



Tesina de grado

Caracterización funcional de la actividad
prostaglandina F₂ α sintasa de *Trypanosoma*
cruzi como blanco terapéutico de la
enfermedad de Chagas

Florencia Díaz Viragué

Tutor Dra. Andrea Trochine

Co-tutor M.Sc. María Laura Chiribao

Realizada en la Unidad de Biología Molecular del Institut
Pasteur de Montevideo

Diciembre, 2013.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Malón, María Laura y Andrea por aceptarme a formar parte de su grupo de investigación y confiar en mí la realización de un proyecto que me encantó. Me pareció super interesante, con muchas perspectivas y cosas por descubrir. Es un excelente proyecto que sembró en mí muchas ganas de investigar que van a perdurar por años.

Agradezco especialmente a Lau por la dedicación, paciencia y cariño con la que me enseñó las técnicas de laboratorio que aprendí durante este trabajo, y a Adri que también estuvo presente durante el proceso de realización de mi tesina. También agradezco a Andrea que a la distancia enriqueció mi conocimiento en este tema, y por permitirme continuar este trabajo que ella comenzó. A Lucía Piacenza por corregirme la tesina en un período de tiempo muy breve y hacer correcciones que mejoraron el manuscrito.

Al resto de mis compañeros de laboratorio: Ale, Cecilia, Dola, Gaby, Gaby García, Gonza, Lore, Luisa, Moni, Paula y Pili por los buenos momentos compartidos y ayudarme en todo lo que necesite cuando comencé mi tesina en UBM.

A Oppezzo, Claudia y Florencia de UPR por su ayuda con las purificación en FPLC. A Madelón por el servicio de la espectrometría de masa. A la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación de Facultad de Medicina donde se generaron los sueros policlonales contra las proteínas. Y a Gregorio por la colaboración con la parte bioinformática del trabajo.

A Mercedes y Hugo por guiarme durante la carrera, aconsejarme en lo que era bueno para mi formación, confiar en mis conocimientos y brindarme mi primera experiencia en la mesada la cual fue fundamental para mí.

También quiero agradecer a mi amigos de Maldo, Maca, Vero, Jime, Juan, Mato, Jope y Mauri que siempre entendieron cuando no pude estar presente, muchos momentos que le tuve que dedicar a mi formación y dejar de lado por un momento cosas importante como ellos. Su apoyo me ayudo a conseguir dedicarme a lo que me gusta, que nosotros especialmente sabemos que es muy importante. A mis compañeros y amigos de la carrera: Vico, Agus, Tali, Ana, Joche, Marto y Juan, con los cuales viví muchísimos momentos de estrés, muchos momentos muy divertidos y ahora estamos consiguiendo lo buscamos estos años, terminar la carrera. A Goyo, con quien he disfrutado muchísimo, hasta en los mayores momentos de estrés me hizo reír y disfrutar, confió en mí y con su cariño conseguí cumplir con todas mis metas este año, que fueron demasiadas.

Muy especialmente quiero agradecer a mis padres Marcelo y Cristina, y a mi hermana Manuela, a los cuales quiero dedicar con mucho cariño este trabajo. Fueron mi sostén en los momentos difíciles y con quienes compartí las alegrías. Su apoyo incondicional y enorme cariño resultaron en lo que soy y lo que puedo lograr, gracias.

Las investigaciones llevadas a cabo en la presente Tesina han sido presentadas en los siguientes congresos

Florencia Díaz, María Laura Chiribao, Carlos Robello, Andrea Trochine. **Caracterización funcional de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ sintasa de *Trypanosoma cruzi* como blanco terapéutico de la enfermedad de Chagas.** XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. 24 al 25 de Octubre de 2013. Rosario, Argentina.

F. Díaz, ML. Chiribao, A. Trochine, C. Robello. **Caracterización funcional de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ sintasa de *Trypanosoma cruzi* como blanco terapéutico de la enfermedad de Chagas.** 8vas Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. 12 al 13 de Setiembre de 2013. Montevideo, Uruguay.

ÍNDICE

I. Introducción

I.1. Enfermedad de Chagas

I.1.1. Características de la enfermedad de Chagas

I.1.2. Epidemiología

I.1.3. Fases de la enfermedad y patología

I.1.4. Tratamiento

I.2. *Trypanosoma cruzi*

I.2.1. Ciclo de vida

I.2.2. Organización celular y características subcelulares relevantes

I.3. Prostaglandinas sintasas

I.4. Prostaglandinas sintasas en tripanosomas

II. Objetivos

II.1. Objetivo general

II.2. Objetivos específicos

III. Materiales y métodos

III.1. Vectores y cepas

III.1.1. Vectores

III.1.2. Cepas

III.2. Técnicas utilizadas para el clonado de fragmentos de ADN

III.2.1. Diseño de oligonucleótidos cebadores

III.2.2. Extracción de ADN genómico de *Trypanosoma cruzi*

III.2.3. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

III.2.4. Visualización de ADN

III.2.5 Purificación a partir de geles de agarosa

III.2.6. Cuantificación de ADN

III.2.7. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

III.2.8. Clonado en vectores T

III.2.9. Clonado en vectores de expresión

III.2.10. Transformación de bacterias

III.2.11. Purificación de ADN plasmídico de bacterias

III.2.12. Verificación de secuencias de ADN

III.3. Análisis de proteínas

III.3.1. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias

III.3.1.1. Condiciones de inducción y obtención de extractos de proteínas totales

III.3.1.2. Purificación por IMAC

III.3.1.2.1. Sistema de purificación en columna con bomba de flujo peristáltica *Bilson*

III.3.1.2.2. Sistema de purificación en Batch

III.3.1.2.3. Sistemas de purificación ÄKTA™purifier de *GE Healthcare Life Sciences* (FPLC)

III.3.1.3. Purificación por intercambio iónico en condiciones nativas

III.3.2. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

III.3.3. Dosificación de proteínas

III.3.4. Generación de anticuerpos

III.3.5. Purificación de anticuerpos

- III.3.6. Inmunoenzayos
 - III.3.6.1. Análisis de proteínas mediante Western blot
 - III.3.6.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)
- III.3.7. Obtención de extractos proteicos de *Trypanosoma cruzi*
- III.3.8. Espectrometría de masas
- III.4. Medios de cultivo y soluciones
 - III.4.1. Medio de cultivo de *Escherichia coli*
 - III.4.2. Medio de cultivo de *Trypanosoma cruzi*
 - III.4.3. Soluciones
- III.5. Bioinformática
- IV. Resultados
 - IV.1. Análisis de los genes *TcOYE* y *TcAKR*
 - IV.2. Clonado de la secuencia codificante de *TcOYE* y *TcAKR*
 - IV.3. Expresión y purificación de *TcOYE* recombinante
 - IV.3.1. Purificación en Batch o en columna con bomba peristáltica
 - IV.3.2. Purificación por FPLC
 - IV.4. Estudio de expresión de *TcOYE* en epimastigotas
 - IV.5. Localización subcelular de *TcOYE* en epimastigotas
 - IV.6. Expresión y purificación de *TcAKR* recombinante
- V. Discusión
- VI. Conclusiones y perspectivas
- VII. Abreviaturas
- VIII. Bibliografía
- IX. Anexo

RESUMEN

Este trabajo se enmarca en el estudio biológico y genético de dos enzimas como potenciales blancos de drogas contra el mal de Chagas. Esta enfermedad es una zoonosis endémica de Sudamérica y Centroamérica causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

Una de las enzimas es denominada Old Yellow Enzyme (*TcOYE*), una NAD(P)H flavina oxidoreductasa que contiene FMN como grupo prostético. En *T. cruzi* cataliza la síntesis de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) y media la reducción de algunos fármacos tripanocidas. La síntesis de prostaglandinas por parte de este parásito es un proceso que prácticamente no ha sido estudiado y que posiblemente esté relacionado con los mecanismos de infección y patogénesis dado que ha sido asociada a procesos patológicos en otros protozoarios relacionados. La síntesis de $PGF_{2\alpha}$ catalizada por *TcOYE* es una característica única de *T. cruzi* respecto a otros tripanosomátidos y es una enzima que no posee ortólogos en humanos. La otra enzima en estudio pertenece a la familia de las Aldo-ketoreductasas (*TcAKR*). *TcAKR* presenta homología con la prostaglandina sintasa de *Trypanosoma brucei* (*TbPGFS*), aunque su actividad como tal aún no ha sido demostrada en *T. cruzi*. Además, *TcOYE* y *TcAKR* poseen similitud de secuencia y estructuras 3D equivalentes, ambas con plegamientos de tipo barriles (α/β)₈. El estudio de ambas enzimas en conjunto permitirá conocer si poseen roles biológicos redundantes o no y si los procesos que median son importantes para el parásito de manera que estas enzimas se puedan considerar posibles blancos de drogas anti-chagásicas.

En este trabajo se puso a punto los protocolos de expresión y purificación de ambas proteínas, y se generaron anticuerpos policlonales específicos contra *TcOYE* y *TcAKR* en conejo. Mediante western blot e inmunofluorescencia indirecta se estudió la localización subcelular y la expresión de *TcOYE* en epimastigotas. La proteína presenta distribución citoplasmática con cierta preferencia por la parte anterior del parásito.

Palabras claves: Biología Molecular; enfermedad de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; prostaglandina $F_{2\alpha}$ sintasa.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

I.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana es una zoonosis endémica en Sudamérica y Centroamérica causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Es una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes, ya que causa una muy alta morbilidad y mortalidad, no solo en áreas endémicas, sino también en zonas no endémicas, a través del flujo de inmigrantes llevando a la globalización de esta patología (Lima, et al., 2010, Nagajyothi, et al., 2012). La enfermedad fue descubierta en 1909 por el doctor brasileño Carlos Chagas, quien nombró la especie del parásito causante en honor al Dr. Oswaldo Cruz, un destacado bacteriólogo brasileño. Además describió el agente etiológico, sus principales reservorios, el mecanismo de infección, así como las manifestaciones clínicas agudas (Chagas, 1909).

Al grupo de enfermedades tropicales desatendidas se las suele considerar como infecciones parasitarias crónicas y relacionadas, que afectan a personas que viven con US\$1-2 por día en los países en desarrollo más pobres. Sin embargo, últimamente se sabe que estas enfermedades también afectan países desarrollados, en el año 2012 se le ha prestado atención debido a las estimaciones de un gran número de personas infectadas en estos países (Andrus, et al., 2013).

I.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La Organización Mundial de la Salud estimó en el 2010 que había entre 8 y 10 millones de persona infectadas con *T. cruzi* en el mundo, principalmente en América Latina donde la enfermedad de Chagas es endémica (Nunes, et al., 2013). La mayor prevalencia se ha reportado en Bolivia (6.8%), Argentina (4.1%), El Salvador (3.4%), y Paraguay (2.5%). Exitosos programas de control del vector, evaluación de muestras en bancos de sangre, y educación de poblaciones en riesgos han disminuido la incidencia de la enfermedad notablemente (Rassi, et al., 2012).

Además de América Latina, en las últimas décadas se han detectado personas infectadas en Estados Unidos, Canadá, muchos países de Europa y algunos países del Pacífico Occidental, por lo que la enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública global. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> update march 2013, Fact sheet N°340; (Requena-Mendez, et al., 2013).

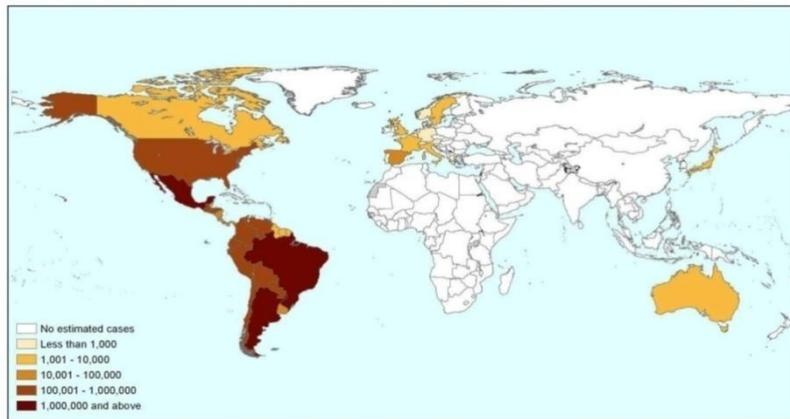


FIGURA 1. Distribución geográfica de la enfermedad de chagas. En la figura se muestra el número de infectados por país en el año 2009. Imagen extraída de <http://www.doctorswithoutborders.org/events/symposiums/2009-dndi-treat-chagas/background.cfm>

La tripanosomiasis americana es transmitida a seres humanos y a más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos, cobayos) y animales silvestres (roedores, marsupiales, armadillos) principalmente por el vector triatomino. *Triatoma infestans* (Sudamérica), *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (Centroamérica y Norteamérica) son las principales especies. El insecto vector se encuentra en Sur y Centroamérica y en el sur de Estados Unidos. La gran mayoría de los casos de enfermedad de Chagas ocurren en las zonas donde estos vectores se encuentran distribuidos. Por otra parte, la transmisión por el principal vector domiciliario *T. infestans*, fue interrumpida en Uruguay (1997), Chile (1999) y Brasil (2006) (Moncayo, 2003).

La enfermedad también puede ser transmitida por mecanismos no vectoriales, como ser transfusiones sanguíneas, transferencia vertical, transmisión oral y accidentes en laboratorios (Nunes, et al., 2013). El riesgo de adquirir la enfermedad luego de una transfusión sanguínea depende de la concentración de parásitos en la sangre del donante, los componentes transfundidos (mayor probabilidad cuando la transfusión es de plaquetas), y de la cepa del parásito. A su vez, la transferencia vertical depende de la cepa, el estatus inmunológico de la madre infectada y factores de la placenta. La transmisión congénita y por transfusión sanguínea son las principales formas de infestación en zonas urbanas y en países no endémicos (Rassi, et al., 2012, Rassi, et al., 2010).

I.1.3. FASES DE LA ENFERMEDAD Y PATOLOGÍA

La evolución de la enfermedad se clasifica en una fase aguda, una fase indeterminada o latente y una fase crónica. En la mayoría de los individuos, independientemente del mecanismo de transmisión, la fase aguda es usualmente asintomática, probablemente debido a la baja carga parasitaria. Cuando hay síntomas suelen ser fiebre, agrandamiento de hígado, bazo y nódulos linfoides, malestar y edema subcutáneo. Si la inoculación del parásito ocurre a través del tejido conjuntivo, el paciente puede presentar edema periocular, conocido como síndrome de Romaña. Raramente se desarrollan severas miocarditis, las muertes en la fase aguda son debidas a fallas cardíacas.

La fase aguda dura de 4 a 8 semanas. Las manifestaciones de la fase aguda se resuelven espontáneamente, incluso si la infección no fue tratada con drogas tripanocidas.

La replicación del parásito es controlada por la respuesta inmune del hospedador y la parasitemia disminuye a niveles que son indetectables por medio de la microscopía. A continuación, la mayoría de los pacientes desarrollan infección crónica sin signos o síntomas, se considera que tienen la forma indeterminada de la enfermedad. Esta forma es caracterizada por una serología positiva, los pacientes poseen anticuerpos contra *T. cruzi* en suero pero no presentan alteraciones electrocardiográficas o radiológicas en el corazón, esófago o colon. El 20-40% de las personas que inicialmente tienen la forma indeterminada, sufren una progresión clínica a la enfermedad cardíaca, gastrointestinal o ambas. Los pacientes restantes tienen la forma indeterminada crónicamente. En la figura 2 se esquematiza las posibles vías de progresión de la enfermedad (Bern, 2011, Rassi, et al., 2012, Rassi, et al., 2010, Requena-Mendez, et al., 2013, Zingales, et al., 2012).

Las cardiomiopatías crónicas son la manifestación más frecuente y severa de la enfermedad de Chagas. Representan la principal causa de morbilidad y mortalidad, y se presenta predominantemente en pacientes que han sido infectados en países del cono Sur (Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay y partes de Brasil) (Bern, 2011, Requena-Mendez, et al., 2013). Por otro lado, la enfermedad de Chagas gastrointestinal usualmente afecta el esófago, colon o ambos y son mucho menos comunes que las cardiomiopatías. La forma avanzada de la enfermedad resulta en megaesófago, megacolon, o ambos (Bern, 2011).

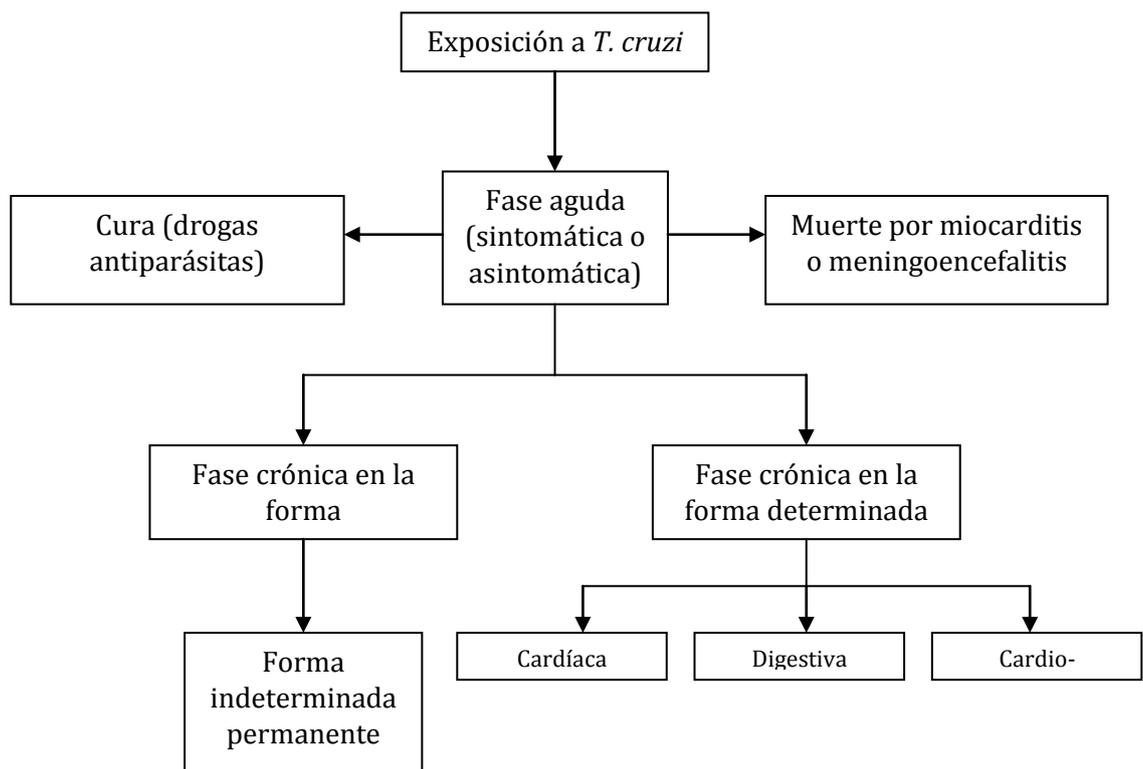


Figura 2. Etapas de la enfermedad de Chagas. La fase aguda es usualmente asintomática, pudiendo ser también sintomática. En general, el tratamiento con drogas antiparásitas durante la fase aguda cura la enfermedad y previene de manifestaciones crónicas. Ocasionalmente ocurre la muerte en la primer fase de la enfermedad (<5-10% de los casos sintomáticos). El 60-70% de los pacientes nunca desarrollan la enfermedad clínicamente, estos poseen la forma indeterminada, la cual es caracterizada por serología positiva contra chagas, electrocardiogramas y radiologías normales. El restante 30-40% posteriormente desarrollará una forma determinada de enfermedad crónica (cardíaca, digestiva o cardiodigestiva). Modificado de Rassi, et al., 2010.

I.1.4. Tratamiento

A pesar de la alta incidencia en las regiones endémicas y de la diseminación del Mal de Chagas en América del Norte y Europa, solo se han desarrollado dos drogas que se utilizan actualmente para el tratamiento de la enfermedad. Estas son activas en la fase aguda y menos efectivas en la fase crónica de esta enfermedad (Rassi, et al., 2010). Estos fármacos anti-chagásicos a su vez poseen efectos secundarios indeseables y eficiencia variable, sumado a casos de resistencia desarrollada por el parásito (Le Loup, et al., 2011). Por lo tanto, es de vital importancia el desarrollo de nuevas drogas que mejoren el tratamiento de la enfermedad, a través del estudio de nuevos blancos así como de los mecanismos de infección e invasión en profundidad.

Los compuestos nitroheterocíclicos Benznidazole (BZ) y Nifurtimox (NFX) son los únicos medicamentos aprobados para el tratamiento de las infecciones por *Trypanosoma cruzi* (Wilkinson, et al., 2011). Las diferencias en la susceptibilidad a BZ y NFX entre las distintas cepas de *T. cruzi* puede explicar, al menos en parte, las diferencias en la eficacia de estos tratamientos entre huéspedes vertebrados infectados con *T. cruzi* (Murta, et al., 2006).

