.12.006
- Campbell, J. C. (2016). Structural Basis of Cyclic Nucleotide Selectivity in cGMP-dependent Protein Kinase II. *J Biol Chem*, 5623-5633. doi:10.1074/jbc.M115.691303
- Campbell, R. E. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 7877-7882. doi:10.1073/pnas.082243699
- Cannon, M. B., & Remington, S. J. (2005). Re-engineering redox-sensitive green fluorescent protein for improved response rate. *Protein Sci.*, 45-57. doi:10.1110/ps.051734306
- Carlberg, I. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol.*, 484-490. doi:10.1016/s0076-6879(85)13062-4
- CDC. (2012). Obtenido de Centers for disease control and prevention: <https://www.cdc.gov/spanish/index.html>
- Ceylan, S. (2010). The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism. *J Biol Chem*, 35224-35237. doi:10.1074/jbc.M110.165860
- Chae, H. Z. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem*, 27670-27678.
- Chai, Y.-C. (2023). Glutathione and Glutaredoxin-Key Players in Cellular Redox Homeostasis and Signaling. *Antioxidants (Basel)*, 1553. doi:10.3390/antiox12081553

- Chandrangsu, P. (2018). The Role of Bacillithiol in Gram-Positive Firmicutes. *Antioxid Redox Signal*, 445-462. doi:10.1089/ars.2017.7057
- Chao, Y.-C. (2019). Imaging cAMP nanodomains in the heart. *Biochem Soc Trans*, 1383-1392. doi:10.1042/BST20190245
- Chen. (2003). Development of RNA interference revertants in *Trypanosoma brucei* cell lines generated with a double stranded RNA expression construct driven by two opposing promoters. *Mol Biochem Parasitol*, 275-279. doi:10.1016/s0166-6851(02)00276-1
- Chen, H.-L. (2002). cAMP binding protein assay for widespread use in cell signaling studies. *Biotechniques*, 66-68. doi:10.2144/02331st03
- Chen, Y. (2003). Development of RNA interference revertants in *Trypanosoma brucei* cell lines generated with a double stranded RNA expression construct driven by two opposing promoters. *Mol Biochem Parasitol*, 275-279. doi:10.1016/s0166-6851(02)00276-1
- Chen, Y. (2016). Mitochondrial Redox Signaling and. *Cancers*. doi:10.3390/cancers8040040
- Cheng, X. (2001). Differential binding of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit isoforms Ialpha and IIbeta to the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, 4102-4108. doi:10.1074/jbc.M006447200
- Chiulli, A. C. (2000). A novel high throughput chemiluminescent assay for the measurement of cellular cyclic adenosine monophosphate levels. *J. Biomol Screen*, 239-248. doi:10.1177/108705710000500406
- Clayton, C. (2019). Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol*. doi:10.1098/rsob.190072
- Comini, M. A. (2008). Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes. *J Biol Chem*, 27785-27798. doi:10.1074/jbc.M802010200
- Comini, M. A. (2016). Measurement and meaning of cellular thiol:disulfide redox status. *Free Radic Res*, 246-271. doi:10.3109/10715762.2015.1110241
- Comini, M. A. (2007). Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *Biochem J.*, 43-49. doi:10.1042/BJ20061341
- Cooper, D. M. (2014). Adenylate cyclase-centred microdomains. *Biochem J.*, 199-213. doi:10.1042/BJ20140560
- Correa, A. (2015). Overcoming the solubility problem in *E. coli*: available approaches for recombinant protein production. *Methods Mol Biol*, 27-44. doi:10.1007/978-1-4939-2205-5_2

- Criddle, D. N. (2006). Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*, 40485-40492. doi:10.1074/jbc.M607704200
- D'Angelo, M. (2002). A novel calcium-stimulated adenylyl cyclase from *Trypanosoma cruzi*, which interacts with the structural flagellar protein paraflagellar rod. *J Biol Chem.*, 35025-35034. doi:10.1074/jbc.M204696200
- Dalle-Donne, I. (2011). S-glutathiolation in life and death decisions of the cell. *Free Radic Res*, 3-15.
- Day, R. N. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev.*, 2887-2921. doi:10.1039/b901966a
- De Armas, M. I. (2019). Rapid peroxynitrite reduction by human peroxiredoxin 3: Implications for the fate of oxidants in mitochondria. *Free Radic Biol Med.*, 369-378.
- De Marco, A. (2007). Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nat Protoc.*, 2632-2639. doi:10.1038/nprot.2007.400
- de Rooij, J. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 474-477. doi:10.1038/24884
- Dean, K. M. (2014). Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging. *Nat Chem Biol*, 512-523. doi:10.1038/nchembio.1556
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 3217-3266.
- Di Benedetto, G. (2008). Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ Res.*, 836-844. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.174813
- Diechtierow, M. (2011). A tryparedoxin-dependent peroxidase protects African trypanosomes from membrane damage. *Free Radic Biol Med*, 856-868. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.014
- DiPilato, L. M. (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 16513-16518. doi:10.1073/pnas.0405973101
- Docampo, R. (2011). The role of acidocalcisomes in the stress response of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol.*, 307-324. doi:10.1016/B978-0-12-385863-4.00014-9
- Dooley, C. T. (2004). Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*, 22284-22293. doi:10.1074/jbc.M312847200

- Doukas, A. (2019). Heterologous expression of the mammalian sodium-nucleobase transporter rSNBT1 in *Leishmania tarentolae*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1546-1557. doi:10.1016/j.bbamem.2019.07.001
- Dumon-Seignovert, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif*, 203-206. doi:10.1016/j.pep.2004.04.025
- Dye, C. (1989). Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia: results of a preliminary epidemiological survey in Al-Ahsa oasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 493-498. doi:10.1016/0035-9203(89)90265-4
- Ebersoll, S. (2018). A glutaredoxin in the mitochondrial intermembrane space has stage-specific functions in the thermo-tolerance and proliferation of African trypanosomes. *Redox Biol.*, 532-547. doi:10.1016/j.redox.2018.01.011
- Ebersoll, S. (2020). A tryparedoxin-coupled biosensor reveals a mitochondrial trypanothione metabolism in trypanosomes. *Elife*. doi:10.7554/eLife.53227
- El-Sayed, NM. (2005). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*, 404-409. doi: 10.1126/science.1112181
- Elbaz-Alon, Y. (2014). A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev. Cell*, 95-102. doi:10.1016/j.devcel.2014.06.007
- Elbaz-Alon, Y. (2014). The yeast oligopeptide transporter Opt2 is localized to peroxisomes and affects glutathione redox homeostasis. *FEMS Yeast Res*, 1055-1067. doi:10.1111/1567-1364.12196
- Elwasila, M. (1988). *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 from the gecko *Tarentola annularis* in the Sudan. *Parasitol Res.*, 591-592. doi:10.1007/BF00531640
- Ermakova, Y. G. (2014). Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Commun*, 5222. doi:10.1038/ncomms6222
- Fairlamb, A. H. (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, 1485-1487. doi:10.1126/science.3883489
- Fan, Y. (2015). Monitoring redox dynamics in living cells with a redox-sensitive red fluorescent protein. *Anal Chem.*, 2802-2810. doi:10.1021/ac5041988
- Fan, Y. (2016). Development of redox-sensitive red fluorescent proteins for imaging redox dynamics in cellular compartments. *Anal Bioanal Chem.*, 2901-2911. doi:10.1007/s00216-015-9280-3
- Fan, Y. (2017). Monitoring thioredoxin redox with a genetically encoded red fluorescent biosensor. *Nat Chem Biol*. doi: 10.1038/nchembio.2417