I.2. TRYPANOSOMA CRUZI

Trypanosoma cruzi es un protozoario del phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, orden Kinetoplastida, y familia Trypanosomatidae. Figura 3. El kinetolasto es una región rica en ADN dentro de la mitocondria que define el orden Kinetoplastida. Dentro de los kinetoplastidos hay varios géneros. Los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* son parásitos de vertebrados e invertebrados que componen la familia Trypanosomatidae. Son los más estudiados dado que incluyen a las especies parásitas del hombre (Rassi, et al., 2012).

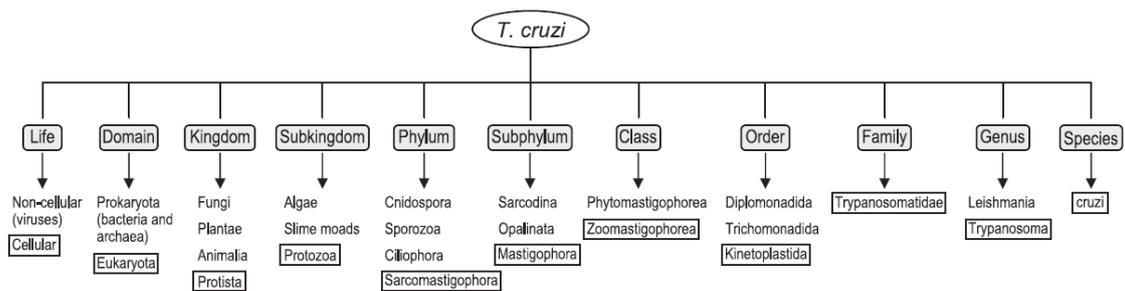


FIGURA 3. Taxonomía de *Trypanosoma cruzi*. Se clasifica como Eucariota por poseer núcleo y organización compartimentada; Protista, un grupo de organismos eucariotas (usualmente microorganismos), sin las características principales de las plantas y animales; Protozoario, unicelular; Sarcomastigophora, protozoario con locomoción flagelar, con pseudópodos o ambos; Mastigophora, utilizan el flagelo como locomoción; Zoomastigophorea, tipo animales flagelados; Kinetoplastida, poseen kinetoplasto, estructura subcelular única de la familia Trypanosomatidae; *Trypanosoma* deriva del Griego *trypano* (taladro) y *soma* (cuerpo), debido a su motivo helicoidal; *cruzi*, es una especie de *Trypanosoma* descubierta por Carlos Chagas. Extraído de Rassi, et al., 2012.

I.2.1. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* es complejo, con diversas formas de desarrollo en el insecto vector y hospederos mamíferos. *T. cruzi* presenta al menos cuatro estadios diferenciados durante su ciclo vital: tripomastigota metacíclico, tripomastigota sanguíneo, epimastigota y amastigota. En el hospedero mamífero se encuentran las formas amastigotas y los tripomastigotas sanguíneos, mientras que las otras dos formas se hallan en el insecto vector. Los tripomastigotas son infectivos pero no replicativos, mientras que los amastigotas y los epimastigotas son formas replicativas, la primera de ellas intracelular (Figura 4).

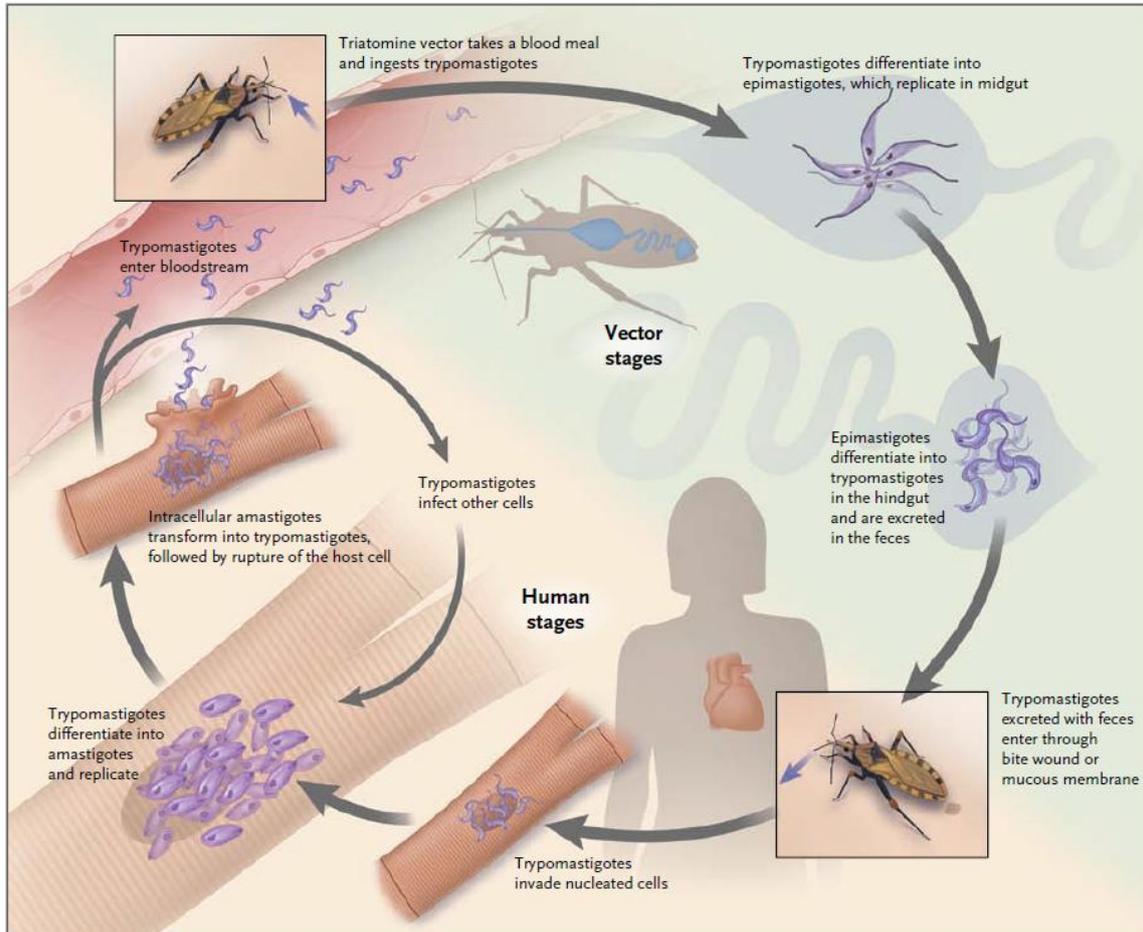


Figura 4. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. El parásito se replica en el insecto vector y espera en el intestino anterior antes de infectar al mamífero. Una vez en este, oscila entre dos formas, la forma sanguínea y la forma replicativa, infectando células del hospedador. Extraído de (Bern, 2011)

El comienzo del ciclo de vida se da cuando los tripomastigotas metacíclicos contenidos en las heces del insecto vector ingresan al hospedero mamífero. En las primeras células infectadas estos se diferencian en amastigotas, que luego se replican en el citoplasma celular. Cuando el número de parásitos es elevado se diferencian en tripomastigotas y finalmente se liberan al torrente sanguíneo. Dado que estas formas son altamente infectivas van a invadir activamente otras células del huésped. Para completar el ciclo, un vector que se alimenta de un hospedero mamífero infectado va a adquirir el parásito en la forma tripomastigota sanguíneo. Dentro del intestino anterior del vector se

diferencian a epimastigotas, los cuales son replicativos, y en última instancia, se convierten en la forma infectiva tripomastigota metacíclico para volver a cumplir el ciclo celular (de Souza, et al., 2010).

I.2.2. ORGANIZACIÓN CELULAR Y CARACTERÍSTICAS SUBCELULARES RELEVANTES

T. cruzi es un organismo celular clasificado dentro del dominio Eucariota, posee núcleo y organelos especializados. Tienen flagelo y una mitocondria única que contiene el kinetoplasto, ADN extranuclear correspondiente al genoma mitocondrial, está localizado cerca del cuerpo basal (Figura 5) (Cavalcanti, et al., 2008).

El núcleo de *T. cruzi* presenta una organización estructural semejante al de las células eucariotas midiendo cerca de 2.5 μm de diámetro y conteniendo un nucleolo centralizado. Posee una membrana externa típica que se continúa con la membrana del retículo endoplasmático.

El complejo de Golgi, involucrado en las modificaciones post-traduccionales de las proteínas, se localiza siempre próximo al bolsillo flagelar.

Las formas epimastigota y amastigota presentan una invaginación profunda de la membrana plasmática en forma de embudo extendiéndose a una región próxima al núcleo y formando una estructura denominada complejo citostoma-citofaringe. Este complejo desempeña un rol importante en la endocitosis. Al penetrar en la abertura del citostoma, las moléculas siguen por la citofaringe donde son internalizadas en vesículas endocíticas que se unirán con una red de túbulos y vesículas, que posteriormente se fusionaran con los reservosomas.

Los reservosomas son organelos de la vía endocítica que se encuentran en la forma epimastigotas. Están delimitados por membrana y son el destino de las macromoléculas endocitadas constituyendo un lugar de reserva de lípidos, proteínas y proteasas.

T. cruzi tiene una mitocondria única que se extiende por todo el cuerpo celular. Presenta ADN mitocondrial que puede llegar a representar hasta el 30% del ADN total. En estos protozoarios el ADN mitocondrial se organiza en maxicírculos y minicírculos que se asocian de forma concatenada y se concentran en una región de la mitocondria, localizada abajo del corpúsculo basal dando lugar al kinetoplasto.

El corpúsculo basal se caracteriza por presentar nueve tripletes de microtúbulos íntimamente asociados con el flagelo, sirviendo como un sitio de crecimiento de los microtúbulos. A su vez, se encuentra en asociación con la membrana externa y el kinetoplasto a través de filamentos unilaterales. La bolsa flagelar es formada por una invaginación de la membrana plasmática, de donde emerge el flagelo. Es un importante sitio de endocitosis y exocitosis en los tripanosomátidos. El flagelo es el responsable de la movilidad. En las formas epimastigota y tripomastigota el flagelo esta adherido al cuerpo del parásito.

El acidocalcisoma es un organelo con características ácidas, rico en calcio, polifosfato y otros iones. Posee una colección de canales, bombas y transportadores de iones. Su función es la de mantener la homeostasis intracelular, regula el pH y cumple el rol de osmoregulador. El glicosoma es un tipo particular de peroxisoma y posee varias enzimas de la vía glucolítica.

El parásito presenta cambios en su estructura a lo largo del ciclo de vida. Exhibe características morfológicas (amastigota, epimastigota y tripomastigota) que se diferencian por la posición relativa del kinetoplasto y del núcleo en la célula. En la figura 5

se muestra la organización celular del estadio epimastigota de *Trypanosoma cruzi* (de Souza, 2008, de Souza, et al., 2008, Dirceu E. Teixeira, 2011).

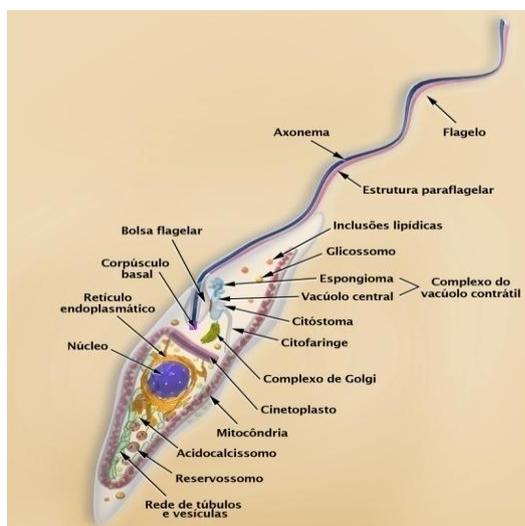


Figura 5. Vista esquemática de la forma epimastigota de *T.cruzi*. Se muestran las principales estructuras celulares descritas en el texto. Extraído de (Dirceu E. Teixeira, 2011).

I.3. PROSTAGLANDINAS SINTASAS

En este trabajo se estudiaron proteínas relacionadas con la actividad enzimática prostaglandina $F_2\alpha$ sintasa en *T. cruzi*. Con este fin se pretendió realizar una primera caracterización de dos enzimas relacionadas, en el marco del estudio de la invasión a células del hospedador. La producción de prostaglandinas por parte de este parásito durante la infección prácticamente no ha sido estudiado. Estudios en otras especies de la familia Trypanosomatidae dan indicios de que las prostaglandinas posiblemente estén relacionadas con los procesos de infección y patogénesis de *T. cruzi*.

Las prostaglandinas (PG) comprenden una familia de mediadores lipídicos bioactivos estructuralmente relacionados que están involucrados en diversos síntomas asociados con las enfermedades parasitarias. Las prostaglandinas se clasifican como eicosanoides ya que al igual que los tromboxanos, leucotrienos y ciertos hidroxiácidos, son ácidos carboxílicos que provienen de ácidos grasos de 20 carbonos, principalmente el ácido araquidónico. Las prostaglandinas son potentes moduladores de procesos fisiológicos básicos de los mamíferos y sus funciones han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, el descubrimiento de que los parásitos producen PGs, al igual que sus hospederos mamíferos, y que poseen las maquinarias enzimáticas para la biosíntesis de PG ha llevado a un cambio de paradigma en la comprensión de las funciones de los PGs en las infecciones parasitarias (Kubata, et al., 2007).

Las prostaglandinas de la serie-2 son sintetizadas por oxigenación del ácido araquidónico. Este es convertido en PGH_2 vía un intermediario endoperóxido inestable por ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), que a su vez es convertido eventualmente en diversos metabolitos relacionados, como PGD_2 , PGE_2 y $PGF_2\alpha$, por la acción de las respectivas sintasas (Hirata and Narumiya, Kubata, et al., 2007) (Figura 6). Sin embargo, aparentemente los parásitos producen prostaglandinas por una vía metabólica distinta a

la de los mamíferos. Varias líneas de investigación indican que la enzima COX clásica no podría estar implicada en la síntesis de eicosanoides en los parásitos. En primer lugar, los inhibidores de la COX no anulan la generación de PG en varios de estos organismos. Asimismo, las búsquedas por BLAST en los genomas de parásitos no muestran ninguna secuencia con homología significativa con COXs (Kubata, et al., 2007, Noverr, et al., 2003).

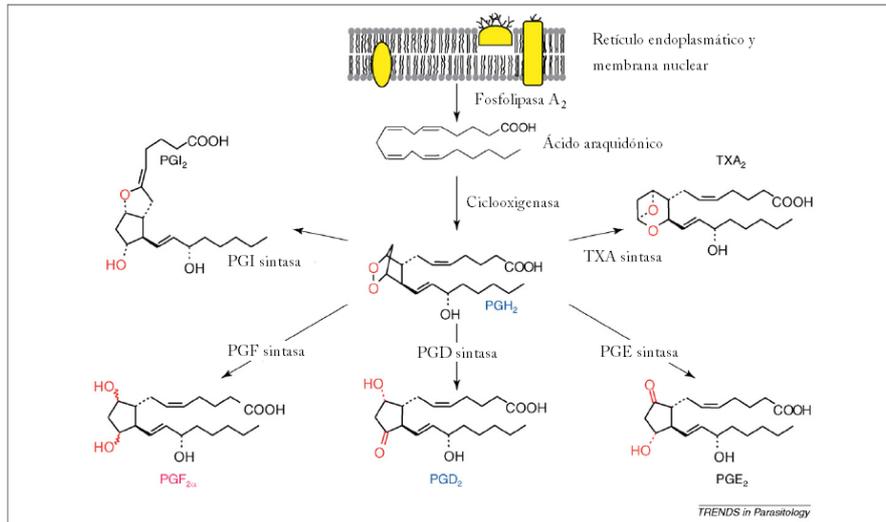


FIGURA 6. Biosíntesis de prostanooides. El ácido araquidónico es liberado desde la membrana del retículo endoplasmático y de la membrana nuclear por la acción de la fosfolipasa A₂, una vez que la célula recibió un estímulo. Este es convertido luego en el sustrato común de la vía metabólica de síntesis de los diferentes prostanooides. Modificado de (Kubata, et al., 2007).

En humanos, las prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina son clásicos ejemplos de mediadores bioactivos con potentes propiedades vasoconstrictoras/vasodilatadoras e inflamatorias que ejercen efectos directos sobre el endotelio y la homeostasis. La prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) es una de las principales PGs estables formada durante la inflamación aguda y crónica y se encuentra a nivel local y sistémico. Es un potente vasoconstrictor y tiene importantes propiedades pro-inflamatorias. Se utiliza como un indicador de la inflamación aguda y crónica en el ámbito clínico (Helmersson-Karlqvist, et al., 2013, Helmersson and Basu, 2006)

Para PGs largas y tromboxanos ya se ha establecido un papel causal de aterogénesis, la deposición de placas lipídicas en arterias. Los estudios que están emergiendo sugieren que PGF_{2α}, en particular, puede ser de importancia para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Lo postulan como un factor importante relacionado con la aterogénesis y subsecuente mortalidad cardiovascular (Helmersson-Karlqvist, et al., 2013). Este reciente resultado es interesante teniendo en cuenta que las cardiomiopatías crónicas son la manifestación más frecuente y severa de la enfermedad de Chagas. Por otro lado, es conocida su función luteolítica y de contracción del músculo liso en una variedad de tejidos. También induce hipertrofia de miocitos cardíacos e induce la expresión de proteínas miofibrilares (Allaj, et al., 2013).

I.4. PROSTAGLANDINAS SINTASAS EN TRIPANOSOMAS

En *Trypanosoma cruzi* la enzima denominada *TcOYE*, por su similitud con las Old Yellow Enzymes, cataliza la síntesis de prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) a partir de prostaglandina H_2 y media la reducción de algunos fármacos tripanocidas, tales como naftoquinonas, nitrocompuestos heterocíclicos y komaroviquinona (Kubata, et al., 2002, Murakami, et al., 2013, Okamoto, et al., 2011). Esta proteína (GenBank: U31282), es una NAD(P)H flavina oxidorreductasa que contiene FMN como grupo prostético (Figura 1 de anexo).

Su actividad metabolizadora de benznidazole ha sido sugerida por la sobreexpresión de *TcOYE* en cepas susceptibles a este fármaco, y por parásitos que fueron resistentes al mismo cuando las copias de los genes de *TcOYE* fueron eliminados (Murta, et al., 2006). Se vinculan los niveles de expresión del gen *TcOYE*, número de copia, ubicación cromosómica y polimorfismos, con la susceptibilidad o resistencia a BZ y NFX (Murta, et al., 2006). También se conoce la estructura de dicha proteína con algunos de sus sustratos e inhibidores (Murakami, et al., 2013, Okamoto, et al., 2011, Sugiyama, et al., 2007, Yamaguchi, et al., 2010). Okamoto y colaboradores realizaron el estudio cristalográfico de rayos X de *TcOYE* con algunos de sus sustratos. En su publicación del año 2011 se presentó la estructura del complejo ternario de *TcOYE*/FMN/p-HBA con una resolución de 2,05 Å. El p-hidroxibenzaldehído (p-HBA) es uno de los sustratos de la *TcOYE* y participa en una interacción de transferencia de carga para muchas enzimas de la familia OYE. La estructura muestra el sorprendente movimiento de un bucle que abarca el sitio activo después de la unión de p-HBA y revela el mecanismo de reconocimiento para una variedad de compuestos. Murakami y colaboradores realizaron cristalografía de rayos X, ultracentrifugación analítica y dinámica molecular. En este trabajo proporcionaron una descripción detallada de la estructura a partir de una resolución de 1,27 Å, y aportaron información sobre la especificidad y el comportamiento hidrodinámico. Definieron el sitio activo de la enzima como una cavidad positiva donde se une el grupo prostético FMN. Además, propusieron que *TcOYE* se comporta como un monómero en solución y que la proteína tiene cierta flexibilidad intrínseca, acorde con lo descrito por Okamoto et al.

Sin embargo, la síntesis de prostaglandinas por parte de esta enzima y su rol en el hospedador infectado, es un proceso que prácticamente no está estudiado, y que posiblemente esté relacionado con los procesos de infección y patogénesis.

Además de *TcOYE*, existe otra enzima, *TcAKR*, que posee homología con las prostaglandina sintasas humanas y de *Trypanosoma brucei*, aunque su actividad como tal no ha sido probada en *T. cruzi*. Esta enzima es responsable de la metabolización de fármacos en *T. cruzi* y pertenece a la familia de las aldo-ketoreductasas. La enzima reduce o-naftoquinonas con concomitante generación de radicales libres y se localiza principalmente en el citosol (Garavaglia, et al., 2010). Además *TcAKR* se ha identificado en un estudio de proteómica con extractos de *T. cruzi*, unida a un derivado de benznidazole, con lo cual también podría estar involucrada en el metabolismo de esta droga (Trochine et al., datos no publicados).