- Feng, S. (2019). Bright split red fluorescent proteins for the visualization of endogenous proteins and synapses. *Comm Biol*. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0589-x>.
- Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett*, 52-54. doi:10.1016/s0014-5793(00)01669-0
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, 7-15.
- Fisher, A. B. (1999). Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, 326-334.
- Fisk, J. C. (2008). TbRGG2, an essential RNA editing accessory factor in two Trypanosoma brucei life cycle stages. *J Biol Chem*, 23016-23025. doi:10.1074/jbc.M801021200
- Frandsen, E. K. (1976). A simple ultrasensitive method for the assay of cyclic AMP and cyclic GMP in tissues. *Life Sci.*, 529-541. doi:10.1016/0024-3205(76)90331-3
- Frasch, A. C. (1994). Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between Trypanosoma cruzi and the mammalian host. *Parasitology*. doi:10.1017/s0031182000075703
- Frasch, A. C. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in Trypanosoma cruzi. *Parasitol Today.*, 282-286. doi:10.1016/s0169-4758(00)01698-7
- Fritsche, C. (2007). Characterization of the growth behavior of Leishmania tarentolae: a new expression system for recombinant proteins. *J Basic Microbiol*, 384-393. doi:10.1002/jobm.200710111
- Froese, A. (2015). Imaging alterations of cardiomyocyte cAMP microdomains in disease. *Front Pharmacol*. doi:10.3389/fphar.2015.00172
- Fujino, G. (2006). Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol*, 427-435. doi:10.1016/j.semcancer.2006.09.003
- Fussell, R. C. (2018). *OPTIMIZATION OF PROTEIN PURIFICATION PATHS FOR CLOVER-RUBY2 FLUORESCENT PROTEINS FOR IN VIVO KINETIC MODEL DEVELOPMENT*. Macon, GA: Mercer University.
- Gaballa, A. (2010). Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 6482-6486. doi:10.1073/pnas.1000928107
- Gaballa, A. (2014). Redox Regulation in Bacillus subtilis: The Bacilliredoxins BrxA(YphP) and BrxB(YqiW) Function in De-Bacillithiolation of S-Bacillithiolated OhrR and MetE. *Antioxid Redox Signal*, 357-367. doi: 10.1089/ars.2013.5327
- Galvan, D. (2019). Drp1S600 phosphorylation regulates mitochondrial fission and progression of nephropathy in diabetic mice. *J Clin Invest*, 2807-2823. doi:10.1172/JCI127277

- Galvan, D. L. (2017). The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney Int.*, 1051-1057. doi:10.1016/j.kint.2017.05.034
- Gancedo, J. M. (2013). Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 645-668. doi:10.1111/brv.12020
- Garbers, D. L. (2006). Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol Metab*, 251-258. doi:10.1016/j.tem.2006.06.006
- Gasteiger, E. (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the Expasy Server*. (J. M. Walker, Editor) Obtenido de Expasy: <https://web.expasy.org/protparam/protpar-ref.html>
- Gilman, A. G. (1970). A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 305-312. doi:10.1073/pnas.67.1.305
- Giordani, F. (2016). The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*, 1862-1889. doi:10.1017/S0031182016001268
- Gluzn, E. (2011). The kinetoplast duplication cycle in *Trypanosoma brucei* is orchestrated by cytoskeleton-mediated cell morphogenesis. *Mol Cell Biol*, 1012-1021. doi:10.1128/MCB.01176-10
- Goedhart, J. (2010). Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat. Methods*, 137-139. doi:10.1038/nmeth.1415
- Gomez-Eichelmann, M. C. (1988). Comparison of several lizard *Leishmania* species and strains in terms of kinetoplast minicircle and maxicircle DNA sequences, nuclear chromosomes, and membrane lipids. *Mol Biochem Parasitol*, 143-158. doi:10.1016/0166-6851(88)90034-5
- Gommel, D. U. (1997). Catalytic characteristics of trypanredoxin. *Eur J Biochem*, 913-918. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00913.x
- Gonzalez, A. C. (2023). A FRET-based cGMP biosensor in *Drosophila*. *MicroPubl Biol*. doi:10.17912/micropub.biology.000887
- Goto, H. (2004). Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 615-623. doi:10.1590/s0100-879x2004000400020
- Gould, M. K. (2013). Cyclic AMP effectors in African trypanosomes revealed by genome-scale RNA interference library screening for resistance to the phosphodiesterase inhibitor CpdA. *Antimicrob Agents Chemother*, 4882-4893. doi:10.1128/AAC.00508-13
- Gould, M. K. (2011). Cyclic-nucleotide signalling in protozoa. *FEMS Microbiol Rev*, 515-541. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00262.x
- Gould, M. K. & de Koning, H. P. (2010). Cyclic-nucleotide signalling in protozoa. *FEMS Microbiol Rev.*, 515-541. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00262.x

- Grasseti, D. R. (1967). Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch Biochem Biophys.*, 41-49. doi:10.1016/0003-9861(67)90426-2
- Gruteser, N. (2020). Establishing a sensitive fluorescence-based quantification method for cyclic nucleotides. *BMC Biotechnol.*, 47. doi:10.1186/s12896-020-00633-y
- Guellich, A. (2014). Cyclic AMP synthesis and hydrolysis in the normal and failing heart. *Pflugers Arch.*, 1163-1175. doi:10.1007/s00424-014-1515-1
- Guo, B. (2002). PCR Cloning Protocols. En B.-Y. Chen, *Methods in molecular biology* (págs. 111-124). Totowa: Humana Press Inc.
- Gutscher, M. (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods*, 553-559. doi:10.1038/nmeth.1212
- Gutscher, M. (2009). Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases. *J Biol Chem*, 31532-31540. doi:10.1074/jbc.M109.059246
- Han, S.-J. (2017). Redox regulation of the tumor suppressor PTEN by the thioredoxin system and cumene hydroperoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 277-286. doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.029
- Hansen, J. M. (2006). Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic Biol Mol*, 138-145. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.023
- Hanson, G. T. (2004). Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*, 13044-13053. doi:10.1074/jbc.M312846200Hanson, G. T. (s.f.).
- Harper, J. F. (1975). Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'⁰ acetylation by acetic anhydride in aqueous solution. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 207-218.
- Hashimi, H. (2009). Kinetoplastid guide RNA biogenesis is dependent on subunits of the mitochondrial RNA binding complex 1 and mitochondrial RNA polymerase. *RNA*, 588-599. doi:10.1261/rna.1411809
- Hebisch, E. (2013). High variation of fluorescence protein maturation times in closely related *Escherichia coli* strains. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0075991
- Heijman, J. (2013). Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol*, 90-98. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.09.006
- Heim, R. (1995). Improved green fluorescence. *Nature*, 663-664. doi:10.1038/373663b0
- Hemayatkar, M. (2010). Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in *Leishmania tarentolae*. *Biotechnol J*, 1198-1206. doi:10.1002/biot.201000233

- Herget, S. (2008). Real-time monitoring of phosphodiesterase inhibition in intact cells. *Cell. Signal*, 1423-1431. doi:10.1016/j.cellsig.2008.03.011
- Hiller, C. (2014). Cytosolic peroxidases protect the lysosome of bloodstream African trypanosomes from iron-mediated membrane damage. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1004075
- Hofmann, F. (2009). cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol*, 137-162. doi:10.1007/978-3-540-68964-5_8
- Hofmann, F. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev.*, 1-23. doi:10.1152/physrev.00015.2005
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem*, 237-271. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.001321
- Hotz, H. R. (1995). Role of 3'-untranslated regions in the regulation of hexose transporter mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 1-14. doi:10.1016/0166-6851(95)02503-0
- Hotz, H. R. (1998). PARP gene expression: control at many levels. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 131-143. doi:https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00196-5
- Houslay, M. D. (1997). Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci.*, 217-224. doi:10.1016/s0968-0004(97)01050-5
- Hu, J. (2008). The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem*, 29126-29134. doi:10.1074/jbc.M803028200
- Huang, H. (2014). Structural basis for cyclic-nucleotide selectivity and cGMP-selective activation of PKG I. *Structure*, 116-124. doi:10.1016/j.str.2013.09.021
- Huang, H. (2011). Signal transduction in *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol*, 325-344. doi:10.1016/B978-0-12-385863-4.00015-0
- Humphries. (2005). Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification. *J Biol Chem*, 2750-2758. doi:10.1074/jbc.M410242200
- Humphries, K. M. (2002). Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *J Biol. Chem*, 43505-43511. doi:10.1074/jbc.M207088200
- Humphries, K. M. (2007). Redox regulation of cAMP-dependent protein kinase signaling: kinase versus phosphatase inactivation. *J Biol Chem*, 22072-22079. doi:10.1074/jbc.M702582200
- Hung, Y. P. (2011). Imaging cytosolic NADH-NAD(+) redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab.*, 545-554. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.012

- Iizuka, R. (2011). Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins. *Analytical Biochemistry*, 173-178. doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.03.036
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Review Microbiology*, 395-418. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938
- Ivens, A. C. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 436-442. doi: 10.1126/science.1112680.
- Jäger, A. V. (2014). Identification of novel cyclic nucleotide binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 104-112. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.02.002
- Jeon, Y. (2022). Design of Pb(II)-Specific *E. coli*-Based Biosensors by Engineering Regulatory Proteins and Host Cells. *Front Microbiol*. doi:10.3389/fmicb.2022.881050
- Jeon, Y. (2022). Development of novel *Escherichia coli* cell-based biosensors to monitor Mn(II) in environmental systems. *Front Microbiol*. doi:10.3389/fmicb.2022.1051926
- Jiang, K. (2006). Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 397-403. doi:10.1104/pp.106.078246
- Jiang, X. (2017). Quantitative real-time imaging of glutathione. *Nature Communications*.
- Johnson, D. A. (2001). Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev*, 2243-2270. doi:10.1021/cr000226k
- Jones, D. P. (2010). Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis. *Journal of Internal Medicine*, 432-448.
- Jones, D. P., & Sies, H. (2015). The Redox Code. *Antioxid Redox Signal*, 734-746. doi:10.1089/ars.2015.6247
- Jørgensen, M. L. (2014). Expression of single-chain variable fragments fused with the Fc-region of rabbit IgG in *Leishmania tarentolae*. *Microb Cell Fact*. doi:10.1186/1475-2859-13-9
- Kang, Y. (2018). Enhancing the copper-sensing capability of *Escherichia coli*-based whole-cell bioreporters by genetic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1513-1521. doi:10.1007/s00253-017-8677-7
- Karmakar, S. (2006). Regulation of guanylyl cyclase by intracellular Ca²⁺ in relation to the infectivity of the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1277-1289. doi:10.1016/j.biocel.2006.01.002
- Katebi, A. (2015). *Leishmania tarentolae* secreting the sand fly salivary antigen PpSP15 confers protection against *Leishmania major* infection in a susceptible BALB/c mice model. *Mol Immunol.*, 501-511. doi:10.1016/j.molimm.2015.08.001
- Kawasaki, H. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, 2275-2279. doi:10.1126/science.282.5397.2275

- Killick-Kendrick, R. (1986). The taxonomy of Leishmania-like parasites of reptiles. En J. A. Rioux, *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse* (págs. 143-148). Montpellier: IMEEE.
- Kim, C. (2007). PKA-I Holoenzyme Structure Reveals a Mechanism for cAMP-Dependent Activation. *Cell*, 1032-1043. doi:10.1016/j.cell.2007.07.018
- Kim, K. (1988). The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem*, 4704-4711.
- Kinderman, F. S. (2006). A dynamic mechanism for AKAP binding to RII isoforms of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell*, 397-408. doi:10.1016/j.molcel.2006.09.015
- King-keller, S. (2010). Chemical validation of phosphodiesterase C as a chemotherapeutic target in Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*, 3738-3745. doi:10.1128/AAC.00313-10
- Klatt, S. (2012). Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in Leishmania tarentolae. *Microb Cell Fact*. doi:10.1186/1475-2859-11-97
- Klatt, S. (2019). Leishmania tarentolae: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLoS Negl Trop Dis*. doi:10.1371/journal.pntd.0007424
- Klein, F. (2022). How to Make the CUTiest Sensor in Three Simple Steps for Computational Pedestrians. *Methods Mol Biol*, 255-264. doi:10.1007/978-1-0716-2245-2_16
- Klein, F. (2021). CUTie2: The Attack of the Cyclic Nucleotide Sensor Clones. *Front. Mol. Biosci*. doi:https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.629773
- Knighton, D. R. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, 407-414. doi:10.1126/science.1862342
- Knighton, D. R. (1991). Crystallization studies of cAMP-dependent protein kinase. Cocrystals of the catalytic subunit with a 20 amino acid residue peptide inhibitor and MgATP diffract to 3.0 Å resolution. *J. Mol Biol*, 217-220. doi:10.1016/0022-2836(91)90005-q
- Kojer, K. (2012). Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. *EMBO J*, 3169-3182. doi: 10.1038/emboj.2012.165
- Kojer, K. (2015). Kinetic control by limiting glutaredoxin amounts enables thiol oxidation in the reducing mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Cell*, 195-204. doi:10.1091/mbc.E14-10-1422
- Koning, H. P. de (2012). Pharmacological validation of Trypanosoma brucei phosphodiesterases as novel drug targets. *J Infect Dis*, 229-237. doi:10.1093/infdis/jir857