Las aldo-ketoreductasas son oxidorreductasas monoméricas dependientes de NAD(P)(H). Están presentes en casi todos los organismos desde procariotas (eubacterias y arqueobacterias) hasta eucariotas (protozoos, vertebrados, invertebrados, plantas y hongos), en los que desempeñan importantes funciones fisiológicas. Las AKRs metabolizan

una variedad de sustratos, incluyendo las hormonas esteroides, monosacáridos, prostaglandinas e isoflavonoides, entre otros (Barski, Tipparaju et al. 2008).

Ambas enzimas de *T. cruzi* TcOYE y TcAKR poseen estructuras terciarias equivalentes con plegamientos de tipo barriles (α/β)₈. TcAKR se cristalizó en forma apo con una resolución de 2,6 Å. Además la proteína tiene una estructura similar a otros homólogos incluyendo la reductasa de *T. brucei* (TbPGFS) y las aldo-ketoreductasas humanas (por ejemplo AKR1C3).

Es propicio destacar que no hay reportes a la fecha sobre la implicancia biológica de TcOYE. Sin embargo, la presencia de una actividad PGF₂ α sintasa en *Trypanosoma cruzi* puede ser muy relevante en el proceso de infección, teniendo en cuenta, que se han reportado diversas funciones de prostaglandinas en infecciones por otros miembros del género *Trypanosoma*. Se destacan dos aspectos relevantes en el rol que poseen las prostaglandinas en la infectividad en la tripanosomiasis africana. Uno de ellos está relacionado con el control de la densidad poblacional de *T. brucei* y el otro está implicado con la interacción con el hospedador. Las prostaglandinas son capaces de inducir la muerte celular programada (PCD) en *T. brucei*. De esta manera, la parasitemia es controlada por el sistema inmune del huésped y por el propio parásito. La prostaglandina D₂ es la encargada de desempeñar un papel importante en la regulación del crecimiento celular de *T. brucei*. La PCD en la forma sanguínea stumpy involucra un estrés oxidativo y es altamente dependiente de la fase de crecimiento. La formación de especies reactivas del oxígeno inducida por PG es un requisito previo para la PCD. Por otra parte, la tripanosomiasis africana se caracteriza por abortos espontáneos debido a la sobreproducción de PGF₂ α que además se correlacionan con picos de parasitemia. El hecho de que *T. brucei* posea una PGF₂ α sintasa (TbPGFS) sugiere que esta enzima también puede jugar un papel en la patogénesis de la tripanosomiasis americana (Figurella, et al., 2006).

Al igual que en *T. brucei*, se han evidenciado implicancias de las prostaglandinas en la infectividad de leishmanias. Las leishmanias también son organismos evolutivamente relacionados con *T. cruzi*. Los protozoos del género *Leishmania* son los agentes etiológicos de las leishmaniasis, un grupo de enfermedades que actualmente afectan a más de 15 millones de personas. Las leishmaniasis se asocian con una sobreproducción de metabolitos de ácido araquidónico, prostaglandinas, y caracterizadas por anomalías en la función de los linfocitos T (Kabututu, et al., 2002).

En el año 2002, Kabututu y colaboradores, demostraron que ocurre la síntesis *de novo* de las prostaglandinas en promastigotes de los protozoarios *Leishmania* (Old World), que tienen una enzima que cataliza la formación de PGF₂ α (PGF₂ α sintasa en *Leishmania*) que está ausente en New World *Leishmania* spp. Esto plantea cuestiones sobre la biología de estos parásitos y la interacción de estos organismos con su huésped mamífero. Las prostaglandinas son potentes mediadores de las respuestas fisiológicas y patológicas algunas de las cuales también se observan en las leishmaniasis (Kabututu, et al., 2002). La prostaglandina F₂ α sintasas de *L. major* tiene 61%, 99.3% y 99.3% de identidad con la PGF₂ α de *T. brucei*, *L. donovani* y *L. Tropica*, respectivamente.

Además, el rol de las PG se ha descrito en diversos organismos tales como los cestodos, trematodos, nematodos y protozoarios. Por ejemplo, en *Schistosoma mansoni*, la producción de PG se ha asociado con la transformación de las cercarias en schistosomules, mientras que en *Amoeba proteus*, PGE₂ y PGF₂ α provocan la formación de vacuolas y

desempeñan un rol en el acoplamiento de señal durante la fagocitosis del parásito (Figarella, et al., 2006, Kubata, et al., 2007).

Por estos motivos, es de interés el estudio de prostaglandinas sintetasas de *T. cruzi* con el fin de obtener una mejor comprensión acerca de la función de estas enzimas para el parásito, y las funciones patológicas asociadas de sobreproducción de $\text{PGF}_2\alpha$ para guiar el desarrollo de inhibidores.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar y comparar dos enzimas de *Trypanosoma cruzi*, *TcOYE* y *TcAKR*, relacionadas con la síntesis de prostaglandinas y el metabolismo de fármacos, en el contexto de la infección y como posibles blancos de fármacos anti-Chagásicos.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análisis de las secuencias codificantes para *TcOYE* y *TcAKR* mediante aproximaciones bioinformáticas.
2. Clonado del marco abierto de lectura codificante para la enzima *TcOYE* de *Trypanosoma cruzi* en distintos vectores de expresión en bacterias y parásitos.
3. Puesta a punto de la técnica de expresión y purificación de *TcOYE* y *TcAKR* recombinantes en bacterias.
4. Generación de anticuerpos policlonales mediante inmunización de conejos con las proteínas recombinantes.
5. Estudiar la localización subcelular de ambas enzimas en *T. cruzi*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. VECTORES Y CEPAS

III.1.1. VECTORES

Se utilizaron vectores de expresión en bacterias pQE30 (*Qiagen*), pET28a (*Novagen*), pTrcHisA (*Life Technologies*) y en parásitos, pTREX-n (Vazquez and Levin, 1999), pTEX (Kelly, et al., 1992), pTcINDEX (Taylor and Kelly, 2006), pTREX-TAG (cedido por el Dr. León Bouvier, (Lorenzi, et al., 2003)), pTREX-GFP-TAG (cedido por el Dr. León Bouvier) y pTREX-Cherry-TAG (cedido por el Dr. León Bouvier). Para clonar los productos de PCR se empleó el vector pGEM®-T easy (Promega).

III.1.2. CEPAS

Los plásmidos se propagaron en células XL1-Blue, a excepción del vector pET28a, que se propagó también en las células DH5 α , y pQE30 en M15. Todas son cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*).

XL-1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac</i> F' [<i>proAB+lacI^q lacZ</i> Δ M15 Tn10 (<i>tet^r</i>)]
DH5 α	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> (Taylor 1993 "Ecoli host trains")
M15	<i>Nal^s, Str^s, Rif^s, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁻, Uvr⁺, Lon⁺</i>

En este estudio se utilizó la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* (Contreras, et al., 1988). Las formas epimastigotas fueron mantenidas en cultivos axénicos a 28°C en el medio LIT (sección III.4.2.) suplementadas con 10% de suero bovino fetal (*GIBCO*). Los pasajes a medio fresco se realizaron cada 3-4 días.

III.2. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL CLONADO DE FRAGMENTOS DE ADN

III.2.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES

Los oligonucleótidos específicos que se utilizaron en este trabajo se diseñaron utilizando la base de datos TriTrypDB (*kinetoplastid Genomics Resource*). Se les adaptaron los sitios de restricción adecuados para permitir el clonado de los marcos abiertos de lectura de interés en distintos plásmidos.

La siguiente tabla resume los nombres de los oligonucleótidos diseñados, así como también su secuencia y características.

Tabla 1. DETALLE DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES SINTETIZADOS.

Nombre	Secuencia (5'-3') ¹	Tamaño (pb)	Tm (°C)
EcoRI_Fw_OYE	AAGAATTCATGGCGACGTTCCCTGAACTTCTG	32	63,1
HindIII_Rv_cSTOP_OYE	AAAAGCTTTTAGTTGTTGTACGTCGGGTAATCGT	35	61,3
KpnI_FwOYE	AAGGTACCATGGCGACGTTCCCTGAACTTC	30	64,7
BglII_FwOYE	AAAGATCTATGGCGACGTTCCCTGAACTTCTG	32	62,5
EcoRV_Rv_cSTOP_OYE	AAGATATCTTAGTTGTTGTACGTCGGGTAATCGTTG	36	60,5
SacI_FwOYE	AGAGCTCATGGCGACGTTCCCTGAACT	27	65,0

XbaI_Rv460_OYE	AATCTAGATTTCTCCGCTCGCAGCAAAATAGGC	33	62,9
Apal_Fw620_OYE	AGGGCCAATCTTCCAACAAGCGCCAGTC	29	67,5
KpnI_Rv1030_OYE	AGGTACCCGGGGTTTCGAATGAACTTGGCG	30	68,4
XhoI_Rv_sSTOP_OYE	AACTCGAGGTTGTTGTACGTCCGGTAAT	28	61,2
SacII_FwOYE	ACCGCGGATGGCGACGTTCCCTGAACT	27	68,9
rv_oye_+200²	TTTGGCTGGACCATCGTCGCCTC	23	63,7

¹Se subraya el sitio de restricción. ²cebador interno a la secuencia codificante diseñado para secuenciar el extremo 5' para verificar la fase del sub-clonado. Se utiliza en aquellos vectores que no contamos con un cebador directo que mapee en la región del vector.

Las propiedades fisicoquímicas, las posibles estructuras secundarias y heterodímeros, fueron evaluados mediante el uso de la herramienta OligoAnalyzer 3.1 de *Integrated DNA Technologies, Inc. ©, Copyright*, disponible en el sitio web <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

Para el diseño de los oligonucleótidos también se utilizó la herramienta *DoubleDigest* de *Thermo Fisher Scientific Inc. ©2013*, disponible en el sitio web <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/>. Se determinó si era posible realizar una doble digestión con el par de enzimas elegidas para cada vector y cuáles eran las condiciones óptimas para la reacción enzimática en cada caso.

La especificidad de los oligonucleótidos por las regiones de interés, y no otras, se comprobó utilizando el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponible en TriTrypDB.

Para la proteína *TcAKR* ya se contaba con las construcciones, pQE30-*TcAKR* y pTREX-TAG-*TcAKR*. Los clonados fueron realizados previamente por la Dra. Andrea Trochine en el laboratorio en el contexto del estudio de la proteína en su interacción con el benzimidazole (Trochine et al, datos no publicados).

III.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *Trypanosoma cruzi*

Para la purificación de ADN genómico total de *T. cruzi* se utilizó el reactivo DNazol (*Invitrogen*) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN se resuspendió en agua destilada estéril y fue almacenado a -20°C hasta su utilización. La cuantificación del ADN obtenido se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 de *Thermo SCIENTIFIC*, versión V3.7.1.

III.2.3. AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La secuencia codificante para la proteína *TcOYE* fue amplificada a partir de ADN genómico de epimastigotas de *T. cruzi* cepa DM28c con diferentes oligonucleótidos cebadores específicos. En este trabajo se utilizaron cuatro combinaciones de oligonucleótidos especificadas en la tabla 2.

TABLA 2. COMBINACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS Y EL VECTOR PARA EL QUE FUE DISEÑADO

Directo	Reverso	Vector (Bacterias)	Vector (Parásitos)
EcoRI_Fw_OYE	HindIII_Rv_cSTOP_OYE	pET28a	pTREX-TAG, pTREX-n, pTEX
KpnI_FwOYE	HindIII_Rv_cSTOP_OYE	pQE30, pTrcHisA	
BglII_FwOYE	EcoRV_Rv_cSTOP_OYE		pTcINDEX
EcoRI_Fw_OYE	XhoI_Rv_sSTOP_OYE		pTREX-GFP-TAG, pTREX-Cherry-TAG

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Rcorbett RESEARCH*, modelo C61-96.

Las condiciones de ciclado fueron las mismas para todos los juegos de cebadores (tabla 3).

TABLA 3. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CICLADO USADAS PARA LOS ENSAYOS CON TODOS LOS OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	4	1
Desnaturalización	95	0.5	
Hibridización	60	0.5	34
Extensión	72	1.5	
Extensión final	72	10	1

Los reactivos y las concentraciones que se usaron en las reacciones se especifican en la tabla 4.

TABLA 4. CONCENTRACIONES Y VOLÚMENES DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS EN LA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO UTILIZADO PARA CLONAR LOS MARCOS ABIERTOS DE LECTURA CON LOS DIFERENTES CEBADORES.

Reactivos	Concentración stock	Concentración utilizada	Volumen ² (µl)
PCR Pfu Buffer+Mg (Fermentas) ¹	10X	1X	5
Pfu (Fermentas)	2,5 U/µL	0,05U	1
dNTPs mixture	5 mM	0,2 mM	2
ADN genómico	50 ng/µL	2 ng/µL	2
Oligonucleótido Directo	10 µM	0,2 µM	1
Oligonucleótido Reverso	10 µM	0,2 µM	1
H ₂ O	-	--	38

¹ DNA Polimerasa con actividad proof-reading (3'-5' exonucleasa). Es más termoestable y procesiva que la Taq polimerasa.

²Volúmenes utilizados del stock en la mezcla de reacción. El volumen final de cada tubo de reacción es 50 µl.

Para el clonado en vectores T, a los productos de PCR se les adicionó un nucleótido de adenina en el extremo 3'OH. En dicha reacción de adición se empleó la enzima Taq polimerasa que posee actividad nucleótido terminal transferasa, que transfiere un nucleótido al 3'OH terminal de un fragmento de ácido nucleico. La mezcla de reacción comprende 1U de Taq polimerasa, 1mM de MgCl₂ (*Fermentas*) y 0,1 mM de dATP. La reacción se realizó a 72°C con una duración de 30 minutos.

Para las PCRs de colonia bacteriana, se tomaron células de placas de cultivo utilizando palillos y se resuspendieron directamente en la mezcla de reacción de PCR. La misma se compone de PCR Buffer sin Mg²⁺ 1X (*Invitrogen*), mezcla de dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 2,5 mM (*Invitrogen*), Taq polimerasa 1U (*Invitrogen*), primer directo 0,2 µM, primer

reverso 0,2 μM , en un volumen final de 50 μL . Este método se utilizó para ver que colonias tienen el plásmido con inserto.

Por otro lado, también se utilizó la técnica de PCR para verificar la presencia de insertos específicos en ADN plasmídico purificado (III.2.11. Purificación de ADN plasmídico de bacterias). En este caso la mezcla de reacción comprende PCR Buffer sin Mg (*Invitrogen*), mezcla de dNTPs 0,2 mM, MgCl_2 2,5 mM (*Invitrogen*), Taq polimerasa 1U (*Invitrogen*), primer directo 0,2 μM , primer Reverso 0,2 μM , ADN plasmídico 25-100 ng, en un volumen final de 50 μL .

III.2.4. VISUALIZACIÓN DE ADN

La visualización del ADN genómico, productos de PCR, ADN plasmídico y fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v). Se empleó *Orange LoadingDye 6x* (*Fermentas™*) como buffer de carga y TAE 1X como buffer de corrida (III.4.3. Soluciones). Las corridas electroforéticas se realizaron a intensidad de corriente constante entre 25 mA y 70 mA en cuba *RunOne™ Electroporesis Cell* de *EmbiTec*. Como controles de peso molecular se usaron ladder de 100 pb de *Invitrogen* y de *Fermentas*, 1Kb ladder de *Fermentas*, *Biolabs*, *GeneRuler-Thermo*, *Invitrogen*. La tinción se realizó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta G:Box de *Syngene* con el programa *Gene Snap*, versión 7.12.02.

III.2.5. PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Las bandas de ácido nucleico fueron purificadas mediante el kit comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de *GEHealthcare®*, según el protocolo del fabricante. El ADN se resuspendió en agua destilada estéril.

III.2.6. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para medir la concentración se siguió la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro *NanoDrop™ 1000* de *Thermo SCIENTIFIC*, versión V3.7.1. Para determinar la pureza de la muestra se tuvo en cuenta el cociente ($\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$).

III.2.7. DIGESTIÓN DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Se utilizó 1U de enzima por μg de ADN. Se utilizó la herramienta *DoubleDigest* de *Thermo Fisher Scientific Inc.* ©2013, disponible en el sitio web <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/> para seleccionar el buffer más compatible para los cortes con dos enzimas. Las mezclas de reacción se incubaron entre una y dos horas a 37°C. Los productos de digestión se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (III.2.4. Visualización de ADN).

III.2.8. CLONADO EN VECTORES T

A los segmentos de ADN codificantes para las enzimas en estudio amplificados de la cepa Dm28c (Tabla 4) se les adicionó un dATP. Los productos de PCR purificados se ligaron al plásmido pGEM®-TEasy (*PROMEGA, USA*) utilizando ADN T4 Ligasa (Tabla 5). Se incubó la reacción 30 min a temperatura ambiente y luego se dejó 16 h a 4°C. Se interrumpió la reacción con 10 minutos de incubación a 65°C.

TABLA 5. CLONADO EN VECTORES T

Reactivos	Concentración
Buffer ligación 2X	1X
Vector pGEM®-T easy <i>Promega</i>	50 ng
Producto de PCR	~150 ng ¹
ADN T4 ligasa <i>Sigma</i>	1U

¹ La concentración del producto de PCR varía para cada caso dependiendo, se busca poner una concentración para obtener una relación molar inserto: vector de 3:1

Se transformaron bacterias con estas construcciones y las colonias transformadas se analizaron por PCR en colonia o con los oligonucleótidos cebadores específicos si se aisló el ADN plasmídico.

III.2.9. CLONADO EN VECTORES DE EXPRESIÓN

Para el clonado en los vectores de expresión (III.1.1. Vectores) se realizó la digestión del pGEM®-T easy conteniendo la secuencia codificante de las enzimas en estudio, con endonucleasas de restricción específicas para los sitios de restricción adicionados en los oligonucleótidos cebadores (III.2.7. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción). Los vectores fueron digeridos con las mismas enzimas que los insertos de pGEM®-T easy. En el caso de pTcINDEX, se utilizó *Bam*HI para el vector compatible con el sitio *Bg*III adicionado en el inserto, y para pTREX-GPF-TAG y pTREX-Cherry-TAG, para el vector se utilizó *Sal*I compatible con el sitio *Xho*I adicionado en el inserto.

Tanto los vectores como los insertos digeridos se resolvieron en geles de agarosa y se purificaron (sección III.2.4. y III.2.5.). La ligación se realizó con ADN T4 Ligasa, tal como se indica en la sección anterior. Las proporciones de masa de inserto y vector fueron 3:1.

III.2.10. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

El método de transformación del producto de ligación empleado fue la electroporación con un electroporador *Electro Square Porator™ ECM830* de *BTX®*. Se electroporó 1 µL de ligación con 40 µL de células electrocompetentes de *E. coli*. Las condiciones de electroporación fueron 500 Volts y 8 ms en cubetas de electroporación de 1 mm de *Molecular BioProducts*. Luego del pulso de voltaje se incubaron las células en 250 µL de LB durante 1 hora a 37°C. Las bacterias transformadas se sembraron en LB-agar suplementado con antibiótico de manera de seleccionar aquellas bacterias que adquirieron el plásmido. Para el caso de pGEM®-T easy, las placas de cultivo contenían X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside, 1%) e IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, 1 mM) para seleccionar las colonias que presentaran una inserción de ADN en el sitio de múltiple clonado del plásmido. Las placas sembradas fueron incubadas 16 horas en estufa a 37°C.

Para el vector pGEM®-T easy, las colonias seleccionadas eran de color blanco evidenciando la ausencia de actividad β-galactosidasa en esas bacterias, lo que indica la presencia del inserto en el vector. En todos los casos, después de la selección se comprobó la presencia de los insertos mediante PCR de colonia o purificación de ADN plasmídico seguido de PCR con cebadores específicos.

III.2.11. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE BACTERIAS

El ADN plasmídico se extrajo de cultivos líquidos de *E. coli* con el método de lisis alcalina o el kit comercial de purificación de ADN plasmídico *illustra plasmid Prep Mini Spin Kit* de *GE Healthcare*®, según las indicaciones del fabricante.

III.2.12. VERIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE ADN

La secuencia nucleotídica de todas construcciones realizadas fue verificada por secuenciación capilar. La misma se realizó en el Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo, y las condiciones para la reacción de secuenciación fueron las requeridas por el servicio. Se secuenció automáticamente en ambas direcciones utilizando los cebadores T7, Sp6, pTREX_Fw_+160, pTREX_Rv_GAPDHinterg, o los cebadores diseñados para la secuencia codificante de *TcOYE* especificados en la tabla 1.

III.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

III.3.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BACTERIAS

III.3.1.1. Condiciones de inducción y obtención de extractos de proteínas totales

Para la expresión de las proteínas recombinantes se emplearon las cepas M15, DH5 α y XL1-Blue de *E. coli* para los vectores pQE30, pET28a y pTrcHisA, respectivamente. Las células conteniendo las construcciones de interés se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina (50 μ g/ml) y kanamicina (25 μ g/ml) a 37°C durante 16 horas con agitación constante. Este cultivo se utilizó en una relación 1:20 ó 1:100 para inocular 200-1000 mL de LB. Las células se cultivaron a 37°C entre 2 ó 4 horas (hasta DO_{600nm}~0,6; momento en el cual las bacterias se encuentran en la fase exponencial en la curva de crecimiento del cultivo). La inducción de la expresión proteica se realizó con 1 mM de IPTG a 37°C durante 4-5 horas. Se centrifugó el cultivo a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C, el pellet se transfirió a un tubo falcon, se volvió a centrifugar a 4000 x g por 15 minutos. Se resuspendió en buffer de lisis nativo para proteínas (5 mL por gramo de peso seco de pellet 10% (v/v) del volumen total de inducción), se adicionó 1 mg/mL de lisozima, 1 mM PMSF ó Cocktail inhibidor de proteasas libre de EDTA de *Roche*, y se almacenó a -80°C hasta su utilización. En algunos casos, el paso de sonicación fue realizado inmediatamente.

Al descongelar el pellet se trabajó todo en hielo para preservar la las proteínas. La lisis de las células se continuó con un procedimiento de sonicación en tres pasos, con 1 minuto de descanso entre cada uno y la amplitud se fue incrementando. El primer paso consistió en 10 pulsos de 2 segundos con una amplitud de 30%, el segundo son 10 pulsos de 2 segundos con una amplitud de 35% y el tercero son 10 pulsos de 2 segundos con una amplitud de 40%. Entre cada pulso se descansó 1 segundo. En algunos casos, el procedimiento de sonicación consistió en 6 pulsos de 10 segundos, descansando 10 segundos y con una amplitud de 30%. El equipamiento utilizado fue *BRANSON Digital Sonifier*®. Luego se centrifugó la muestra a 15000 x g durante 40 minutos a 4°C, se separó la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción insoluble (pellet). Para trabajar en condiciones nativas, las proteínas se purificaron a partir de la fracción soluble.

El en caso en que se trabajó con la fracción insoluble, las muestras llevaron un paso adicional, que consistió en la solubilización de los cuerpos de inclusión. Con este fin, el pellet de fracción insoluble se resuspendió en 5 mL de buffer de lisis desnaturante (K) por gramo de peso seco de pellet. Se mezcló mediante el uso de vortex cuidando de que no

se forme espuma y se centrifugó a 10.000 x g durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante incluyó la muestra total que luego se purificó.

III.3.1.2. Purificación por IMAC

La purificación por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) se realizó tanto en "batch" como en columna en matriz de Ni²⁺-agarosa (Ni²⁺-NTA *Invitrogen* ó *GE Healthcare*). A su vez, para el sistema en columnas se eluyó utilizando una bomba de flujo peristáltica ó se utilizó los sistemas de purificación ÄKTA™ purifier de *GE Healthcare Life Sciences*. El proceso de purificación se realizó en frío si se trabajó con la fracción soluble para mantener la estructura nativa de las proteínas.

III.3.1.2.1. Sistema de purificación en columna con bomba de flujo peristáltica *Bilson*

Se emplearon columnas *HisTrap High Performance™* de *GE Healthcare* de 1 mL. Este procedimiento se realizó tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna del buffer apropiado, buffer A para las proteínas que provienen de la fracción soluble ó buffer K para las que provienen de la fracción insoluble. El flujo empleado fue 0,5-1 mL/min. El lisado se aplicó a la columna recirculando 1-4 horas. En condiciones naturalizantes se lavó con 5 volúmenes de columna de buffer B y luego con buffer C hasta que la absorbancia a 280 nm medida en NanoDrop™ 1000 de *Thermo SCIENTIFIC* sea menor que 0,01. En condiciones desnaturalizantes el buffer de lavados fue el buffer B. La elución se realizó con buffer D ó buffer M y luego N. Las fracciones se colectaron cada 1.5-2 mL.

En las condiciones nativas de purificación se eluyó por aumento de la concentración de imidazol. En las condiciones desnaturalizantes de purificación se eluyó por cambios de pH.

III.3.1.2.2. Sistema de purificación en Batch

Para la purificación en Batch se preparó un falcon con la matriz Ni²⁺-agarosa de acuerdo a la cantidad de matriz recomendada por el proveedor (*ProBond Resin de Invitrogen*). Este procedimiento también se realizó utilizando la fracción soluble y la insoluble. Al igual que la purificación en columna, la matriz se equilibró con el mismo buffer en que se encuentra la muestra. El lisado de bacterias y se agitó por rotación a 200 rpm durante 1-2 horas o durante toda la noche. Los lavados y la elución se hicieron como se detalla en el apartado anterior.

III.3.1.2.3. Sistemas de purificación ÄKTA™ purifier de *GE Healthcare Life Sciences* (FPLC)

Se filtró la muestra (filtro de 0,20 µm) y todas las soluciones que se utilizaron (filtro de 0,45 µm). Para la purificación de proteínas con cola de histidinas mediante IMAC se emplearon columnas *HisTrap High Performance™* de *GE Healthcare* de 1 mL. Estas columnas son preempacadas con Niquel-Sepharose High Performance. Las proteínas solubilizadas en buffer A se cargaron a la columna equilibrada con el mismo buffer, a un flujo controlado de 0,5 mL/min utilizando una bomba de flujo. Los lavados y la elución se realizaron en el equipamiento ÄKTA™ purifier. Los lavados se hicieron con buffer A 15-20 volúmenes de columna (hasta que la absorbancia volvió a la línea de base). Se eluyó con un gradiente creciente de buffer B de 0% a 100% en 20 minutos, con un flujo de 1 mL/minuto. Las fracciones colectadas fueron de 0,5 mL. La muestra se guardó a 4°C hasta el próximo paso de purificación, que nunca tardo en realizarse más de 24 horas. Para verificar la efectividad del procedimiento se corrieron geles de poli(acrilamida).

III.3.1.3. Purificación por intercambio iónico en condiciones nativas

Previo a este paso de purificación se realizó un desalado de la muestra con la columna *HiTrapDesalting* de *GE Healthcare* de 5 mL. Tanto para el desalado como para el intercambio iónico se utilizó el equipo *ÄKTA™purifier*. El flujo para el desalado fue de 5 mL/min y los buffers utilizados fueron E, G ó I. Las fracciones (0,5 mL) obtenidas en este paso se juntaron y se procedió al segundo paso de purificación.

El intercambio iónico elegido dado el punto isoeléctrico de la proteína *TcOYE* y el pH utilizado, fue el intercambio aniónico, para el cual se empleó una columna *Resource Q* (*GE Healthcare*) de 1 mL. La columna se equilibró con los buffers E, G ó I dependiendo del buffer utilizado en el desalado. La muestra se inyectó a 0,5 mL/min. Se aplicó un flujo de 1 mL/min para realizar los lavados con buffer E, G ó I, 15-20 volúmenes de columna (hasta que la absorbancia volvió a la línea de base). Se eluyó con un gradiente creciente de buffers F, H ó J de 0% a 100% en 20 minutos, con un flujo de 0,5-1 mL/minutos. Las fracciones colectadas fueron de 0,5 mL. Para verificar la efectividad del procedimiento se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida.

III.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles discontinuos, un gel concentrador y un gel separador, en sistemas *Might Small II for 8X9CM Gels* de *Amersham Biosciences* con fuente de electricidad *Electrophoresis Power Supply-EP601* de *GE Healthcare*.

-Gel separador (concentraciones de uso): 12% Acrilamida, Tris-HCl 0,38 M pH 8,8, SDS 0,1% (v/v), Persulfato de amonio (PSA) 0,1% (v/v), N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina, TEMED (3 µL cada 15 mL)

-Gel concentrador (concentraciones de uso): 5% Acrilamida, Tris-HCl 0,13 M pH 6,8, SDS 0,1% (v/v), Persulfato de amonio (PSA) 0,1% (v/v), N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina, TEMED (6 µL cada 15 mL)

Las muestras se desnaturizaron por calor (100°C durante 5-10 minutos), salvo los casos en los que se indica lo contrario, y se tratan con Buffer de la muestra para proteínas 1X (III.4.3. Soluciones). Las corridas se hicieron con buffer de corrida de geles de acrilamida 1X preparado a partir del 10X (sección III.4.3. Soluciones) a intensidad constante de 25-30 mA, hasta que el frente de corrida llegara al final del gel. Se utilizaron tres maneras diferentes para la tinción de los geles de acrilamida.

-Tinción con coomassie. Solución de coomassie: Brilliant Blue R (*Sigma*, B7920) 1% p/v, en Ácido acético:EtOH:agua en relación 1:4:4. La solución de trabajo es: 50% (v/v) solución de coomassie, 20% (v/v) EtOH y 30% (v/v) agua. Las tinciones se realizaron en agitación durante 1-4 h y luego se decoloraron con agua.

-Tinción con coomassie coloidal. Se requieren tres soluciones. Solución de Coomassie: Coomassie Blue G-250 *Sigma* 5% p/v. Solución stock de teñido: 10% sulfato de amonio, 1% (p/v) ácido fosfórico, 0,1% Coomassie Blue G-250. Solución de trabajo: 8% sulfato de amonio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08% Coomassie G-250, 20% metanol. Los tiempos de tinción fueron de 12 a 24 h y luego la decoloración con agua hasta disminuir el color de fondo.

Los tamaños de las proteínas fueron estimados por comparación con marcadores de peso molecular de *Thermo SCIENTIFIC*.

III.3.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación proteica se basó en el método de Bradford (Bradford, 1976), *Sigma*. Como patrón se empleó albúmina de suero bovino (*Sigma*). Se midió la absorbancia a 595 nm en lector de microplacas *Multiskan EX* de *Thermo SCIENTIFIC*, después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente.

También se cuantificó midiendo la absorbancia a 280nm de acuerdo a la relación 1UAbs = 1mg/mL en NanoDrop™ 1000 de *Thermo SCIENTIFIC* versión V3.7.1.

III.3.4. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

La generación de anticuerpos policlonales mediante inmunización de conejos se realizó en colaboración con la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Para la obtención de los sueros inmunes cada conejo fue inyectado subcutáneamente con 200 µg de cada proteína recombinante en 1 mL de Adyuvante completo de Freund's (*Sigma*). Luego de 2 y 4 semanas los conejos fueron re-inyectados con 200 µg de proteína recombinante en 1 mL de adyuvante incompleto de Freund's (*Sigma*). El antisuero fue colectado dos semanas luego de la última inmunización.

III.3.5. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

Para la purificación de anticuerpos específicos del suero obtenido de conejos se empleó una columna de Ni⁺²-agarosa con la proteína recombinante inmovilizada (*ProBondResin* de *Invitrogen*). Este procedimiento se realizó con una bomba de flujo *Gilson*. En el primer paso se inmoviliza la proteína recombinante (His-Tag) a la columna. Se utilizó 0,5 mL de resina equilibrada con 20 volúmenes de PBS-Imidazol 10 mM. Se pasaron 300-400 µg de proteína recombinante purificada diluida en el mismo buffer con que se equilibró la columna. Se recirculó 90 min y luego se lavó con 20 volúmenes de PBS. La unión covalente de la proteína a la matriz se realizó con PBS-Formaldehído 1% (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó con 100 volúmenes de columna de PBS y se procedió al segundo paso del protocolo que es la purificación del suero.

Un volumen de 2 mL de suero se recirculó 3 horas en la columna. Posteriormente se lavó con 70 volúmenes de columna de PBS. Se eluyó con 5 mL de trietilamina 0,1 M, pH 11,5 e inmediatamente se neutralizó el eluido con HCl. A continuación se adicionó Buffer fosfato (NaH₂PO₄) 1M pH 7,5 en una proporción 1:5 (v/v). Se midió la concentración a 280 nm en espectrofotómetro.

Se dializó la muestra con PBS, a la vez que se concentraba en Vivaspin 20 de *Sartorius* (membrana de 10 KDa). Luego se adicionó PMSF 1mM y se almacenó en 50% (v/v) de glicerol a -20°C.

III.3.6 INMUNOENSAYOS

III.3.6.1. Análisis de proteínas mediante Western blot

Las proteínas resueltas en electroforesis en geles de acrilamida se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa *Amersham™Hybond™-ECL* (*GE Healthcare*). Se utilizó la técnica de electrotransferencia húmeda en el sistema *Mighty Small Transphor* de *Amersham Biosciences* con fuente de electricidad *Electrophoresis Power Supply-EPs601* de *GE Healthcare*. Los geles de poliacrilamida, las membranas de nitrocelulosa, 6 piezas de papel Whatman y esponjas se sumergieron en el buffer de transferencia (III.4.3.

Soluciones) para el montaje dentro del cassette. La transferencia se llevó a cabo a una intensidad constante de 40 mA durante 14-16 horas.

Las membranas fueron teñidas con el reactivo rojo Ponceau 0,2% (v/v) en ácido acético 10% (v/v) para recortarlas y evaluar la eficiencia de la transferencia. Se destiñeron con PBS 1X y se bloquearon los grupos reactivos de la membrana por 1-3 horas con PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v), BSA 3% (p/v) o eventualmente PBS 1X, leche descremada 5% (p/v) y agitación suave. Se hicieron dos lavados de 10 minutos con PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v) y se incubó el anticuerpo primario purificado o suero 1 hora diluido 1:1500 (v/v). Finalizada la incubación de una hora se lavó 10 minutos con PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v), 3 veces. A continuación se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario comercial contra IgG de conejo conjugado a HRP generado en cabra de *Sigma* (A0545). Se utilizó en una dilución 1:7000(v/v) en PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v), BSA 1% (p/v). Al finalizar la hora se lavó 4 veces con PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v) por 10 minutos. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente.

Las membranas se revelaron con placas autorradiográficas (KODAK) utilizando el *Kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* de *Pierce* siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.3.6.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Los parásitos epimastigotas fueron lavados tres veces con PBS y luego fueron fijados en paraformaldehído 4% (v/v) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los parásitos fueron centrifugados e incubados con Glicina 0,1 M (*Sigma*) por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con PBS, se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 parásitos/pocillo y se colocaron en una lámina pre tratada con poli lisina 0,1% (*Sigma*). Trascorridos 20 minutos a temperatura ambiente, se lavó con PBS.

Los parásitos fueron permeabilizados con Tritón 0,5% (v/v) en PBS durante 5 minutos y se lavó 2 veces con PBS. El bloqueo se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS, Tween 20 0,1% (v/v), BSA 2% (p/v). Después de dos lavados de 5 minutos con PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v), se incubaron los sueros o anticuerpos purificados diluidos en PBS, Tween 20 0,1% (v/v), BSA 1% (p/v) por 1 hora a temperatura ambiente. Las láminas fueron lavadas 3 veces con PBS, Tween 20 0,1% (v/v) e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Como anticuerpo secundario se empleó el anticuerpo comercial anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488 generado en cabra de *Invitrogen* (A11034). También se utilizó el anticuerpo comercial anti-IgG de ratón conjugado a Cy3 generado en cabra de *Invitrogen* (M30010). Ambos se usaron en una relación 1:800 (v/v) en PBS, Tween 20 0,1% (v/v), BSA 1% (p/v). Culminada la incubación se lavó 4 veces con PBS, Tween 20 0,1% (v/v). Como líquido de montaje y visualizador de ADN se empleó *Fluoroshield™ with DAPI* de *Sigma*.

III.3.7. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE *Trypanosoma cruzi*

Para la obtención de extractos proteicos totales los parásitos fueron lavados 3 veces en buffer PBS frío y 1 vez con 1 mL de Tris 10 mM pH 7 para eliminar las sales. Luego se agregó 50 μ L de buffer de lisis por cada 1×10^6 parásitos sin pipetear. Se utilizó vortex 1-3 minutos hasta que se aclaró la solución. Luego se incubó 30 minutos a temperatura ambiente con una leve agitación para permitir completar la lisis. Se centrifugó 30 minutos a 12500 rpm y el sobrenadante se conservó a -80°C .

El buffer de lisis contiene Tris 40 mM, Urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% y PMSF 1 mM. Se le agrega un cocktail de inhibidores de proteasas, mix de nucleasas y DTT 1% final.

III.3.8. ESPECTROMETRÍA DE MASA

El análisis MS y MS/MS de las bandas de proteínas se realizó en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo en un MALDI TOF-TOF de Applied Biosystems.

III.4. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

III.4.1. MEDIO DE CULTIVO DE *Escherichia coli*

Para el crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli* se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB), *Sigma*.

-Medio LB: triptona (digestión pancreática de caseína) 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. Se esteriliza por autoclavado.

Para la preparación de medios sólidos se agregó agar 1,5 %.

En los casos requeridos se utilizaron los siguientes antibióticos en las concentraciones especificadas: Ampicilina (50 µg/ml) y Kanamicina (25 µg/ml). Se prepararon medios LB adicionados con IPTG (1 mM) y X-Gal (40 µl X-Gal 2% cada 15 ml) para la selección de colonias blancas y azules en el método de α -complementación, en el cual se evidencia la expresión de β -galactosidasa.

III.4.2. MEDIO DE CULTIVO DE *Trypanosoma cruzi*

Para el cultivo de epimastigotas se utilizó Infusión Hígado-Triptosa (LIT).

-Medio LIT (Infusión Hígado-Triptosa): Infusión de Hígado 5,0 g/L, NaCl 4,4 g/L, KCl 0,4 g/L, Glucosa 2,2 g/L, Triptosa 5,0 g/L, Na₂HPO₄ (anhidro) 11,65 g/L, Extracto de Levadura 15 g/L. Ajustado a pH 7,2. Se esteriliza por filtrado. Se adiciona Hemina 25 mg, penicilina, estreptomicina y suero bovino fetal 10%.

III.4.3. SOLUCIONES

Geles de agarosa

Buffer TAE 10X: Tris-HCL 400 mM, EDTA 50 mM, pH 7,2

Buffer de la muestra para ADN: se empleó buffer comercial *Fermetas*.

Expresión de proteínas en condiciones nativas

Buffer de lisis nativo A: NaH₂PO₄ 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM.

Buffer B: NaH₂PO₄ 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM.

Buffer C: NaH₂PO₄ 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, Imidazol 50 mM.

Buffer D: NaH₂PO₄ 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, Imidazol 300 mM.

Buffer E: Tris 25 mM pH 8,5, NaCl 150 mM

Buffer F: Tris 25 mM pH 8,5, NaCl 1 M

Buffer G: NaH₂PO₄ 25 mM pH 7,5

Buffer H NaH₂PO₄ 25 mM pH 7,5, NaCl 1 M

Buffer I: Tris 50 mM pH 8,05

Buffer J: Tris 50 mM pH 8,05, NaCl 1 M

Expresión de proteínas en condiciones desnaturizantes

Buffer de lisis desnaturalizante (K): NaH_2PO_4 100mM, Tris 10 mM, Urea 8 mM, pH 8.

Buffer (L): NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 mM, pH 6,3

Buffer (M): NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 mM, pH 5,9

Buffer (N): NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 mM, pH 4,5

Geles de acrilamida

Buffer de la muestra para proteínas 4X: Tris-HCL 200 mM pH 6,8, SDS (*sigma*) 300 mM, azul de bromofenol (*Sigma*) 6 mM, glicerol 40% (v/v), DTT 400 mM.

Buffer de corrida de geles de acrilamida 10X: Tris-Base 250 mM, Glicina 2,5 M, SDS 1% pH 8,3.

Western blot

Buffer de transferencia para membranas de nitrocelulosa 10X: 480 mM Tris-Base, 390 mM Glicina, SDS 0,375%, etanol 20% (v/v)

Buffer fosfato salino (PBS 1X): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 10 mM. pH 7,4

Solución de bloqueo: PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v), BSA 3% (p/v) ó PBS 1X, leche descremada 5% (p/v)

Solución para dilución de anticuerpos: PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v), BSA 1% (p/v)

Solución de lavados: PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v)

III.5. BIOINFORMÁTICA

Se realizó alineamiento de varias secuencias OYEs y AKRs de diferentes organismos con el algoritmo T-coffee (Notredame, et al., 2000) disponible en el sitio web www.tcoffee.org.

Las secuencias aminoacídicas de OYEs de diferentes organismos utilizadas en la reconstrucción filogenética, fueron extraídas de la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) la cual está formada de secuencias ortólogas curadas. Disponible en la página <http://www.genome.jp/kegg/>. Posteriormente, la base de datos de familias de proteínas Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) se utilizó para corroborar que las proteínas recuperadas de KEGG tuvieran el dominio FMN_Oxidored, característico de las OYEs.

Las secuencias finalmente se alinearon con el algoritmo T-coffee y se realizó un árbol filogenético con MEGA utilizando el método de Maximum Likelihood. El soporte estadístico del árbol filogenético fue evaluado a través de bootstrap con 1000 pseudoréplicas.