- Koning, H. P. de (2017). Drug resistance in protozoan parasites. *Emerg Top Life Sci*, 627-632. doi:10.1042/ETLS20170113
- Koschinski, A. (2015). A novel approach combining real-time imaging and the patch-clamp technique to calibrate FRET-based reporters for cAMP in their cellular microenvironment. *Methods Mol Biol*, 25-40. doi:10.1007/978-1-4939-2537-7_3
- Kosower, N. S. (1969). Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun*, 593-596. doi:10.1016/0006-291x(69)90850-x
- Kostic, M. M. (1997). Altered expression of PDE1 and PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 3135-3146. doi:10.1006/jmcc.1997.0544
- Krauth-Siegel, R. L. (1987). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem*, 123-128. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb11002.x
- Krauth-Siegel, R. L. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1236-1248. doi:10.1016/j.bbagen.2008.03.006
- Krauth-Siegel, R. L. & Comini, M. A. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1236-1248. doi:10.1016/j.bbagen.2008.03.006
- Kredel, S. (2009). mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0004391
- Kremers, G. J. (2006). Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. *Biochemistry*, 6570-6580. doi:10.1021/bi0516273
- Kremers, G. J. (2009). Photoconversion in orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods*, 355-358. doi:10.1038/nmeth.1319
- Kunz, S. (2017). The single cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase of the intestinal parasite *Giardia lamblia* represents a potential drug target. *PLoS Negl Trop Dis*. doi:10.1371/journal.pntd.0005891
- Kushnir, S. (2005). Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expr Purif*, 37-46. doi:10.1016/j.pep.2005.03.004
- Kutateladze, T. G. (2007). Mechanistic similarities in docking of the FYVE and PX domains to phosphatidylinositol 3-phosphate containing membranes. *Prog Lipid Res.*, 315-327. doi:10.1016/j.plipres.2007.06.001

- Kwok, S. (2008). Genetically encoded probe for fluorescence lifetime imaging of CaMKII activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 519-525. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.070
- Kwon, J. (2004). Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 16419-16424. doi:10.1073/pnas.0407396101
- Lam, A. J. (2012). Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat Methods*, 1005-1012. doi:10.1038/nmeth.2171
- Langer, T. (2017). Expression and purification of the extracellular domains of human glycoprotein VI (GPVI) and the receptor for advanced glycation end products (RAGE) from *Rattus norvegicus* in *Leishmania tarentolae*. *Prep Biochem Biotechnol*, 1008-1015. doi:10.1080/10826068.2017.1365252
- Laxman, S. (2007). Cyclic nucleotide signaling mechanisms in trypanosomes: possible targets for therapeutic agents. *Mol Interv*, 203-215. doi:10.1124/mi.7.4.7
- LeBowitz, J. H. (1990). Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 9736-9740. doi:10.1073/pnas.87.24.9736
- Lee, S. B. (2006). Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J Biol Chem*, 36228-36235. doi:10.1074/jbc.M606702200
- Lefkimmiatis, K. (2014). cAMP signaling in subcellular compartments. *Pharmacology and Therapeutics*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.03.008
- Lei, S.-P. (1987). Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *J Bacteriol*, 4379-4383. doi:10.1128/jb.169.9.4379-4383.1987
- Linzner, N. (2019). *Staphylococcus aureus* Uses the Bacilliredoxin (BrxAB)/Bacillithiol Disulfide Reductase (YpdA) Redox Pathway to Defend Against Oxidative Stress Under Infections. *Front Microbiol*. doi:10.3389/fmicb.2019.01355
- Liu, S. (2011). FRET-based direct detection of dynamic protein kinase A activity on the sarcoplasmic reticulum in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 581-586. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.116
- Loi, V. V. (2017). Real-Time Imaging of the Bacillithiol Redox Potential in the Human Pathogen *Staphylococcus aureus* Using a Genetically Encoded Bacilliredoxin-Fused Redox Biosensor. *Antioxid Redox Signal*, 835-848. doi:10.1089/ars.2016.6733
- Loughney, K. (1996). Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Biol Chem*, 796-806. doi:10.1074/jbc.271.2.796
- Lüdemann, H. (1998). *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Lett*, 381-385. doi:10.1016/s0014-5793(98)00793-5

- Lukeš, J. (2018). Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *Trends Parasitol.*, 466-480. doi:10.1016/j.pt.2018.03.002
- Lukyanov, K. A. (2014). Genetically encoded fluorescent redox sensors. *Biochim Biophys Acta*, 745-756. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.030
- Lunn, C. A. (1984). Amplification and purification of plasmid-encoded thioredoxin from *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem.*, 10469-10474.
- MacGregor, P. (2013). Stable transformation of pleomorphic bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60-62. doi:https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.06.007
- Machado, M. R. (2016). SIRAH tools: mapping, backmapping and visualization of coarse-grained models. *Bioinformatics*, 1568-1570. doi:https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw020
- MacNeil, A. (2020). Global Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Meeting Global Targets — Worldwide, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 281-285.
- Mahadev, K. (2001). Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 48662-48669. doi:10.1074/jbc.M105061200
- Makin, L. (2015). cAMP signalling in trypanosomatids: role in pathogenesis and as a drug target. *Trends Parasitol*, 373-379. doi:10.1016/j.pt.2015.04.014
- Manganiello, V. C. (1999). Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents. *Thromb Haemost*, 407-411.
- Mansfield, J. M. (2005). Regulation of innate and acquired immunity in African trypanosomiasis. *Parasite Immunol.*, 361-371. doi:10.1111/j.1365-3024.2005.00791.x
- Manta, B. (2013). Iron–Sulfur Cluster Binding by Mitochondrial Monothiol Glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: Molecular Basis of Iron–Sulfur Cluster Coordination and Relevance for Parasite Infectivity. *Antioxid Redox Signal*, 665-682. doi:10.1089/ars.2012.4859
- Manta, B. (2019). Kinetic studies reveal a key role of a redox-active glutaredoxin in the evolution of the thiol-redox metabolism of trypanosomatid parasites. *J Biol Chem.*, 3235-3248. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006366
- Marin-Neto, J. A. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 1109-1123. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296
- Markvicheva, K. N. (2011). A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range. *Bioorg Med Chem*, 1079-1084. doi:10.1016/j.bmc.2010.07.014