IV. RESULTADOS

El presente trabajo incluyó el estudio de dos enzimas de *Trypanosoma cruzi*, *TcOYE* y *TcAKR*. El interés en estas enzimas se centra principalmente en su relación con la síntesis de prostaglandinas en el contexto de la infección y como potenciales blancos de fármacos anti-Chagásicos. Ambas enzimas de *T. cruzi* han sido previamente estudiadas por otros como se describe en la introducción. Las estructuras cristalográficas de ambas enzimas se encuentran disponibles. El código PDB para *TcAKR* es 4FZI, en el caso de *TcOYE* hay varios identificadores pero se trata de la misma proteína en formas cristalinas diferentes, 3ATY, 3ATZ (estructura con *p*-HBA), 4E2B y 4E2D. *TcOYE* ha sido estudiada en su rol de prostaglandina $F_2\alpha$ sintasa y por su rol en la metabolización de drogas. Por su parte, *TcAKR* fue descrita como una enzima involucrada en la metabolización de quinonas y su rol como prostaglandina sintasa aún es desconocido. Sin embargo, las proteínas homólogas de esta enzima en *T. brucei* y humanos tendrían este rol fisiológico por lo que también podría ser llevado a cabo por *TcAKR*. En este contexto nos propusimos generar herramientas generales para el estudio conjunto de ambas enzimas en *T. cruzi* para así aportar al entendimiento de sus funciones.

En primera instancia se identificó la secuencia nucleotídica que codifica la proteína *TcOYE* en el genoma de *Trypanosoma cruzi* (Kubata, et al., 2002) cepa *DM28c*. Dado que no está disponible el genoma de la cepa *DM28c*, que es la cepa con la que se trabaja en el laboratorio, como genoma de referencia se empleó la cepa *Sylvio_X10/1* reportado en la base de datos TriTrypDB, ya que es la que presenta mayor nivel de similitud con *DM28c*. La secuencia proteica clonada a partir de ADN genómico de *DM28c* (ver anexo, figura 2) tiene 100% de identidad con la reportada en la base de datos para la cepa *Sylvio_X10/1*. A su vez, la secuencia aminoacídica empleada por Murakami y colaboradores para realizar los estudios estructurales presenta 100% de identidad con la secuencia clonada en este trabajo, exceptuando el último aminoácido que varía. En cambio, Okamoto y colaboradores realizaron los estudios estructurales con la proteína que caracterizó Kubata (Kubata, et al., 2002), esta presenta diferencias en la secuencia aminoacídica. Las diferencias se detallan en la figura 3 del anexo, en donde se muestra un alineamiento utilizando la secuencia utilizada en este estudio y las dos secuencias que utilizaron los autores para los estudios estructurales. La secuencia de aminoácidos de *TcOYE* utilizada en este trabajo presenta 379 aminoácidos, una masa molecular calculada de 42208 Da y un punto isoeléctrico estimado en 6,25 unidades de pH. La proteína presenta 43 aminoácidos fuertemente básicos (K, R); 49 aminoácidos fuertemente ácidos (D, E); 88 aminoácidos polares (N, C, Q, S, T, Y); y 131 aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V).

IV.1. ANÁLISIS DE LOS GENES *TcOYE* Y *TcAKR*

Para analizar la similitud de *TcOYE* y *TcAKR* entre sí, y con algunos de sus homólogos, las secuencias proteicas se compararon mediante en un alineamiento múltiple. La figura 1 muestra el alineamiento realizado con el algoritmo T-coffee.

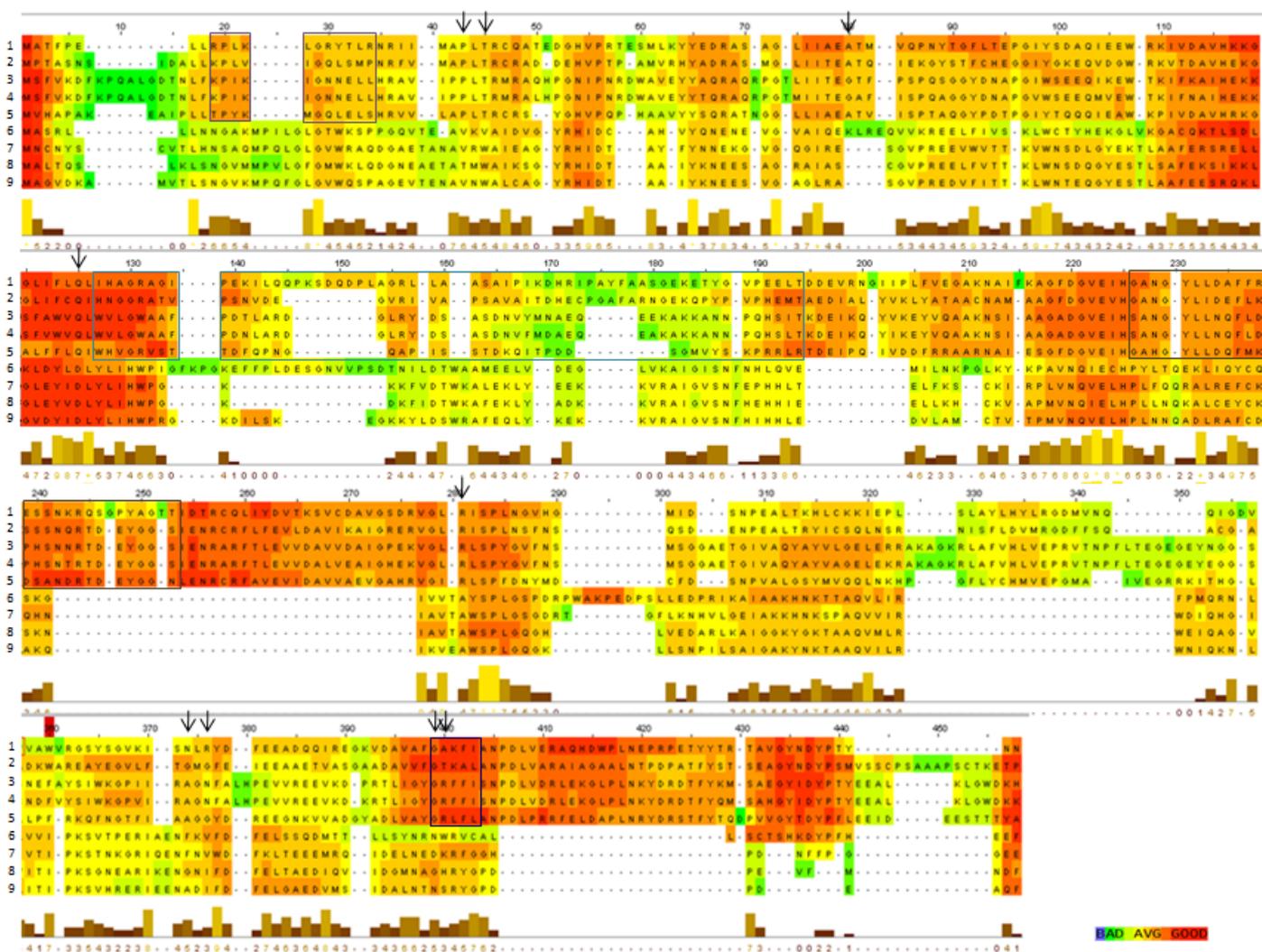


Figura 3. Alineamiento de OYEs y AKRs de varios organismos. 1 *Trypanosoma cruzi* (TcOYE), 2 *Leishmania braziliensis* (OYE, XP_001563130.1), 3 *Saccharomyces cerevisiae* (OYE, AEP22549), 4 *Saccharomyces pastorianus* (OYE, Q02899), 5 *Oryza sativa japonica* (OYE, NP_001057144), 6 *Homo sapiens* (AKR1B1, CAG47000), 7 *Trypanosoma cruzi* (AKR, ACD93222), 8 *Trypanosoma brucei* (AKR, BAB17681), 9 *Leishmania major* (AKR, AAA57350). El recuadro violeta indica el motivo β -hairping. El recuadro celeste indica el subdominio capping. El recuadro celeste indica el motivo α -helicoidal. El recuadro azul indica la α -hélice interior. Las flechas indican los aminoácidos que interactúan con el ligando FMN en la estructura de TcOYE.

En el alineamiento se distinguen ciertas regiones de conservación entre las secuencias comparadas. La conservación se indica por el gráfico de barra debajo de cada posición del alineamiento. Cuanto mayor sea la conservación, es decir cuanto menor sea la variación entre las secuencias en una posición dada, más alto será el gráfico en esa posición. Por otro lado, se muestra el score del alineamiento mediante una gama de colores como se muestra en la figura 1. El score es un parámetro del alineamiento, que mide cuán bien alineada esta cada región. Las regiones conservadas resultan más sencillas de alinear para el algoritmo del programa, por lo que suele haber una correlación entre un score alto y una región conservada.

En el alineamiento se diferencian claramente los dos grupos de proteínas (OYEs y AKRs). Si sólo se observan las secuencias de OYEs hay bastante conservación entre ellas. Por su lado las secuencias AKRs también se parecen entre sí. Hay una porción ampliamente conservada en todas las secuencias que comprende el rango de posiciones

110 a 130 del alineamiento. Es de destacar que es el único sitio que presenta una alta conservación en las nueve secuencias comparadas. Es una región que se encuentra tanto en OYEs como en AKRs. El resto de las regiones conservadas no se encuentran en las secuencias de las AKR comparadas (AKR de *L. major*, *H. sapiens*, *T. cruzi* y *T. brucei*). En las posiciones 10 a 19 de la secuencia de *TcOYE* se encuentra el motivo β -hairpin N-terminal que cierra la parte inferior del barril, corresponde al recuadro violeta de la figura 1. Por otro lado, las posiciones 137-194 del alineamiento se corresponden al subdominio capping en la estructura de OYE de *T. cruzi* cristalizada. Este subdominio participa en la formación de la cavidad del sitio activo. El motivo α -helicoidal se muestra en el recuadro celeste y está relacionado con el reconocimiento del sustrato. La α -hélice interior está marcada en color azul y contribuye a la unión a FMN. Estas regiones fueron localizadas en el alineamiento en función a la estructura de *TcOYE* (figura 1 de anexo). Las flechas negras indican qué aminoácidos de *TcOYE* interactúan con su ligando FMN, en las figuras 4 y 5, y en la tabla 1 del anexo se muestran estas interacciones. Estas posiciones se encuentran bastante conservadas entre de las OYEs como era de esperarse dado que todas las proteínas OYEs comparadas tienen FMN como grupo prostético.

Por otro lado, se realizó un estudio filogenético con un conjunto de datos de secuencias proteicas anotadas por homología como OYEs en la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG) (Kanehisa, et al.). El objetivo de este análisis fue estudiar en mayor detalle la similitud de *TcOYE* con las enzimas de otros organismos para así poder realizar inferencias de su origen evolutivo. Entre estas secuencias se encontraban OYEs del dominio eucariotas, reino protista y fungi, y OYEs del dominio procariota, bacterias y arqueas. En las búsquedas por BLAST no se identifican homólogos en humanos ni en *Trypanosoma brucei* entre otros, su presencia está restringida a otros grupos de organismos. En primera instancia se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo T-coffee. Las 55 secuencias se ingresaron en el programa MEGA para visualizar el correspondiente alineamiento. El alineamiento se ajustó posteriormente por inspección visual, se eliminaron ciertas secuencias que no presentaban suficiente homología. También se analizaron los dominios proteicos mediante el programa pfam, los resultados se muestran en la tabla 2 del anexo. Todas presentaron el dominio FMN oxidoreductasa (Oxidored_FMN), por lo que fueron utilizadas como datos de entrada para la construcción de árboles filogenéticos por el método *Maximum Likelihood* (Figura 2).

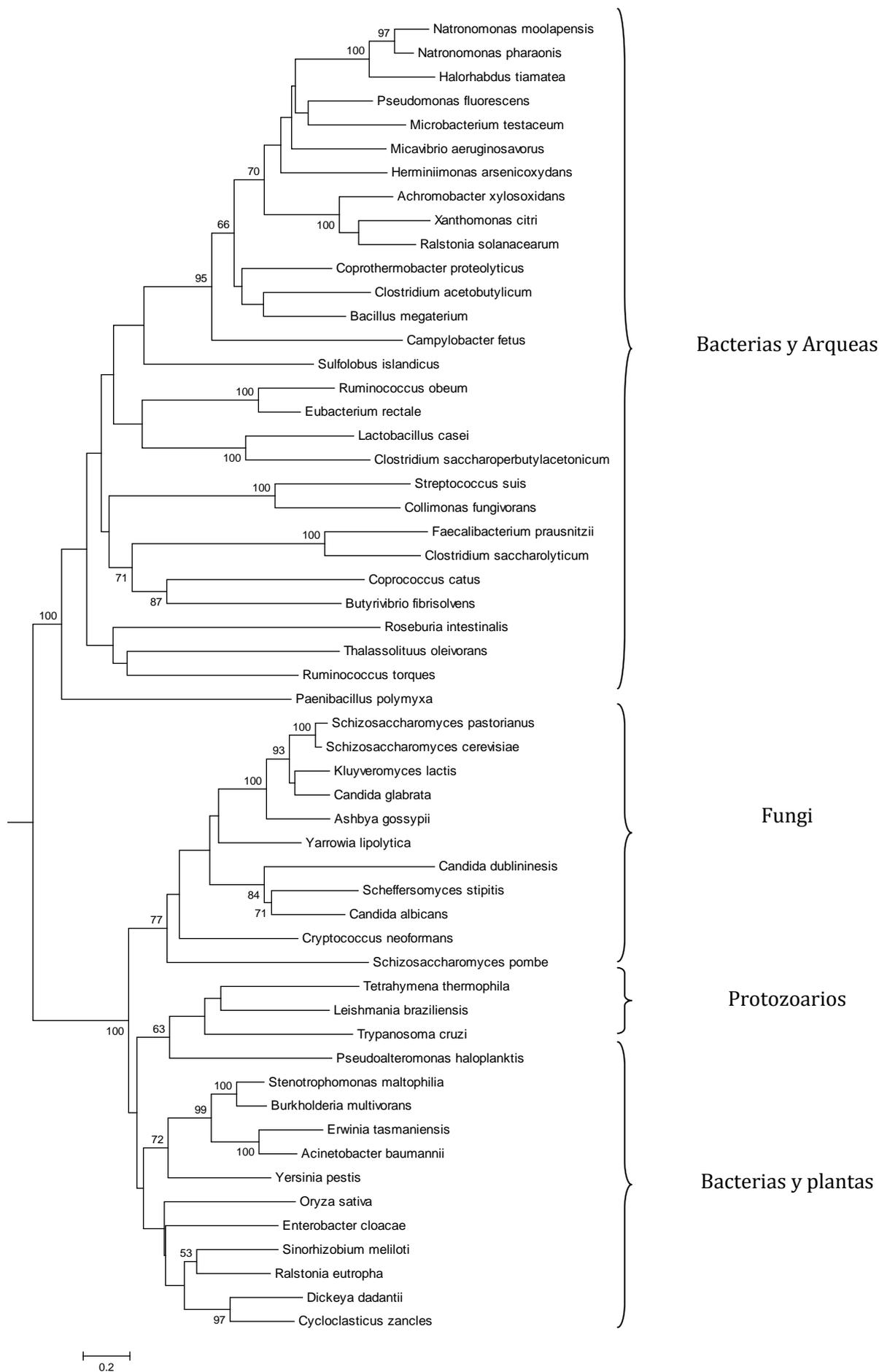


Figura 2. Análisis por *Maximum Likelihood* de las proteínas tipo OYE. Los valores de “bootstrap” significativos se indican sobre los nodos. En rojo se indica la proteína estudiada en este trabajo.

En el estudio filogenético se observan dos grandes linajes, uno compuesto por bacterias y arqueas, y otro que a su vez se divide en dos grupos. Uno de estos grupos está compuesto por hongos, y el otro lo integran protozoarios (en el cual está incluida *TcOYE*) y principalmente OYEs de proteobacterias. En los nodos se indica el valor de “bootstrap”, un soporte estadístico que cuanto mayor sea, mayor es la probabilidad de que ese nodo sea el correcto, es decir que el linaje establecido es el adecuado para representar lo que sucede evolutivamente. En la figura se indican los valores de “bootstrap” mayores a 50. En el nodo que agrupa los linajes de protozoarios con bacterias, plantas y hongos el soporte estadístico fue de 100. A su vez, el nodo que agrupa los protozoarios con la bacteria *Pseudoalteromonas haloplanktis* fue de 77.

En el árbol se puede apreciar que la enzima Old Yellow enzyme presenta homólogos en bacterias, plantas y levaduras, tal como se describe en la bibliografía (Opperman, et al., 2010). Según la topología, el linaje que agrupa a las enzimas de protozoarios tiene un ancestro común con una bacteria y a su vez este grupo comparte un ancestro más lejano con el linaje de bacterias y plantas. El hecho que existan dos linajes de OYE en procariotas, y que uno de estos linajes esté más emparentado con las proteínas eucariotas (protozoarios, hongos y plantas) sugiere un evento de transferencia horizontal. Otra evidencia a favor de este evento evolutivo es la presencia ubicua de OYE en los procariotas, mientras que en eucariotas solo se encuentra en algunas especies de algunos grupos taxonómicos. Además, dado que bacterias y eucariotas divergieron hace millones de años, se esperaría por evolución vertical, que las OYEs de ambos dominios presentaran una divergencia mayor a la observada. Los porcentajes de similitud de *TcOYE* con las enzimas de bacterias rondan el 50 a 60 %. Sin embargo, el supuesto de una transferencia horizontal debe ser analizado mediante métodos filogenéticos que incluyan la calibración de relojes moleculares y el cálculo de tasas de sustitución, ya que existe evidencia de proteínas altamente conservadas entre bacterias y eucariotas. Es decir, no es posible inferir sólo a partir del árbol que hubo transferencia horizontal desde una bacteria pero este resultado sirve de base para estudios más completos.

IV.2. CLONADO DE SECUENCIA CODIFICANTE DE *TcOYE* Y *TcAKR*

Una vez identificada la secuencia del gen de Old Yellow Enzyme en *Trypanosoma cruzi* se procedió al clonado de la misma con el objetivo de su caracterización. Como ya se mencionó ya se contaba con las construcciones para *TcAKR* en el laboratorio.

La estrategia de clonado empleada implicó el diseño de oligonucleótidos específicos para la secuencia que codifica la enzima *TcOYE* a los que se les adaptaron sitios de restricción en los extremos 5' para permitir el clonado en fase en los distintos plásmidos de expresión en *E. coli* y en el parásito. Los oligonucleótidos diseñados se detallan en la sección III.2.1 de materiales y métodos.

T. cruzi es un organismo eucariota que no presenta intrones de clase II, con algunas pocas excepciones, en los genes codificantes para proteínas (Mair, et al., 2000). Por lo tanto, fue posible amplificar por PCR la secuencia que codifica la proteína *TcOYE* a partir de ADN genómico.

Para optimizar las condiciones de las reacciones de amplificación se utilizó la enzima Taq polimerasa (condiciones en materiales y métodos) y se utilizaron diferentes temperaturas de anillado. Como ejemplo se muestra una PCR en gradiente para analizar diferentes temperaturas de hibridación para el par de primers KpnI_FwOYE y HindIII_Rv_cSTOP_OYE. En la figura 3 se muestra una electroforesis en gel de agarosa donde se visualizaron los productos de PCR (pPCR) obtenidos a diferentes temperaturas, que se corresponden con los esperados de 1440 pb.

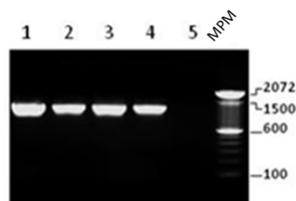


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). Evaluación de las condiciones óptimas de reacción de KpnI_FwOYE y HindIII_Rv_cSTOP_OYE. **1** pPCR obtenido a una temperatura de hibridación de 60.1°C. **2** pPCR obtenido a una temperatura de hibridación de 62.0°C. **3** pPCR obtenido a una temperatura de hibridación de 63.9°C. **4** pPCR obtenido a una temperatura de hibridación de 65.9°C. **5** Control negativo, mezcla de reacción sin ADN genómico, temperatura de hibridación 63.9°C

La reacción de PCR para el par de cebadores funcionó en todas las temperaturas ensayadas. Incluso la mayor cantidad de ADN se obtuvo a 60.1°C. Por lo tanto, esta fue la temperatura empleada para todas las reacciones de amplificación con este par de cebadores.

Luego de optimizar las condiciones de reacción se procedió a clonar el ácido nucleico amplificado en vectores pGEM®-T easy. Para estas PCR se empleó la enzima Pfu, con las condiciones de reacción especificadas en materiales y métodos. La temperatura de hibridación fue 60°C para todos los pares de cebadores utilizados. En la figura 4 se muestran los pPCR con los diferentes cebadores y luego del paso de adición del nucleótido adenina al 3'OH terminal.

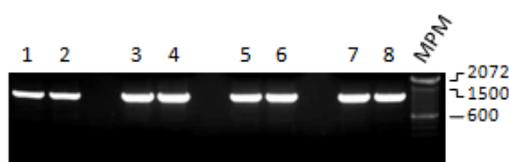


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). Amplificación de la secuencia codificadante para TcOYE con Pfu. Carriles 1 y 2 productos de amplificación por PCR con los cebadores EcoRI_FwOYE y HindIII_Rv_cSTOP_OYE. Carriles 3 y 4 producto de amplificación por PCR con los cebadores KpnI_FwOYE y HindIII_Rv_cSTOP_OYE. Carriles 5 y 6 producto de amplificación por PCR con los cebadores BglII_FwOYE y EcoRV_Rv_cSTOP_OYE. Carriles 7 y 8 producto de amplificación por PCR con los cebadores EcoRI_Fw_OYE y XhoI_Rv_sSTOP_OYE.

Los productos de amplificación se purificaron del gel, se ligaron a pGEM®-T easy y el ADN ligado se introdujo en células XL-1 Blue de *E. coli* mediante electroporación. Las colonias con plásmido con inserto se seleccionaron por PCR en colonia. Los resultados se muestran en la figura 5, se indican con una flecha los clones elegidos para continuar el estudio. Para verificar la presencia de inserto se realizó digestión con endonucleasa de restricción sobre el ADN plasmídico purificado. Luego fueron enviados para su secuenciación al Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo. Las

secuencias obtenidas resultaron ser iguales a la secuencia de *TcOYE* reportada en la base de datos para la cepa Sylvio_X10/1.

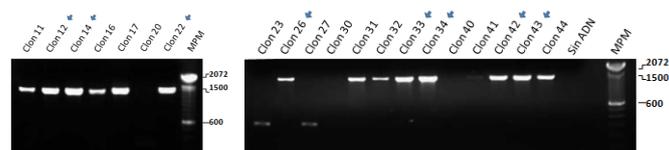


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). Productos de PCR en colonia para verificar qué colonias presentaban inserto en el vector pGEM®-T easy.. Se utilizaron los cebadores T7 y Sp6, específicos de pGEM®-T easy. Los clones 11, 12, 14, 16 y 17 provienen de la ligación de pGEM®-T easy con el producto de PCR que se amplificó con los cebadores EcoRI_Fw_OYE y HindIII_Rv_cSTOP_OYE. Los clones 20, 22, 23, 26 y 27 provienen de la ligación de pGEM®-T easy con el producto de PCR que se amplificó con los cebadores KpnI_FwOYE y HindIII_Rv_cSTOP_OYE. Los clones 30, 31, 32, 33 y 34 27 provienen de la ligación de pGEM®-T easy con el producto de PCR que se amplificó con los cebadores BglII_FwOYE y EcoRV_Rv_cSTOP_OYE. Los clones 40, 41, 42, 43 y 44 provienen de la ligación de pGEM®-T easy con el producto de PCR que se amplificó con los cebadores EcoRI_Fw_OYE y XhoI_Rv_sSTOP_OYE.

A continuación los productos de PCR de los clones elegidos fueron subclonados en los vectores de expresión. Luego de purificar el ADN plasmídico de las bacterias, se digirieron las distintas construcciones pGEM®-T easy que contenían el inserto, con las enzimas de restricción adecuadas. A su vez, se realizaron las digestiones de los vectores de expresión con enzimas de restricción, de modo de realizar un clonado direccional. En la figura 6 se muestran algunas de las digestiones realizadas con los vectores de destino de expresión en *T. cruzi*. Las condiciones de ligación se especifican en materiales y métodos. En todos los casos se obtuvieron colonias que luego se verificaron por PCR en colonia y por su patrón de restricción. Las construcciones obtenidas fueron: pQE30-*TcOYE*, pET28a-*TcOYE*, pTrcHisA-*TcOYE*, pTREX-n-*TcOYE*, pTEX-*TcOYE*, pTcINDEX-*TcOYE*, pTREX-TAG-*TcOYE*, pTREX-GFP-TAG-*TcOYE* y pTREX-Cherry-TAG-*TcOYE*.

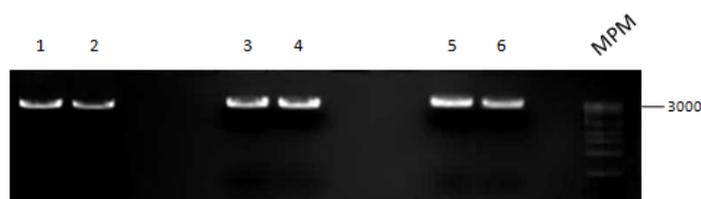


Figura 6. Digestión de pTREX-GFP-TAG, pTREX-Cherry y pTcINDEX. Carril 1 y 2 Digestión de pTREX-GFP-TAG con *EcoRI* y *Sall*. Carril 3 y 4 Digestión de pTREX-Cherry con *EcoRI* y *Sall*. Carril 5 y 6 Digestión de pTcINDEX con *BamHI* y *EcoRV*.

IV.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE *TcOYE* RECOMBINANTE

La secuencia de ADN codificante para *TcOYE* fue clonada en los vectores de expresión en *E. coli* pQE30, pET28a y pTrcHisA para evaluar en cual se conseguía una mejor expresión. Los plásmidos se transformaron en las cepas adecuadas de bacterias para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Se prosiguió con los clones conteniendo las construcciones pQE30-*TcOYE* y pTrcHisA, con los que se hicieron diferentes pruebas de inducción con ITPG.

Como se muestra en la figura 7, la proteína no se expresó en las condiciones probadas para el plásmido pTrcHisA. Sin embargo, se obtuvo una buena expresión

utilizando el plásmido pQE30, que fue mayor a 37°C. Empleando el plásmido pQE30 es posible obtener proteínas de fusión a una secuencia de polihistidinas en el extremo N-terminal, las cuales se utilizan luego en la estrategia de purificación de la proteína. Como la construcción en pQE30 permitió obtener una buena expresión se continuó el trabajo con esta construcción. Las condiciones de inducción de la expresión se detallan en la sección III.3.1.1 de materiales y métodos. La enzima *TcOYE* así obtenida siempre se purificó en condiciones nativas.

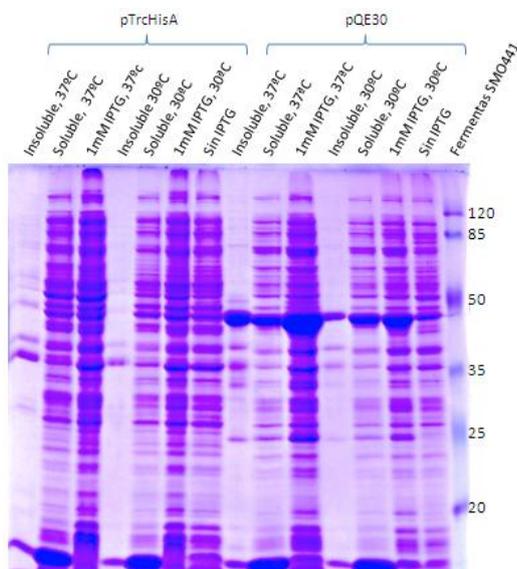


Figura 7. Inducción de expresión de *TcOYE* recombinante empleando diferentes vectores y condiciones. Se indujo la expresión de *TcOYE* con 1 mM de IPTG en el vector pQE30 y pTrcHisA. Se probaron dos condiciones diferentes de temperatura, 30°C y 37°C. Se indica con una flecha la banda correspondiente a la proteína recombinante *TcOYE*.

Dado que en la bibliografía se describe la expresión de *TcOYE* con 5 mM de IPTG (Murta, et al., 2006), se realizó la inducción de la proteína ensayando diferentes concentraciones del inductor (Figura 8). Se empleó la concentración especificada en la bibliografía, la utilizada en las expresiones que se confeccionaron en este trabajo y una concentración menor.

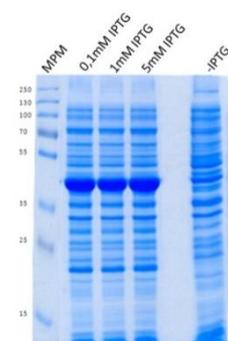


Figura 8. Prueba de inducción de *TcOYE* con diferentes concentraciones de IPTG. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE 12%). Se emplearon concentraciones crecientes de IPTG para la inducción de la expresión de *TcOYE* recombinante. MPM *Thermo Scientific* No: 26619.

El rendimiento obtenido empleando 1 ó 5 mM es similar, por lo que no se consideró necesario utilizar 5 mM de IPTG. Por otro lado, se consideró que 0,1 mM era una concentración muy baja, a pesar de que en este caso se observa una buena inducción de la expresión. Esta prueba se realizó en 10 mL de cultivo de bacterias, mientras que las inducciones que se utilizaron para purificar la proteína se realizaron en 1 L.

La proteína *TcOYE* como fusión a poli-His no mostró inconvenientes para expresarse, sin embargo, como se muestra más adelante, la purificación requirió más de un paso y muchos intentos de optimización para obtener una proteína con la pureza necesaria, y en cantidad suficiente para la producción de anticuerpos multivalentes en conejos.

IV.3.1. PURIFICACIÓN EN BATCH O EN COLUMNA CON BOMBA PERISTÁLTICA

En primer lugar se probó purificación en batch y en columna con bomba de flujo peristáltica *Bilson* en matriz de Ni²⁺-agarosa. En ambos casos los extractos solubles obtenidos luego de la inducción se incubaron con la matriz de Ni²⁺-agarosa, se lavaron con concentraciones crecientes de imidazol y finalmente la proteína unida se eluyó por competencia con imidazol o bien por cambio de pH. Con estos sistemas de purificación se obtuvo muy poco rendimiento, alrededor de 0.07 mg/mL debido a que se presentaron problemas de precipitación durante la purificación o en el proceso de concentración de los eluidos. Estos dos aspectos eran muy negativos para la inmunización de los conejos, ya que se necesitaban al menos 200 µg de proteína en un volumen pequeño. Con el rendimiento obtenido en una purificación no era suficiente para una inmunización. El mayor inconveniente residía en que la proteína ya purificada precipitaba una vez guardada disminuyendo su concentración, dado que no era estable en las condiciones de elución. Se probó concentrar la proteína y la adición de otros buffers para eliminar el imidazol pero no hubo mejora en la estabilidad. En la figura 9 se muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida donde se sembraron las muestras de una purificación de *TcOYE* en estas condiciones. Como se observa, los eluidos no están completamente puros, ya que no hay una única banda, pero sí se distingue una banda mayoritaria de aproximadamente 44 kDa, que es similar al tamaño esperado para *TcOYE* más las histidinas (44181 Da). La muestra que no se unió a la columna presenta una banda no despreciable correspondiente a la proteína, indicando que en ese paso se perdió una parte de la muestra. En algunas purificaciones también se evidenció proteína recombinante en las fracciones de los lavados con 50 mM de imidazol. Previo a estos se realizaron lavados con 20 mM de imidazol donde no se observó proteína eluída. Estos resultados dan indicio de lo poco eficiente que resultaron estos procedimientos, y el estrecho rango de condiciones en las cuales la proteína se une y permanece en la columna.

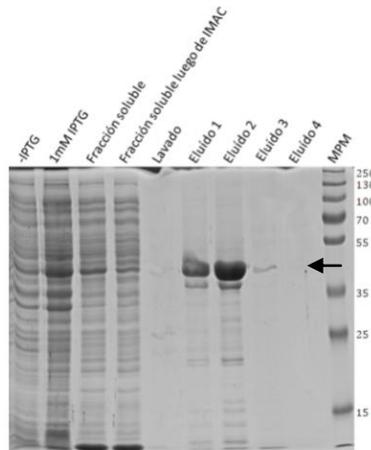


Figura 9. Purificación en columna con bomba de flujo peristáltica de TcOYE recombinante en condiciones nativas. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE 12%). En el primer carril se muestra el lisado de bacterias obtenido previo a la inducción con IPTG. Luego se sembró el lisado obtenido luego de la inducción. A continuación se sembró la fracción soluble del lisado y lo que no se unió luego de pasar esta muestra por la columna (fracción soluble luego del IMAC). Por último, se sembraron el último lavado y los eluidos (fracciones de 1.5 mL). MPM *Thermo Scientific* No: 26619.

IV.3.2. PURIFICACIÓN POR FPLC

Dados los problemas presentados con la purificación se decidió optimizar la misma empleando el sistema de purificación ÄKTA™purifier de *GE Healthcare Life Sciences* disponible en la Unidad de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo. Durante la optimización del procedimiento se determinaron tres condiciones en las cuales se consiguió una buena purificación de la proteína. Se referirá a las mismas como condición 1, 2 y 3 para diferenciarlas.

Con un solo paso de purificación por IMAC no se obtuvo una buena pureza, por lo que se realizaron dos pasos, una cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) y una cromatografía de intercambio aniónico. Las tres condiciones probadas difieren en el segundo paso de purificación, más específicamente en la composición de los buffers empleados para la cromatografía de intercambio iónico. Con las condiciones 2 y 3 de purificación se obtienen resultados muy similares. Con la condición 1 se obtienen dos bandas proteicas, similar a lo que sucedía con las purificaciones realizadas en batch o en columna con bomba peristáltica. De igual forma, también se consideró válida, dado que el rendimiento fue óptimo, y se encontró una explicación experimental al perfil proteico observado en los geles cuando se analizó por espectrometría de masas.

La siguiente tabla resume las diferencias entre las tres condiciones en las cuales se obtuvo un buen rendimiento y alta pureza de la proteína durante el proceso de optimización. El buffer A es en el cual se encuentra la muestra luego del desalado, y con el cual se equilibra la columna de la cromatografía de intercambio iónico. El buffer B es el empleado para realizar el gradiente creciente de concentración salina para eluir la muestra de la columna.

TABLA 5. DIFERENCIAS EN LOS BUFFERS USADOS EN LAS DISTINTAS CONDICIONES

	Buffers usados para el intercambio iónico	
	A	B
Condición 1	Tris 25 mM pH 8.5, NaCl 150 mM	Tris 25 mM pH 8.5, NaCl 1M
Condición 2	NaH ₂ PO ₄ 25 mM pH 7.5	NaH ₂ PO ₄ 25 mM pH 7.5, NaCl 1M
Condición 3	Tris 50 mM pH 8.05	Tris 50 mM pH 8.05, NaCl 1M

Condición 1

La inducción de la expresión fue realizada con 1 mM de IPTG a 37°C durante 4 horas. Se introdujo la fracción soluble a la columna con una bomba peristáltica y se eluyó en condiciones controladas de flujo y presión con el equipamiento nombrado.

En la figura 10 A se muestra la gráfica generada al medir la absorbancia a 280 nm durante el proceso de purificación con columna IMAC. Esta se utilizó de guía para elegir los eluidos a evaluar por SDS-PAGE. Es necesario analizar la muestra por electroforesis en gel porque la absorbancia a 280 nm es debida a la presencia de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano y fenilalanina), por lo que no es posible determinar si la proteína de interés está pura o no.

En la figura 11 se muestra la inducción de la expresión y la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). En las calles del gel sembradas con el lisado de bacterias sin inducir no se observa ninguna banda mayoritaria. Al inducir la expresión de la proteína recombinante se esperaba ver una banda mayoritaria de aproximadamente 44 kDa. Sin embargo, dada la cantidad del lisado de bacterias sembrado, la baja resolución no permite distinguir esta banda con claridad. El mismo inconveniente de concentración proteica ocurre al sembrar la fracción proteica soluble antes de la columna IMAC, y el material no unido a esta luego de realizar la cromatografía.

Se juntaron los eluidos correspondientes al pico 1 y 2 por separado (figura 10 A). Suponiendo a partir de los resultados mostrados en la figura 10 A que la proteína eluye en el pico 3, se sembraron en el gel tres fracciones de este pico por separado. La elución se consiguió con un gradiente creciente de concentración de imidazol. Como se observa en el gel las tres fracciones contenían la proteína de interés y un gran número de otras bandas principalmente de menor peso molecular.

Como no se consiguió suficiente pureza con la columna de afinidad se procedió a hacer un intercambio aniónico con una columna RESOURCE Q. Dado que los buffers empleados en la IMAC tuvieron un pH 8 y la proteína posee un punto isoeléctrico de 6,21 (teniendo la cola de poli-histidina), la carga de la misma durante la purificación era negativa, por lo tanto, se decidió realizar un intercambio aniónico. Antes del intercambio iónico se desalo la muestra. La figura 10 B esquematiza el proceso de eliminación de las sales, el cual fue eficaz.

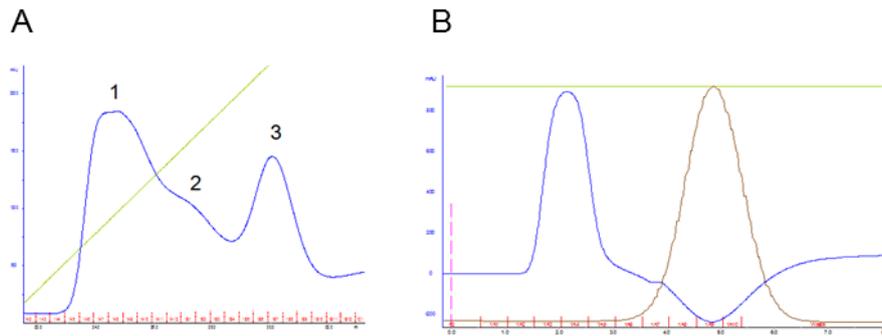


Figura 10. **A. Purificación de TcOYE en condiciones nativas.** Perfil de elución de proteínas de columna de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) medido a 280 nm. Se eluye por competencia con imidazol, el gradiente va de 10 mM a 300 mM. En azul se muestra la absorbancia medida a 280nm, y en verde el gradiente creciente de concentración imidazol. **B. Perfil de elución en el proceso de desalado de la muestra luego de IMAC.** Se empleó una columna de desalado de *GE healthcare* y el buffer E. En azul se muestra la absorbancia medida a 280 nm y en marrón la conductancia.

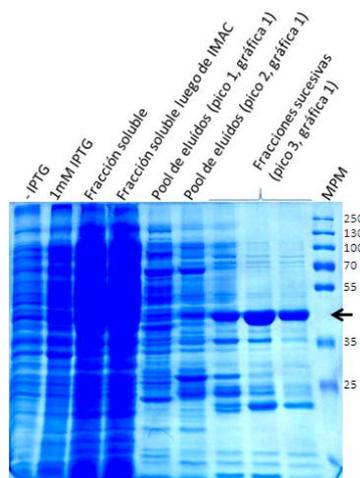


Figura 11. **Purificación de TcOYE recombinante en condiciones nativas.** Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE 12%). En la figura se muestran controles de la inducción de la expresión de la proteína en bacterias XL-1 Blue. El primer paso de purificación es una cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). Se sembró: la fracción soluble obtenida luego de la lisis de las bacterias que posteriormente se inyectó en la columna IMAC, el material que no se unió a la columna IMAC, así como las fracciones obtenidas al eluir. MPM *Thermo Scientific* No: 26619.

La cromatografía de intercambio aniónico fue monitoreada midiendo la absorbancia a 280 nm (representado en color azul en la figura 12) y a 215 nm (representado en color rosado). La elución se consigue con un gradiente creciente de concentración salina, por lo que va acompañado de un aumento de la conductancia. Otra apreciación importante es que la proteína eluyó inmediatamente que se aumentó la fuerza iónica, evidenciando cuán débil es su unión a la columna.

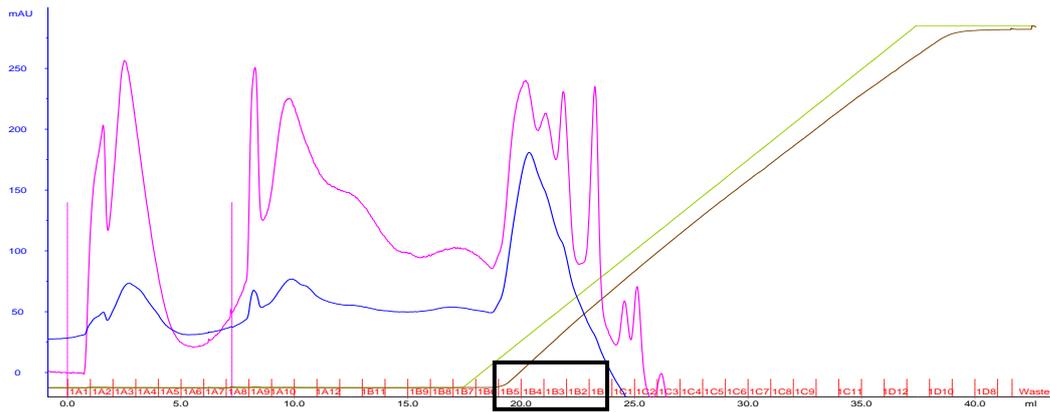


Figura 12. Purificación de TcOYE recombinante en condiciones nativas. Perfil de elución de proteínas de columna de intercambio aniónico (Resource Q) medido a 280 nm (línea azul) y 215 nm (línea rosada). Se eluye por aumento en la fuerza iónica, el gradiente va desde 150 mM a 1 M de NaCl. En verde se muestra el gradiente de concentración creciente del segundo buffer, y en marrón la conductancia. En el recuadrado negro se indican las fracciones que se sembraron en el gel de la figura 13.