- Maroli, M. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*, 123-147. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x
- Matulef, K. (2003). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell*, 23-44. doi:https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154854
- Maya, J. D. (1997). Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 101-106.
- McLatchie, A. P. (2013). Highly Sensitive In Vivo Imaging of *Trypanosoma brucei* Expressing "Red-Shifted" Luciferase. *PLoS Negl. Trop. Dis.* doi:https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002571
- Meacci, E. (1992). Molecular cloning and expression of human myocardial cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 3721-3725. doi:10.1073/pnas.89.9.3721
- Melo, E. P. (2017). TriPer, an optical probe tuned to the endoplasmic reticulum tracks changes in luminal H₂O₂. *BMC Biol.* doi:10.1186/s12915-017-0367-5
- Meyer, A. (2010). Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal*, 621-650. doi:10.1089/ars.2009.2948k
- Meyer, A. (2007). Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J.*, 973-986. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03280.x
- Mika, D. (2012). PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 323-329. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.016
- Mikheyeva, I. V. (2019). YpdA, a putative bacillithiol disulfide reductase, contributes to cellular redox homeostasis and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 1039-1056. doi:10.1111/mmi.14207
- Miroux, B. (2004). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutants hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 203-206. doi:10.1006/jmbi.1996.0399
- Mishin, A. S. (2015). Novel uses of fluorescent proteins. *Curr Opin Chem Biol*, 1-9. doi:10.1016/j.cbpa.2015.05.002
- Mizbani, A. (2011). Effect of A2 gene on infectivity of the nonpathogenic parasite *Leishmania tarentolae*. *Parasitol Res.*, 793-799. doi:10.1007/s00436-011-2325-4
- Mizbani, A. (2009). Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 53-62. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.114

- Mizuno, H. (2001). Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*, 2502-2510. doi:10.1021/bi002263b
- Montemartini, M. (1998). Sequence, heterologous expression and functional characterization of a novel trypanredoxin from *Crithidia fasciculata*. *Biol Chem.*, 1137-1142. doi:10.1515/bchm.1998.379.8-9.1137
- Morgan, B. (2016). Real-time monitoring of basal H₂O₂ levels with peroxiredoxin-based probes. *Nat Chem Biol*, 437-443. doi:10.1038/nchembio.2067
- Moseler, A. (2021). *Arabidopsis thaliana* 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases interact with and are protected by reducing systems. *J Biol Chem*. doi:10.1016/j.jbc.2021.100429
- Motyka, S. A. (2004). RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol*, 362-368. doi:10.1016/j.mib.2004.06.004
- Moutiez, M. (1995). Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*, 433-437. doi:10.1042/bj3100433
- Mukhopadhyay, A. G. (2016). Reactivation of flagellar motility in demembranated *Leishmania* reveals role of cAMP in flagellar wave reversal to ciliary waveform. *Sci Rep*. doi:10.1038/srep37308
- Muller, A. (2017). Systematic in vitro assessment of responses of roGFP2-based probes to physiologically relevant oxidant species. *Free Radic Biol Med*, 329-338. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.044
- Musunda, B. (2015). Glutaredoxin-deficiency confers bloodstream *Trypanosoma brucei* with improved thermotolerance. *Mol Biochem Parasitol*, 93-105. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.02.001
- Mutoh, H. (2009). Spectrally-resolved response properties of the three most advanced FRET based fluorescent protein voltage probes. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0004555
- Namangala, B. (2011). Contribution of Innate Immune Responses towards Resistance to African Trypanosome Infections. *Scandinavian Journal of Immunology*. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02619.x
- Newlon, M. G. (2001). A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes. *EMBO J*, 1651-1662. doi:10.1093/emboj/20.7.1651
- Niedzielska, E. (2016). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 4094-4125. doi:https://doi.org/10.1007/s12035-015-9337-5
- Niimi, T. (2012). Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review. *Methods Mol Biol*. doi:10.1007/978-1-61779-433-9_15

- Nikolaev, V. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem.*, 37215-37218. doi:10.1074/jbc.C400302200
- Nikolaev, V. (2010). Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science*, 1653-1657. doi:10.1126/science.1185988
- Nikolaev, V. (2017). *Microdomains in the Cardiovascular System*. Springer.
- Nishimura, K. (2011). Effect of *Trypanosoma brucei brucei* on erythropoiesis in infected rats. *The Journal of Parasitology*, 88-93. doi:https://www.jstor.org/stable/23019032
- Nogoceke, E. (1997). A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol Chem*, 827-836. doi:10.1515/bchm.1997.378.8.827
- Nordberg, J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 1287-1312. doi:10.1016/s0891-5849(01)00724-9
- Oberholzer, M. (2007). The *Trypanosoma brucei* cAMP phosphodiesterases TbrPDEB1 and TbrPDEB2: flagellar enzymes that are essential for parasite virulence. *FASEB J*, 720-731. doi:10.1096/fj.06-6818com
- Ochatt, C. M. (1993). Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Biochem Parasitol*, 73-81. doi:10.1016/0166-6851(93)90245-s
- Oliveira, T. (2019). Application of the LEXSY *Leishmania tarentolae* system as a recombinant protein expression platform: A review. *Process Biochemistry*. doi:10.1016/j.procbio.2019.08.019
- Onody, A. (2003). Effect of classic preconditioning on the gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *FEBS Lett.*, 35-40. doi:10.1016/s0014-5793(03)00006-1
- Ortega, C. (2018). Multi-Compartment and Multi-Host Vector Suite for Recombinant Protein Expression and Purification. *Front Microbiol*. doi:10.3389/fmicb.2018.01384
- Ostergaard, H. (2001). Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J*, 5853-5862. doi:10.1093/emboj/20.21.5853
- Østergaard, H. (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J Cell Biol*, 337-345. doi:10.1083/jcb.200402120
- Padayatti, P. S. (2004). Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases. *Pharmacol Ther*, 83-99. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.08.003
- Padilla, C. A. (1996). High-level expression of fully active human glutaredoxin (thioltransferase) in *E. coli* and characterization of Cys7 to Ser mutant protein. *FEBS letters*. doi:https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01413-6

- Paindavoine, P. (1992). A gene from the variant surface glycoprotein expression site encodes one of several transmembrane adenylate cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.*, 1218-1225. doi:10.1128/mcb.12.3.1218-1225.1992
- Pak, V. V. (2020). Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. *Cell Metab*, 642-653. doi:10.1016/j.cmet.2020.02.003
- Pal, R. (2013). Real-time imaging of NADPH oxidase activity in living cells using a novel fluorescent protein reporter. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0063989
- Palmer, I. (2004). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci*. doi:10.1002/0471140864.ps0603s38
- Park, S.-Y. (2007). Peroxiredoxin 1 interacts with androgen receptor and enhances its transactivation. *Cancer Res*, 9294-9303. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0651
- Pateraki, I. (2017). Total biosynthesis of the cyclic AMP booster forskolin from *Coleus forskohlii*. *Elife*. doi:10.7554/eLife.23001
- Paulsen, C. E. (2010). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem Biol*, 47-62.
- Pendin, D. (2017). Exploring cells with targeted biosensors. *J Gen Physiol*, 1-36. doi:https://doi.org/10.1085/jgp.201611654
- Perera, R. K. (2015). Microdomain switch of cGMP-regulated phosphodiesterases leads to ANP-induced augmentation of β -adrenoceptor-stimulated contractility in early cardiac hypertrophy. *Circ Res.*, 1304-1311. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306082
- Persad, S. (1997). Biphasic alterations in cardiac beta-adrenoceptor signal transduction mechanism due to oxyradicals. *J Pharmacol Exp Ther*, 1623-1631.
- Petersen, J. (2003). The 2.0-Å crystal structure of eqFP611, a far red fluorescent protein from the sea anemone *Entacmaea quadricolor*. *J Biol Chem*, 44626-44631. doi:10.1074/jbc.M307896200
- Phan, H. P. (2009). The production of recombinant human laminin-332 in a *Leishmania tarentolae* expression system. *Protein Expr Purif.*, 79-84. doi:10.1016/j.pep.2009.07.005
- Piacenza, L. (2008). Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J.*, 359-368. doi:10.1042/BJ20071138
- Piattoni, V. & Sardi, F. (2019). New red-shifted fluorescent biosensor for monitoring intracellular redox changes. *Free Radic Biol Med*, 545-554. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.035

- Piñeyro, M. D. (2011). Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*, 287-295.
- Piñeyro, M. D. (2011). Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin 1. *Proteomics*, 1683-1692. doi:10.1016/j.jprot.2011.04.006
- Pirdel, L. (2012). Cloning and Expression of *Leishmania infantum* LPG3 Gene by the Lizard *Leishmania* Expression System. *Avicenna J Med Biotechnol.*, 186-192.
- Poole, L. B. (2011). Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. *Curr Protoc Toxicol*, Chapter 7:Unit7.9.
- Ralston, K. S. (2009). The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. *Annu Rev Microbiol*, 335-362. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073353
- Ramon-Campos, D. (2013). Cardiomyocyte dysfunction during the chronic phase of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 243-245. doi: 10.1590/0074-0276108022013019
- Reddie, K. G. (2008). Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr Op Chem Biol.*, 746-754. doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.028
- Rehmann, H. (2003). Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat Struct Biol*, 26-32. doi:10.1038/nsb878
- Reissaus, C. A. (2019). 194-OR: A Versatile Platform for Intravital Imaging of Biosensor-Labelled Beta Cells In Situ. *Diabetes*. doi:https://doi.org/10.2337/db19-194-OR
- Reyes, A. M. (2016). PrxQ B from *Mycobacterium tuberculosis* is a monomeric, thioredoxin-dependent and highly efficient fatty acid hydroperoxide reductase. *Free Radic Biol Med*, 249-260.
- Rhee, S. G. (2012). Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem*, 4403-4410.
- Rizkia, P. R. (2015). Effect of Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside Concentration on Prethrombin-2 Recombinant Gene Expression in *Escherichia Coli* ER2566. *Procedia Chemistry*, 118-124. doi:10.1016/j.proche.2015.12.121
- Rizzo, M. A. (2006). Optimization of pairings and detection conditions for measurement of FRET between cyan and yellow fluorescent proteins. *Microsc Microanal*, 238-254. doi:10.1017/S1431927606060235
- Rochette, L. (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *HAL open science*. doi:10.1016/j.bbagen.2014.05.017f

- Rodrigues, A. V. (2022). Zoonotic Visceral Leishmaniasis: New Insights on Innate Immune Response by Blood Macrophages and Liver Kupffer Cells to *Leishmania infantum* Parasites. *Biology (Basel)*. doi:10.3390/biology11010100
- Rolin, S. (1996). Simultaneous but independent activation of adenylate cyclase and glycosylphosphatidylinositol-phospholipase C under stress conditions in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.*, 10844-10852. doi:10.1074/jbc.271.18.10844
- Rosenwasser, S. (2014). Mapping the diatom redox-sensitive proteome provides insight into response to nitrogen stress in the marine environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2740-2745. doi:10.1073/pnas.1319773111
- Ross, D. T. (1991). The trypanosome VSG expression site encodes adenylate cyclase and a leucine-rich putative regulatory gene. *EMBO J.*, 2047-2053. doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb07735.x
- Rost, J. (1964). Reduction-potential of glutathione. *Nature*, 185. doi:10.1038/201185a0
- Roux, B. (2014). G protein-coupled receptors: what a difference a 'partner' makes. *Int J Mol Sci*, 1112-1142. doi:10.3390/ijms15011112
- Sacks, D. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, 453-483. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.453
- Saha, A. (2020). Evaluation of Modulators of cAMP-Response in Terms of Their Impact on Cell Cycle and Mitochondrial Activity of *Leishmania donovani*. *Front Pharmacol*. doi:10.3389/fphar.2020.00782
- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 630-642. doi:10.1038/nrm3658.
- Sakkiah, S. (2017). Overview of the Structure and Function of Protein Kinases. *Current Enzyme inhibition*, 81-88. doi:10.2174/1573408013666161226155608
- Salmon, D. (2012). Cytokinesis of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms depends on expression of adenyl cyclases of the ESAG4 or ESAG4-like subfamily. *Mol Microbiol.*, 225-242. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08013.x
- Salmon, D. (2012). Adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei* inhibit the innate immune response of the host. *Science*, 463-466. doi:10.1126/science.1222753
- Santara, S. S. (2013). Globin-coupled heme containing oxygen sensor soluble adenylate cyclase in *Leishmania* prevents cell death during hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 16790-16795. doi:10.1073/pnas.1304145110
- Sardi, F. (2016). *Generación y caracterización de biosensores redox para el estudio de procesos biológicos en tripanosomátidos*. Montevideo.