El desalado y el intercambio iónico también se visualizaron por SDS-PAGE (figura 13). Como era de esperar, el perfil proteico de la muestra no varió en el desalado, simplemente se eliminan las sales para permitir el posterior intercambio iónico. Como se observa en el carril correspondiente a la muestra no unida a la columna RESOURCE Q, una cantidad considerable de la proteína no se une a la columna. El rango de condiciones de unión a la columna es muy chico, se debe considerar el flujo, la presión que se está ejerciendo en la columna, la conductividad y el pH del buffer, y los parámetros del gradiente de sales que se adiciona a la columna para eluir. Esto último se consigue adicionando progresivamente un segundo buffer a la columna (Buffer F, sección III.4.3. de materiales y métodos), que posee mayor conductividad, con un flujo determinado, y con una duración definida. En suma el intercambio iónico en estas condiciones permitió obtener dos bandas de peso molecular cercano al esperado pero la unión a la columna fue baja, disminuyendo el rendimiento final.

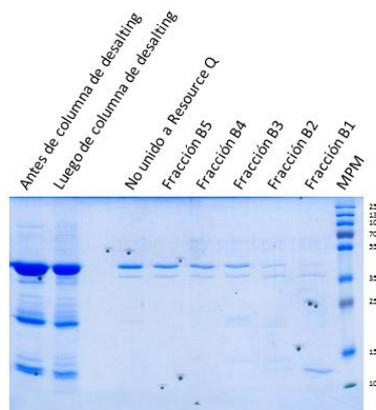


Figura 13. Purificación de TcOYE recombinante en condiciones nativas: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE 12%). Condición 1. En los primeros dos carriles se muestra el perfil proteico de la muestra durante el proceso de desalado. A continuación se sembró lo no unido a la columna de intercambio aniónico y los eluidos de la cromatografía. Se empleó una columna RESOURCE Q. MPM Thermo Scientific No: 26619.

Condiciones 2 y 3

Las condiciones de inducción de la expresión de la proteína recombinante para las condiciones 2 y 3 de purificación fueron idénticas a la ya descritas en la condición 1, 1 mM de IPTG a 37°C durante 4 horas. La figura 14 muestra el perfil proteico de la IMAC medido a 280 nm, los cuadrados negros corresponden a las fracciones de eluidos que se sembraron separados en el gel (figura 15). En cambio, los eluidos correspondientes a los picos se juntaron y se evaluaron en un solo carril en el gel. El propósito de sembrar en el gel ciertos eluidos por separado es analizar la muestra dado que no se conoce la identidad de las fracciones al hacer la purificación. A veces juntando fracciones se consigue mayor cantidad de proteína pero se agregan contaminantes, disminuyendo la pureza de la proteína de interés. En el carril de las bacterias inducidas con IPTG se observa que la cantidad de proteína obtenida en esta oportunidad fue mucho mayor que en la inducción realizada en la que se evaluó la condición 1. A su vez, la cantidad de *TcOYE* no unida a la columna fue menor, la banda correspondiente a la proteína recombinante en la fracción soluble luego de la IMAC, es considerablemente menor que la misma banda en el carril de la fracción soluble. Debido a que el paso más problemático del proceso de purificación fue el intercambio aniónico, la muestra obtenida luego de esta IMAC se fraccionó, y se probaron varias condiciones.

En la IMAC mostrada en las figuras 10 A y 11 la proteína eluyó de forma más concentrada, un solo pico contiene la proteína. En cambio, en la IMAC mostrada en las figuras 14 y 15, la proteína se encuentra en los eluidos correspondientes a dos picos diferentes. Debido a que la segunda expresión de la proteína recombinante se obtuvo un mejor rendimiento, la cantidad de proteína que se inyectó a la columna fue mayor. La columna en ese caso debió haber estado más saturada de proteína y probablemente no toda se unió con la misma afinidad. La columna empleada fue la misma, se restituyó según el protocolo del fabricante, aunque aun así probablemente la eficiencia disminuye en cada re-utilización. Esas dos razones podrían explicar los dos picos observados en la figura 14. Observando la figura 15 se puede afirmar que la proteína salió en dos picos. El perfil proteico de los eluidos en el gel es muy similar, y en todos *TcOYE* es la proteína mayoritaria aunque tampoco se encuentra en alta pureza.

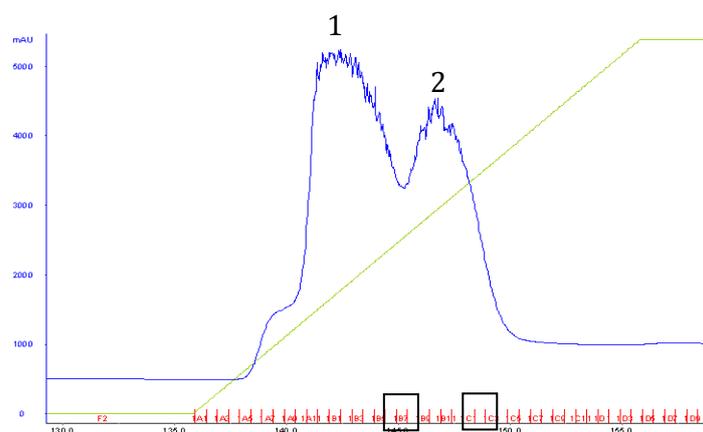


Figura 14. Purificación de *TcOYE* recombinante en condiciones nativas. Perfil de elución de proteínas de columna de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmobilizados (IMAC) medido a 280 nm. Se eluye por aumento de la concentración de imidazol, el gradiente va de 10 mM a 300 mM. En azul se muestra la absorbancia medida a 280 nm, y en verde el gradiente de concentración del segundo buffer.

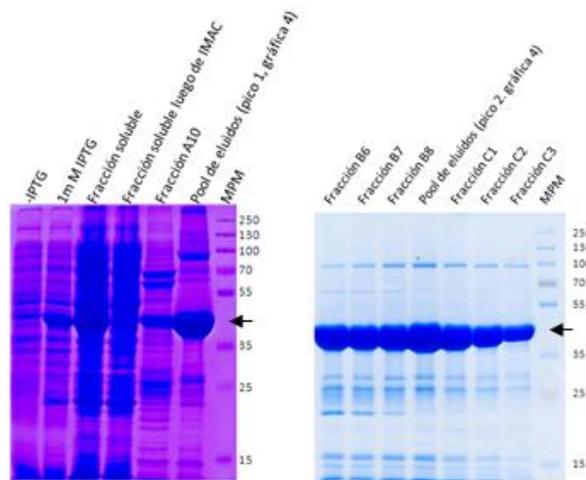


Figura 15. Purificación de TcOYE recombinante en condiciones nativas. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE 12 %). Se muestra los controles de la inducción de la expresión de la proteína, la fracción soluble con la cual se realizó la purificación, el material no unido a la columna IMAC, y los eluidos del primer paso de purificación. Se indica con flechas la banda correspondiente a la proteína recombinante TcOYE. MPM *Thermo Scientific* No: 26619.

Como ya se mencionó, las muestras que se utilizaron para realizar la cromatografía de intercambio iónico de las condiciones 2 y 3 (figura 16) provienen de la misma IMAC. Tanto el patrón de bandas observado en el gel (figura 17) como la curva de las gráficas de elución de las proteínas en ambas condiciones son muy similares. El eje de las abscisas en la figura 16 tiene la misma escala de mAU en A y en B, y la altura de las curvas es similar. En ambos casos se obtuvo la proteína en buenos niveles de pureza y en gran cantidad.

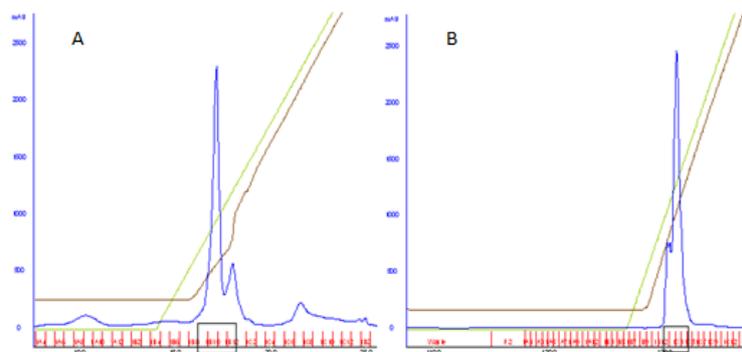


Figura 16. Purificación de TcOYE recombinante en condiciones nativas. Perfil de elución de proteínas de columna de intercambio aniónico (Resource Q) medido a 280 nm (línea azul). Se eluye por aumento en la fuerza iónica, el gradiente va de 0 a 1 M de NaCl. En verde se muestra el gradiente de concentración creciente del segundo buffer, y en marrón la conductancia. En los recuadrados negros se indican las fracciones que se sembraron en el gel de la figura 14. **A.** Intercambio aniónico de condición 2. **B.** Intercambio aniónico de condición 3

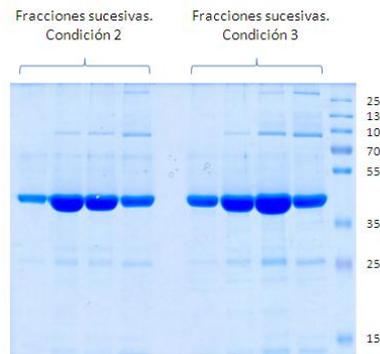


Figura 17. Purificación de TcOYE recombinante en condiciones nativas: Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE 12%). Se sembraron las fracciones indicadas en la grafica 5 correspondiente a las condiciones 2 y 3. Se empleó una columna RESOURCE Q. MPM *Thermo Scientific* No: 26619.

Por otra parte, la Old Yellow Enzyme debe su nombre a la presencia de su grupo prostético, mononucleósido de flavina, que le da su coloración amarilla característica. En la figura 18 se muestra la tonalidad característica que se observó durante el proceso de purificación.

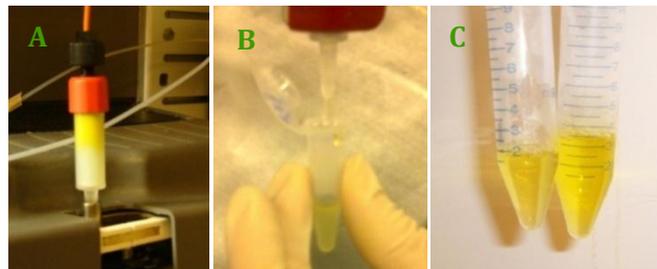


Figura 18. Coloración característica de la proteína debido al FMN. A- Fracción soluble cargada a la columna IMAC previo a la elución. B- Elución de la cromatografía de afinidad por iones metales inmovilizados en el caso de la purificación por fuerza de gravedad. C- Pool de eluidos luego de una purificación.

Una vez obtenida la proteína TcOYE purificada se inocularon conejos con el objetivo de generar anticuerpos policlonales contra esta proteína. La inoculación se realizó de forma subcutánea con proteína obtenida de varias purificaciones diferentes. Los sueros resultantes se probaron contra la proteína recombinante, resultando reactivos (figura 19) y se emplearon como herramienta para los estudios que se muestran a continuación.

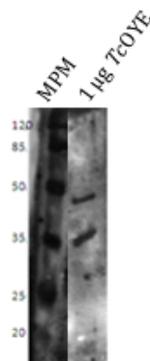


FIGURA 19. Western blot utilizando suero anti-TcOYE generado en conejo, dilución 1/500. El anticuerpo secundario es anti-conejo conjugado a HRP. Revelado utilizando kit *super signal west pico chemiluminescent substrate* de *Pierce*.

Debido a que en varias de las purificaciones se observan dos bandas mayoritarias, se enviaron libres de queratina a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica para dilucidar su identidad. Se realizó la identificación de proteínas por MALDI-TOF con datos de MS y MS/MS. Para la búsqueda se empleó la base de datos local y la base de datos pública.

En la figura 20 se muestra a modo de ejemplo el espectro global obtenido para la banda de mayor peso molecular y en la figura 21 se muestra los péptidos identificados por espectrometría de masa. Los datos permitieron concluir que ambas bandas de menor tamaño analizadas eran debidas a una degradación C-terminal de la proteína recombinante.

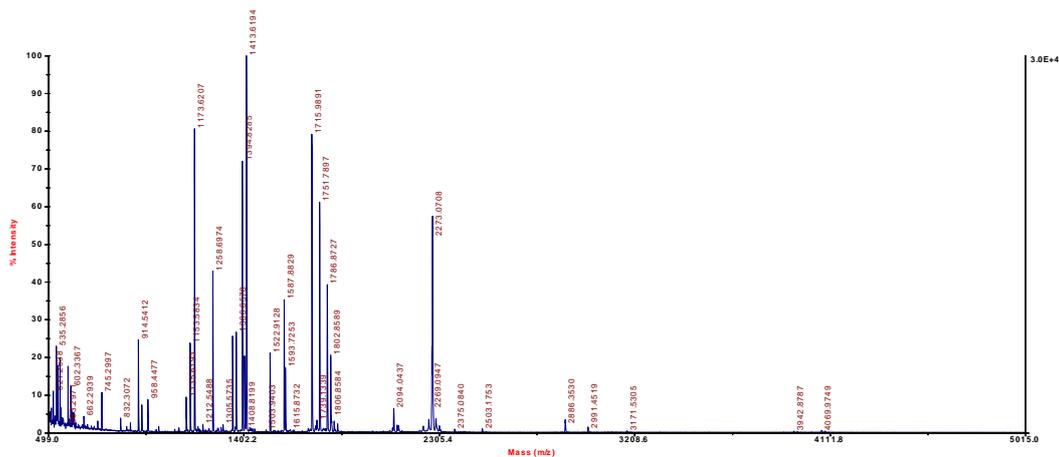


Figura 20. Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo. MALDI-TOF-TOF. Caracterización de la identidad de la doble banda reconocida por el suero anti-*TcOYE* generado en conejo mediante espectrometría de masa realizada en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo. Se obtuvo una cobertura de secuencia de 86%.

```

1 MRGSHDHHH GSACELGTMA TPELLRPLK LGRYTLRNRI IMAPLTRCQA
51 TEDGHVPRTE SHLKYYEDRA SAGLIAEAT MVQPNYTGFL TEPGIYSDAQ
101 IEEWRKIVDA VHKKGGLIFL QLIHAGRAGI PEKILQQPKS DQDPLAGRLL
151 AASAIPKDH RIPAYFAASG EKETYGVPEE LTDDEVNRNGI IPLFVEGAKN
201 AIFKAGFDGV EIHGANGYLL DAFFRESSNK RQSGPYAGTT IDTRCQLIYD
251 VTKSVCDAVG SDRVGLRISP LNGVHGMIDS NPEALTKHLC KKIEPLSLAY
301 LHYLRGMVN QQIGDVVAWV RGSYSGVKIS NLYDFEAD QQIREGKVDA
351 VAFGAKFIAN PDLVERAQHD WPLNEPRPET YYTRTAVGYN DYPTYMNN

```

Figura 21. Péptidos que fueron identificados con la espectrometría de masa. En rojo se indican los aminoácidos identificados con el análisis de la banda mayoritaria de las purificaciones de *TcOYE* recombinante. Los aminoácidos identificados se muestran sobre la secuencia de *TcOYE* clonada.

IV.4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE *TcOYE* EN EPIMASTIGOTAS

Mediante western blot se estudió la expresión de *TcOYE* en epimastigotas. Los extractos proteicos totales de epimastigotas se obtuvieron durante la fase exponencial de crecimiento. Cuando el medio de cultivo tenía una concentración de 60×10^6 parásitos/mL se realizó la preparación de los extractos como se detalla en materiales y métodos. Figura 22.

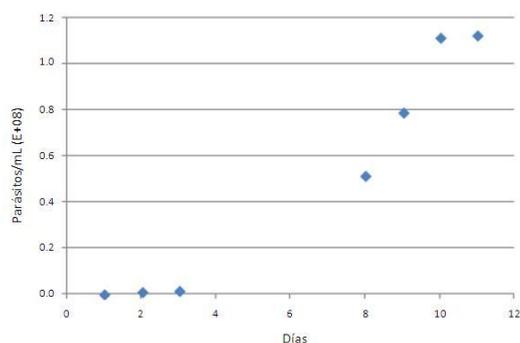


Figura 22. Curva de crecimiento de epimastigotas. Se partió de 1×10^6 parásitos/mL. La curva se realizó contando la cantidad de parásitos por mL utilizando cámara de Neubauer.

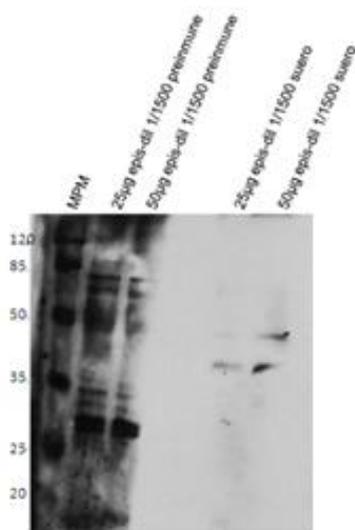


Figura 23. Western blot utilizando suero anti-*TcOYE* generado en conejo. Los parásitos empleados son epimastigotas. El anticuerpo secundario es anti-conejo conjugado a HRP. Revelado utilizando kit *super signal west pico chemiluminescent substrate* de Pierce.

El análisis por western blot utilizando el suero de conejo anti *TcOYE* mostró dos bandas en los extractos totales de epimastigotas, una situada alrededor de 42 kDa y otra cercana a los 35 kDa (Figura 23). Este perfil proteico se observa en los carriles en los cuales se evaluó el suero contra 25 y 50 µg de extracto de proteínas totales de epimastigotas. El suero pre inmune a esta dilución no mostró señal de reconocimiento de la proteína de estudio, por lo que se continuaron los estudios con el suero anti-*TcOYE*.

Es notable que una doble banda también se observó en la proteína recombinante como en la proteína *TcOYE* del parásito que reconoce el suero en el extracto de epimastigotas. Esto puede deberse a lo mismo, una producto de degradación C-terminal como se vió en la espectrometría de masa. Para ahondar en esta pregunta se realizó la búsqueda de un péptido señal en la secuencia de *TcOYE*. Se buscaron posibles péptidos señal por homología en bases de datos y programas como SignalP 4.1, ExPASy, PrediSi y UniProt, pero no se encontraron. Más allá de que la diferencia entre las bandas es demasiado grande para ser debido a la pérdida del péptido señal también hay que tener en cuenta que estas bases de datos no están adaptadas para tripanosomatidos.

IV.5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE *TcOYE* EN EPIMASTIGOTAS

Para el estudio de la distribución de las proteínas en los epimastigotas se empleó la técnica inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo policlonal anti-*TcOYE* generado en conejo como anticuerpo primario, y el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado alexa 488 como anticuerpo secundario. La figura 24 muestra que *TcOYE* tendría una localización citoplasmática y estaría concentrada en la región perinuclear, en la parte anterior del parásito.

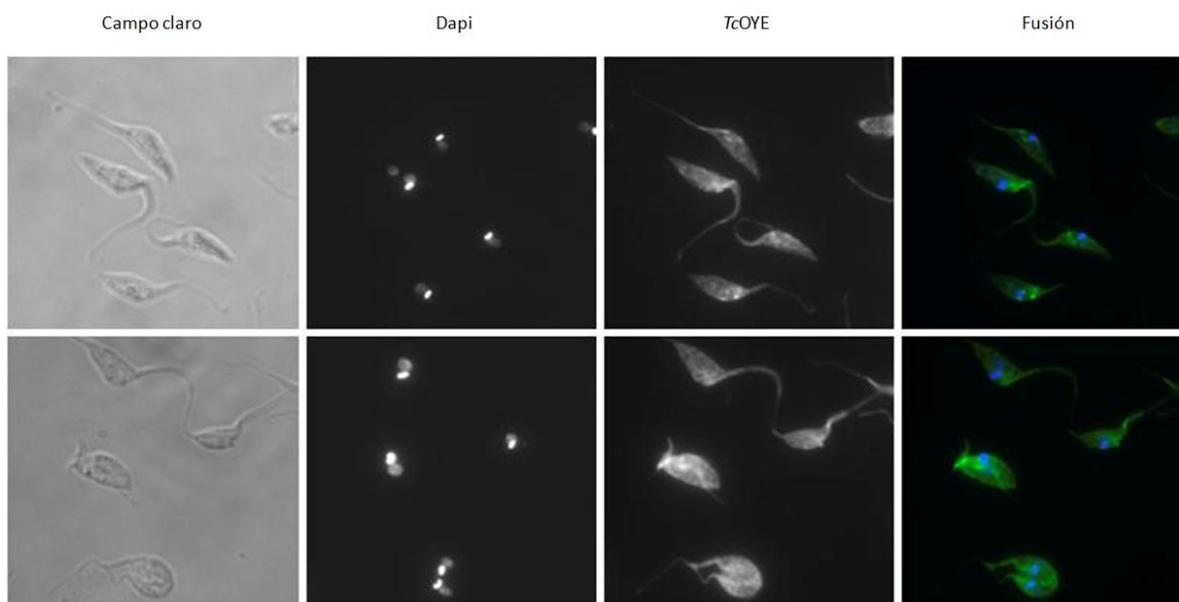


Figura 24 Inmunofluorescencia indirecta con suero anti-*TcOYE*. Se utilizaron parásitos epimastigotas y dilución de suero 1/100. El anticuerpo secundario es anticuerpo anti-conejo conjugado Alexa 488. (Barra de calibración 10 μ M)

Se realizaron estudios de inmunofluorescencia indirecta co-localizando *TcOYE* con varias proteínas. En el laboratorio se cuenta con anticuerpos policlonales generados en ratón contra: Cruzipaína (*TcCz*), triparredoxina peroxidasa mitocondrial (*TcMPX*), triparredoxina peroxidasa citosólica (*TcCPX*), *TcGlucoquinasa*, ascorbato peroxidasa (*TcAPX2*). Se ensayaron varias diluciones de anticuerpos primarios. En la figura 25 se muestra que utilizando el suero anti-*TcCruzipaína* se observó co-localización, si bien es un resultado preliminar. La co-localización es notoria en la parte anterior del parásito, aunque también se observa que *TcOYE* está distribuido por otras partes del parásito. En los otros casos no se observó co-localización. La colocación con *TcCruzipaína* es un resultado sorprendente dado que en la bibliografía está reportado que la localización de *TcOYE* es citoplasmática mientras que la proteasa cruzipaína se encuentra mayormente en reservosomas. Los experimentos de inmuno-localización deberían completarse con ensayos de competencia con la proteína recombinante soluble al momento de realizar la inmunofluorescencia indirecta, lo que ayudaría a verificar la especificidad del suero. Además el western blot mostró dos bandas, esto significa que en suero reconoce la misma proteína con alguna modificación que cambie su masa molecular o eventualmente está reconociendo dos proteínas con diferente peso molecular. Como en la proteína

recombinante también se observan dos bandas con una diferencia de tamaño similar, parece ser que las dos bandas corresponden a una modificación de la misma proteína.