- Sardi, F. (2013). Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection. *Anal Biochem.*, 74-82. doi:10.1016/j.ab.2012.12.017
- Sarma, G. N. (2010). Structure of D-AKAP2:PKA RI complex: insights into AKAP specificity and selectivity. *Structure*, 155-166. doi:10.1016/j.str.2009.12.012
- Sayers, E. W. (2023). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.*, 33-43. doi:10.1093/nar/gkad1044
- Schenkman, S. (1994). Structural and functional properties of Trypanosoma trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol*, 499-523. doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.002435
- Schindelin, J. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.*, 676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schlecker, T. (2005). Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type tryparedoxin peroxidases in Trypanosoma brucei. *J Biol Chem*, 14385-14394. doi:10.1074/jbc.M413338200
- Schneider, C. A. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 671-675.
- Schoijet, A. C. (2011). Defining the role of a FYVE domain in the localization and activity of a cAMP phosphodiesterase implicated in osmoregulation in Trypanosoma cruzi. *Mol Microbiol*, 50-62. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07429.x
- Schwarzländer, M. (2016). Dissecting Redox Biology Using Fluorescent Protein Sensors. *Antioxid Redox Signal.*, 680-712. doi:10.1089/ars.2015.6266
- Schwarzländer, M. (2008). Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J Microsc*, 299-316. doi:10.1111/j.1365-2818.2008.02030.x
- Sebastián-Pérez, V. (2018). Cyclic Nucleotide-Specific Phosphodiesterases as Potential Drug Targets for Anti-Leishmania Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.00603-18
- Seebeck, T. (2011). Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite. *Future Med Chem*, 1289-1306. doi:10.4155/fmc.11.77
- Seebeck, T. (2004). cAMP signalling in the kinetoplastid protozoa. *Curr Mol Med*, 585-599. doi:10.2174/1566524043360113
- Senzaki, H. (2001). Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J.*, 1718-1726. doi:10.1096/fj.00-0538com

- Shahi, S. K. (2002). Overexpression of the putative thiol conjugate transporter TbMRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, 1129-1138. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02831.x
- Shakur, Y. (2011). Therapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors in parasitic diseases. *Handb Exp Pharmacol*, 487-510. doi:10.1007/978-3-642-17969-3_20
- Shalaby, T. (2001). The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem*, 6197-6206. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02564.x
- Shames, S. L. (1986). Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry*, 3519-3526. doi:10.1021/bi00360a007
- Shaner, N. C. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol*, 1567-1572. doi:10.1038/nbt1037
- Shaner, N. C. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci*, 4247-4260. doi:10.1242/jcs.005801
- Shaner, N. C. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods*, 545-551. doi:10.1038/nmeth.1209
- Shanmugasundram, A. (2023). TriTrypDB: un recurso genómico funcional integrado para kinetoplastida. *PLoS Negl Trop Dis*. doi:10.1371/journal.pntd.0011058
- Sharma, R. (2009). The heart of darkness: growth and form of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Trends Parasitol*, 517-524. doi:10.1016/j.pt.2009.08.001
- Shemiakina, I. I. (2012). A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity. *Nat Commun*, 1204. doi:10.1038/ncomms2208
- Shokhina, A. G. (2019). Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry. *Redox Biol*. doi:10.1016/j.redox.2018.101071
- Shui, B. (2011). Circular permutation of red fluorescent proteins. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0020505
- Simpson, A. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.*, 168-174. doi:10.1016/j.pt.2006.02.006
- Simpson, L. (1988). The status of *Leishmania tarentolae*/*Trypanosoma platydictyli*. *Parasitol Today*, 115-118. doi:10.1016/0169-4758(88)90043-9
- Skinner-Adams, T. S. (2016). Defining the targets of antiparasitic compounds. *Drug Discov Today*, 725-739. doi:10.1016/j.drudis.2016.01.002

- Skodova-Sverakova, I. (2020). Catalase and Ascorbate Peroxidase in Euglenozoan Protists. *Pathogens*, 317. doi:<https://doi.org/10.3390/pathogens9040317>
- Smith, K. (1992). Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. *Protein Sci.*, 874-883. doi:10.1002/pro.5560010705
- Søberg, K. (2018). The Molecular Basis for Specificity at the Level of the Protein Kinase α Catalytic Subunit. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 538. doi:10.3389/fendo.2018.00538
- Soderling, S. H. (1998). Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 8991-8996. doi:10.1073/pnas.95.15.8991
- Soleimani, M. (2006). Cloning of tissue plasminogen activator cDNA in nonpathogenic *Leishmania*. *Yakhteh Med J.*, 196-203.
- Specker, G. (2021). Thiol-disulphide redox signalling/control during the life cycle of pathogenic trypanosomatids. En C. L. Carsten Berndt, *Redox Regulation of Differentiation and De-differentiation* (pág. 19). Boca Raton: CRC Press. doi:<https://doi.org/10.1201/9781003204091>
- Sprenger, J. (2015). In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease. *Nat Commun.* doi:10.1038/ncomms7965
- Sprenger, J. U. (2013). Biophysical techniques for detection of cAMP and cGMP in living cells. *Int J Mol Sci*, 8025-8046. doi:10.3390/ijms14048025
- Stangherlin, A. (2012). Phosphodiesterases and subcellular compartmentalized cAMP signaling in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 379-390. doi:10.1152/ajpheart.00766.2011
- Stockdale, C. (2008). Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: joining the DOTs. *PLoS Biol.* doi:10.1371/journal.pbio.0060185
- Storch, U. (2017). Dynamic monitoring of Gi/o-protein-mediated decreases of intracellular cAMP by FRET-based Epac sensors. *Pflugers Arch*, 725-737. doi:10.1007/s00424-017-1975-1
- Stuart, K. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*, 1301-1310. <https://doi.org/10.1172/JCI33945>.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif.*, 207-234. doi:10.1016/j.pep.2005.01.016
- Subach, O. M. (2019). Slowly Reducible Genetically Encoded Green Fluorescent Indicator for In Vivo and Ex Vivo Visualization of Hydrogen Peroxide. *Int J Mol Sci*, 3138. doi:10.3390/ijms20133138
- Sugino, M. & Niimi, T. (2012). Expression of multisubunit proteins in *Leishmania tarentolae*. *Methods Mol Biol*, 317-325. doi:10.1007/978-1-61779-433-9_16

- Sugiura, K. (2015). Redox sensor proteins for highly sensitive direct imaging of intracellular redox state. *Biochem Biophys Res Commun*, 242-248. doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.095
- Sun, S. Y. (2018). Flagellum couples cell shape to motility in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 5916-5925. doi:10.1073/pnas.1722618115
- Surdo, N. C. (2017). FRET biosensor uncovers cAMP nano-domains at β -adrenergic targets that dictate precise tuning of cardiac contractility. *Nat Commun*. doi:10.1038/ncomms15031
- Tagoe, D. (2015). The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: vive la difference! *Front Pharmacol*. doi:10.3389/fphar.2015.00185
- Taheri, T. (2015). Generation of stable L. major(+EGFP-LUC) and simultaneous comparison between EGFP and luciferase sensitivity. *Exp Parasitol*. doi:10.1016/j.exppara.2015.01.008
- Taheri, T. (2014). Expressional comparison between episomal and stable transfection of a selected tri-fusion protein in *Leishmania tarentolae*. *Vaccine*, 1-9.
- Taheri, T. (2016). *Leishmania*-based expression systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 7377-7385. doi:10.1007/s00253-016-7712-4
- Taromchi, A. H. (2013). Heterologous Expression of Human IL-29 (IFN- γ 1) in Iranian Lizard *Leishmania*. *Iranian Journal of Biotechnology*. doi:10.5812/ijb.12468
- Taylor, M. C. & Kelly J. M. (2006). pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnology*. doi:10.1186/1472-6750-6-32
- Taylor, M. C. (1999). *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase is encoded by a complex multigene family. *Mol Biochem Parasitol*, 205-217. doi:10.1016/s0166-6851(99)00154-1
- Taylor, S. S. (2013). PKA: Lessons Learned after Twenty Years. *Biochim Biophys Acta.*, 1271-1278. doi:10.1016/j.bbapap.2013.03.007.
- Tetaud, E. (2001). Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 171-183. doi:10.1016/s0166-6851(01)00320-6
- Thannickal, V. J. (2000). Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-beta1. *FASEB J.*, 1741-1748. doi:10.1096/fj.99-0878com
- Thompson, L. (2003). The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys*, 55-64. doi: 10.1016/s0003-9861(02)00745-2.
- Tlili, A. (2011). Kinetic analysis of phagosomal production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 438-447. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.024

- Tonks, N. K. (2005). Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*, 667-670. doi:10.1016/j.cell.2005.05.016
- Torruella, M. (1986). Trypanosoma cruzi adenylate cyclase activity. Purification and characterization. *Biochem J.*, 145-150. doi:10.1042/bj2340145
- Trindade, S. (2016). Trypanosoma brucei parasites occupy and functionally adapt to the adipose tissue in mice. *Cell Host Microbe.*, 837-848. doi:10.1016/j.chom.2016.05.002
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 509-544. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509
- Turko, V. I. (1999). Studies of the molecular mechanism of discrimination between cGMP and cAMP in the allosteric sites of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *J Biol Chem*, 29038-29041. doi:10.1074/jbc.274.41.29038
- Tyler-Cross, R. E. (1995). Transient expression mediated by the Trypanosoma cruzi rRNA promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 23-31. doi:https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00061-5
- Ulrich, K. (2017). Stress-induced Protein S-Glutathionylation and S-Trypanothionylation in African Trypanosomes- A Quantitative redox proteome and thiol analysis. *Antioxid Redox Signal.*, 517-533. doi:10.1089/ars.2016.6947
- Unger, T. (2010). Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Struct Biol.*, 34-44. doi:10.1016/j.jsb.2010.06.016
- UniProt, E. C. (2025). UniProt: la base de conocimiento universal sobre proteínas en 2025. *Nucleic Acids Res.*, 609-617. doi:https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010
- Vaandrager, A. B. (2005). Molecular properties and biological functions of cGMP-dependent protein kinase II. *Front Biosci*, 2150-2164. doi:10.2741/1687
- Vieria, L. L. (1997). Modulation of the swelling-activated amino acid channel of Leishmania major promastigotes by protein kinases. *Mol Biochem Parasitol.*, 449-461. doi:10.1016/s0166-6851(97)00180-1
- Voncken, F. (2003). Depletion of GIM5 causes cellular fragility, a decreased glycosome number, and reduced levels of ether-linked phospholipids in trypanosomes. *J Biol Chem*, 35299-35310. doi:10.1074/jbc.M301811200
- Voyton, C. M. (2018). A FRET flow cytometry method for monitoring cytosolic and glycosomal glucose in living kinetoplastid parasites. *PLoS One*. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006523
- Walker, J. M. (2009). *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press.

- Wan, X. (2012). Defects of mtDNA replication impaired mitochondrial biogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection in human cardiomyocytes and chagasic patients: the role of Nrf1/2 and antioxidant response. *J Am Heart Assoc*. doi:10.1161/JAHA.112.003855
- Wang, H. (2007). Crystal structure of the *Leishmania major* phosphodiesterase LmjPDEB1 and insight into the design of the parasite-selective inhibitors. *Mol Microbiol*, 1029-1038. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05976.x
- Wang, H. (2012). Biological and structural characterization of *Trypanosoma cruzi* phosphodiesterase C and Implications for design of parasite selective inhibitors. *J Biol Chem.*, 11788-11797. doi:10.1074/jbc.M111.326777
- Wen, S. T. (1997). The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev*, 2456-2467. doi:10.1101/gad.11.19.2456
- Wickstead, B. (2002). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 211-216. doi:10.1016/s0166-6851(02)00238-4
- Wiedenmann, J. (2002). A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11646-11651. doi:10.1073/pnas.182157199
- Wiedenmann, J. (2005). Red fluorescent protein eqFP611 and its genetically engineered dimeric variants. *J. Biomed Opt*, 14003. doi:10.1117/1.1854680
- Wiedenmann, J. (2009). Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life*, 1029-1042. doi:10.1002/iub.256
- Wilkinson, S. R. (2003). The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol Chem.*, 517-525. doi:10.1515/BC.2003.060
- Wilkinson, S. R. (2000). Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem J.*, 755-761.
- Wilson, V. (1979). Lizard *Leishmania*. En W. Lumsden, & D. Evans, *Biology of Kinetoplastida* (págs. 242-268). New York: Academic Press.
- Winterbourn, C. C. (2006). Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem*, 39860-39869. doi:10.1074/jbc.M605898200
- Wirtz, E. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 89-101. doi:10.1016/s0166-6851(99)00002-x
- Woo, H. A. (2003). Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*, 653-656. doi:10.1126/science.1080273

- Wright, V. P. (2009). Redox modulation of global phosphatase activity and protein phosphorylation in intact skeletal muscle. *J Physiol*, 5767-5781. doi:10.1113/jphysiol.2009.178285
- Yoon, Y. (2018). Modulating the Properties of Metal-Sensing Whole-Cell Bioreporters by Interfering with Escherichia coli Metal Homeostasis. *J Microbiol Biotechnol.*, 323-339. doi:10.4014/jmb.1710.10012
- Yura, T. (2019). Regulation of the heat shock response in Escherichia coli:. *Genes Genet Syst*, 103-108. doi:10.1266/ggs.19-00005
- Zaccolo, M. (2021). Subcellular Organization of the cAMP Signaling Pathway. *Pharmacol Rev.*, 278-309. doi:10.1124/pharmrev.120.000086
- Zaccolo, M. (2000). A genetically encoded fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol*, 25-29. doi:10.1038/71345
- Zaccolo, M. (2002). Compartmentalisation of cAMP and Ca(2+) signals. *Curr Opin Cell Biol*, 160-166. doi:10.1016/s0955-0674(02)00316-2
- Zaccolo, M. & Pozzan, T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*, 1711-1715. doi:10.1126/science.1069982
- Zaccolo, M. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ. Res*, 1569-1578. doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.144501
- Zakhary, D. R. (2000). Regulation of PKA binding to AKAPs in the heart: alterations in human heart failure. *Circulation*, 1459-1464. doi:10.1161/01.cir.101.12.1459
- Zhao, Y. (2011). An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *Science*, 1888-1891. doi:10.1126/science.1208592
- Zoraghi, R. (2002). The cAMP-specific phosphodiesterase TbPDE2C is an essential enzyme in bloodstream form Trypanosoma brucei. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 4343-4348. doi:10.1073/pnas.062716599