No debería descartarse el resultado obtenido con la co-localización dado que hay un artículo en el cual se estudia la localización subcelular de $PGF_{2\alpha}$ sintasa de *Leishmania* y en el cual se describe que la localización es citoplasmática, pero en uno de los ensayos observan que es de distribución reticular (Kabutu, et al., 2002).

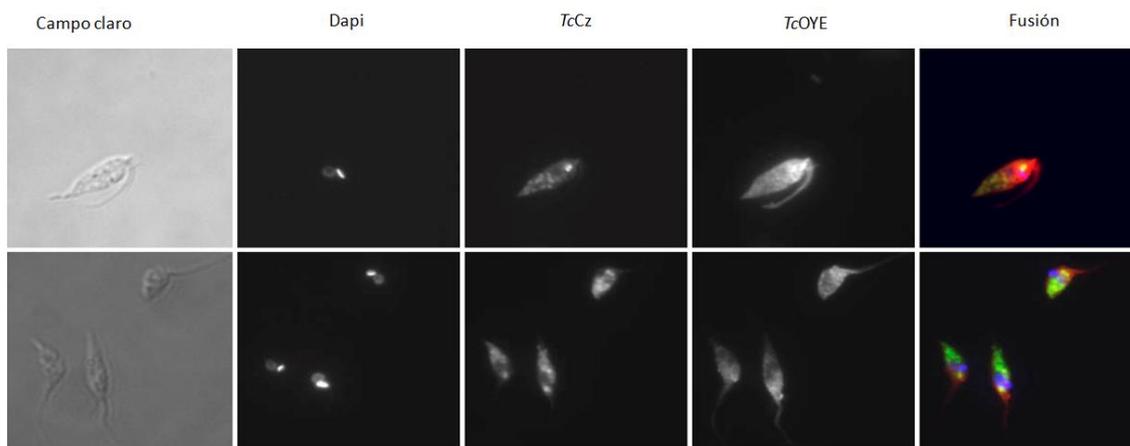


Figura 25. Inmunofluorescencia indirecta, colocalización TcOYE-TcCRUZIPAÍNA (TcCZ). Se utilizaron parásitos en el estadio epimastigotas. La dilución de suero anti-TcOYE fue 1/300 y la dilución de suero de anti-TcCz 1/50, el anticuerpo secundario fue anticuerpo anti-conejo conjugado alexa 488 para TcOYE y anti-mouse conjugado a cy3 para TcCruzipaína. (Barra de calibración 10 μ m)

IV.6. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE TcAKR RECOMBINANTE

En este trabajo se realizó la expresión y purificación de la proteína TcAKR recombinante. A su vez, se generaron anticuerpos policlonales mediante inmunización de conejos con la proteína.

La expresión de la proteína recombinantes fue inducida a través de la adición de 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37°C. La purificación se realizó en condiciones desnaturalizantes ya que la proteína se expresó de forma insoluble en las condiciones probadas. La purificación de esta proteína presentó menos problemas, mediante cromatografía de afinidad en batch con resina de Niquel-NTA se obtuvo la proteína pura (Figura 25) y el rendimiento fue bueno. A pesar de que parte de la proteína eluyó en los lavados se obtuvo un buen rendimiento. A partir de la proteína purificada se inocularon conejos para la obtención de anticuerpos policlonales, los cuales fueron reactivos contra la proteína recombinante.

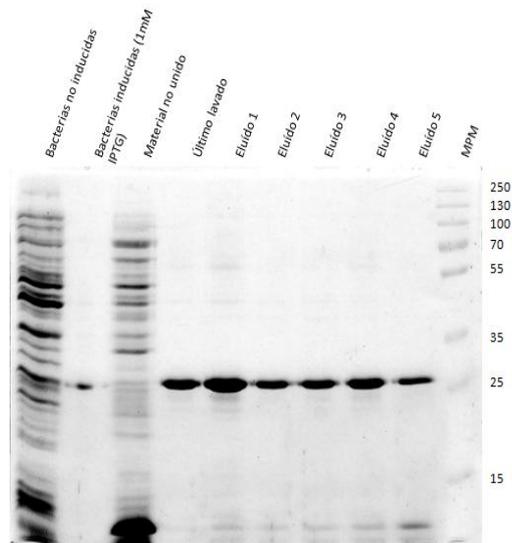


Figura 26 Purificación de TcAKR recombinante en condiciones desnaturalizantes. Electroforesis en gel de acrilamida (SDS PAGE 12%). En la figura se muestran controles de la inducción de la expresión de la proteína en bacterias M15 y el patrón de migración de la muestra durante la purificación por cromatografía de afinidad en batch con resina de Niquel-NTA. MPM *Thermo Scientific* No: 26619.

V. DISCUSIÓN

Estudios muy recientes indican que *Trypanosoma cruzi* induce la expresión génica de la ciclooxigenasa-2 de miocardio, dando lugar a la producción y liberación de mediadores inflamatorios como eicosanoides (prostaglandinas E(2) y F(2 α))(Corral, et al., 2013, Gomes, et al., 2013, Sharma, et al., 2013). Por otro lado, Machado y Maya sugieren que los eicosanoides derivados de ciclooxigenasas tienen implicancias en la cardiopatogénesis de la enfermedad de Chagas (Machado, et al., 2011, Maya, et al., 2011). A su vez, se asocia a PGF₂ α con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en general (Helmersson-Karlqvist, et al., 2013). Las cardiomiopatías son la sintomatología más frecuente en la enfermedad de Chagas, y representan la principal causa de morbilidad y mortalidad. Es evidente que las prostaglandinas, y en particular PGF₂ α , posiblemente podrían estar implicadas en la patogénesis. Esta información es reciente y es un área que se está comenzando a estudiar actualmente.

Está claro en la bibliografía que *TcOYE* cataliza la síntesis de PGF₂ α en *Trypanosoma cruzi*. Reduce PGH₂ a PGF₂ α con un sistema generador de NADPH (Ashton, et al., 2007, Kubata, et al., 2002, Okamoto, et al., 2011). Sin embargo son muy escasos los estudios acerca de la producción de prostaglandinas por parte de este parásito en el contexto de la infección. Es importante destacar que esta enzima se ha identificado en levaduras, plantas y bacterias, pero no en animales (Kubata, et al., 2002), por lo que cumple con una de las características importantes ser un posible nuevo blanco terapéutico. Otro requerimiento sería que dicha proteína cumpla un rol esencial para el parásito. Esto contribuye directamente a la relevancia de este proyecto, el cual plantea el estudio biológico de dicha enzima en el contexto de la infección y su potencial como nuevo blanco terapéutico.

El hecho que *TcOYE* catalice la síntesis de PGF₂ α es una característica única de *T. cruzi* respecto a otros tripanosomátidos como *T. brucei*, *Leishmania*, y *Crithidia fasciculata*, en los cuales, la síntesis de PGF₂ α es catalizada por aldo-ketoreductasas que son marcadamente diferentes a *TcOYE*. En *T. cruzi* *TcAKR* posee alta similitud con las prostaglandinas sintasas de los otros tripanosomas. Su capacidad como prostaglandina sintasa en *T. cruzi* fue probada con la enzima recombinante *in vitro* con resultados negativos (Garavaglia, et al., 2010). De todas formas estudios adicionales son necesarios para conocer el rol fisiológico de esta enzima. Un escenario posible es que ambas enzimas funcionen como prostaglandinas sintasas en diferentes momentos del ciclo de vida o ante diferentes estímulos. También es posible que en algún momento de la evolución ambas tuvieran la misma función, y más tarde esa función solo pasó a ser realizada por la Old Yellow Enzyme *TcOYE*. Si suponemos que *TcOYE* se adquirió como una ventaja evolutiva luego de diferenciarse de *T. brucei*, y teniendo presente la relevancia de esta actividad enzimática en *T. brucei*, podemos inferir que muy probablemente la actividad PGF₂ α sintasa de *TcOYE* sea de gran importancia para el parásito *T. cruzi* en el contexto de una infección.

Para estudiar la similitud aminoacídica entre las enzimas con actividad prostaglandina F₂ α de *T. cruzi* y *T. brucei* se realizó el alineamiento múltiple que se muestra en resultados. Se diferencian dos grandes grupos, las OYEs son muy similares entre sí, y lo mismo sucede con las AKRs. Si bien hay ciertas regiones de conservación, son enzimas marcadamente diferentes en cuanto a su secuencia aminoacídica. En concordancia con estos resultados, Kubata plantea que *TcOYE* es marcadamente distinta

de la familia AKR de PGF₂ α sintasas (Kubata, et al., 2007). A su vez, *TcOYE* no presenta homólogos en mamíferos y *TbPGFS* es muy distinta a sus homólogos en mamíferos. *TcOYE* de *T. cruzi* es similar a la OYE de levaduras (Machado, et al., 2011), lo cual efectivamente se puede comprobar en el alineamiento. El alineamiento refleja lo descrito en la bibliografía acerca de la similitud de estas proteínas.

Murta observó que los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas y proteicas de *TcOYE* de 9 cepas diferentes muestran que los polimorfismos están más bien asociados con el zymodeme (grupo de parásitos con la misma isoenzima) que con el fenotipo resistente al Benznidazole. No se localizó ninguna mutación en el sitio activo en estas variantes.

Por otra parte, en este trabajo se llevó a cabo un análisis filogenético donde se estudió la similitud de *TcOYE* con enzimas de otros organismos. *TcOYE* es claramente similar a enzimas de tipo OYE de bacterias y otros protozoos y se encuentra ausente en la mayoría de los eucariotas exceptuando grupos de hongos y plantas. La alta similitud de *TcOYE* con las enzimas de bacterias, especialmente proteobacterias, podría explicarse por una *transferencia* horizontal reciente.

Sin embargo, no es posible asegurar a partir del árbol que hubo *transferencia* horizontal desde una bacteria, este resultado es solo un indicio que permitirá continuar el estudio utilizando otros métodos para comparar si realmente existió dicho evento. En este sentido, un resultado que llama la atención es la división de OYE en dos linajes bacterianos independientes, y que uno de estos linajes tenga más homología con enzimas de protozoarios que con el otro linaje bacteriano, indicando una posible evolución no vertical de este grupo de proteínas. Se plantea que las enzimas de la biosíntesis de eicosanoides en kinetoplastidos son diferentes a la de los mamíferos. A su vez, al menos en el caso de *TcOYE*, son más similares a las de los procariotas como se observa en el estudio filogenético realizado en este trabajo.

No hay estudios filogenéticos publicados con *TcOYE* y sus homólogos, pero sí de *TbPGFS*. Esta proteína es diferente no sólo de otras AKRs de mamíferos, sino también de plantas, levaduras y procariotas. Sin embargo, posee mayores valores de similitud con las proteínas bacterianas, similar a lo que sucede con *TcOYE*. Según Kubata et al. (2000), la función de síntesis de PG sintasa parece haber existido hace mucho tiempo ya que se encuentra en organismos que divergieron tempranamente. Los autores observaron que en *T. brucei* la función PGFS es realizada por una proteína diferente a las del resto de los organismos que tomaron en cuenta para el estudio, por lo que los autores plantean la posibilidad de evolución convergente (Kubata, et al., 2000). A pesar de ser diferente en cuanto a la secuencia, la estructura tridimensional global de estas enzimas es similar (Kilunga, et al., 2005). La estructura tridimensional de *TbPGFS* además es similar a la de *TcOYE*. Sería interesante realizar un estudio filogenético completo tanto para las OYEs como para las enzimas similares a *TbPGFS* incluida *TcAKR*.

Por otro lado, hay estudios de la localización subcelular de la enzima *TcOYE* mediante inmunofluorescencia y sobre los niveles de expresión durante el ciclo de vida. En la figura 6 del anexo se muestra las microscopías donde señalan localización citoplasmática y los inmunoblot donde se muestra su expresión a lo largo de todo el ciclo de vida (Uchiyama, et al., 2005). A pesar de los estudios realizados, no se hicieron ensayos de inmunofluorescencia colocalizando con marcadores específicos de organelos.

Los resultados obtenidos por Uchiyama difieren a los obtenidos en este trabajo. Propone localización citoplasmática mientras que en el presente estudio se observó que la

distribución de la proteína es citosólica pero con cierta preferencia por la parte anterior del parásito (figura 25 de resultados). Sin embargo, este resultado debería completarse con otros estudios como fraccionamiento subcelular y utilización de marcadores de organelos más específicos. Teniendo en cuenta que la localización subcelular de $\text{PGF}_2\alpha$ sintasa de *T. brucei* y *Leishmania* es citosólica es razonable pensar que la de *TcOYE* también pueda serlo. Dado que durante este trabajo se generaron herramientas que incluyen construcciones para la expresión de proteínas de fusión fluorescentes en el parásito será posible complementar los estudios de localización y así entender mejor las funciones e importancia de estas enzimas.

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se clonaron y secuenciaron las regiones codificantes de las proteínas *TcOYE* y *TcAKR* de *Trypanosoma cruzi* en vectores de expresión de bacterias y parásitos.

Los análisis de sus secuencias indican que ambas enzimas conservan una similitud limitada entre sí, y con sus homólogos en mamíferos.

El clonado de los marcos abiertos de lectura y la expresión de las proteínas recombinantes en bacterias permitió la obtención de anticuerpos policlonales contra estas. Esto permitió evidenciar la expresión de la proteína *TcOYE* en epimastigotas en cultivo por *Western blot* y realizar estudios de localización subcelular mediante inmunofluorescencia indirecta. En estos últimos se observó que la proteína se localiza en el citosol, concentrada en la región anterior del parásito.

Dentro de las perspectivas a futuro de este trabajo se encuentra hacer ensayos de competencia de la proteína *TcOYE* recombinante con el antisuero en inmunofluorescencia indirecta para analizar la especificidad de la señal en dicho método inmuno-enzimático. A su vez se pretende repetir estos ensayos con anticuerpos purificados contra la proteína recombinante. También se pretenden hacer estudios de la expresión de *TcAKR* empleando el suero generado en conejo como herramienta. También es de interés conocer si existe para *TcAKR* una función como prostaglandina sintasa. Además, en un mediano plazo se pretende estudiar la posible relación de *TcOYE* y *TcAKR* con la infectividad de los parásitos sobre células en cultivo y si es que estas son esenciales para este u otros procesos en el curso de la enfermedad.

Es de interés el estudio de PGFs parasitarias con el fin de obtener una mejor comprensión de las funciones patológicas asociadas de sobreproducción $\text{PGF}_2\alpha$ y para guiar el desarrollo de inhibidores. El hecho que *T. cruzi* produzca prostaglandinas (PGs) y que *TcOYE* catalice la formación de $\text{PGF}_2\alpha$ plantea interrogantes sobre la biología de *T. cruzi* y del rol de las PGs en la interacción con su huésped mamífero. Las prostaglandinas sintasas caracterizadas en tripanosomatidos, revelan marcadas diferencias comparadas con sus homólogos en mamíferos. Si son fisiológicamente relevantes para la biología del parásito, estas diferencias las hacen blancos apropiados para el diseño racional de fármacos antiparasitarios. De notable interés es *TcOYE*, que tiene un rol doble en el parásito: la síntesis de $\text{PGF}_2\alpha$ y el metabolismo de fármacos tripanocidas. Esta enzima podría tener un rol clave en la supervivencia de *T. cruzi* en el huésped.

VII. ABREVIATURAS

°C Grado centígrado
ADN ácido desoxiribonucleico
BLAST Basic Local Alignment and Search Tool
BSA albúmina de suero bovino
C-terminal carboxilo terminal
Da dalton
DAPI 4',6-diamidino-2-fenil-indol
DTT ditioneitol
dNTP Desoxinucleósido-5'- trifosfato
EDTA Ácido etilén-diamino-tetracético
g Aceleración de la gravedad terrestre
GFP proteína verde fluorescente
HRP Horseradish Peroxidasa
IPTG Isopropil-β-D-tiogalactósido
KDa Kilodaltons
LB Medio de cultivo Luria Bertani
LIT Liver-triptose infusion, infusión hígado-triptosa
mA Miliamperio
NADH Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADPH Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
N-terminal amino terminal
ORF open reading frame, marco abierto de lectura
pb pares de bases
PBS tampón salino de fosfato
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF fenil metil sulfonil fluoruro
p/v Relación peso a volumen
SDS dodecil sulfato sódico
TEMED N,N,Ñ;N'-tetrametiletilendiamina
Tween 20 Polioxietilén sorbitan monolaurato
V Voltios
v/v Relación volumen a volumen
TAE Tris-acetato-EDTA
X-Gal 5-Bromo-4-cloro-3-indoil--D-galactósido 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside
FPLC Cromatografía líquida rápida de proteínas

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Allaj, V., Guo, C., and Nie, D., 2013. Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer. *Cell Biosci* 3, 8.
2. Andrus, J., Bottazzi, M. E., Chow, J., Goraleski, K. A., Fisher-Hoch, S. P., Lambuth, J. K., Lee, B. Y., Margolis, H. S., McCormick, J. B., Melby, P., Murray, K. O., Rico-Hesse, R., Valenzuela, J. G., and Hotez, P. J., 2013. Ears of the Armadillo: Global Health Research and Neglected Diseases in Texas. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2021.
3. Ashton, A. W., Mukherjee, S., Nagajyothi, F. N., Huang, H., Braunstein, V. L., Desruisseaux, M. S., Factor, S. M., Lopez, L., Berman, J. W., Wittner, M., Scherer, P. E., Capra, V., Coffman, T. M., Serhan, C. N., Gotlinger, K., Wu, K. K., Weiss, L. M., and Tanowitz, H. B., 2007. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 204, 929-940.
4. Bern, C., 2011. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 364, 2527-2534.
5. Cavalcanti, D. P., Thiry, M., de Souza, W., and Motta, M. C., 2008. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. *Histochem Cell Biol* 130, 1177-1185.
6. Contreras, V. T., Araujo-Jorge, T. C., Bonaldo, M. C., Thomaz, N., Barbosa, H. S., Meirelles Mde, N., and Goldenberg, S., 1988. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83, 123-133.
7. Corral, R. S., Guerrero, N. A., Cuervo, H., Girones, N., and Fresno, M., 2013. *Trypanosoma cruzi* infection and endothelin-1 cooperatively activate pathogenic inflammatory pathways in cardiomyocytes. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2034.
8. Chagas, 1909. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homen. . *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 159-218.
9. de Souza, W., 2008. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des* 14, 822-838.
10. de Souza, W., de Carvalho, T. M., and Barrias, E. S., 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* 2010.
11. de Souza, W., Morgado-Diaz, J. A., and Cunha-e-Silva, N. L., 2008. Cell fractionation of parasitic protozoa. *Methods Mol Biol* 425, 313-331.
12. Dirceu E. Teixeira, M. B., Paulo Henrique Crepaldi, Wanderley de Souza, 2011. Atlas didático Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.
13. Figarella, K., Uzcategui, N. L., Beck, A., Schoenfeld, C., Kubata, B. K., Lang, F., and Duzenko, M., 2006. Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. *Cell Death Differ* 13, 1802-1814.
14. Garavaglia, P. A., Cannata, J. J., Ruiz, A. M., Maugeri, D., Duran, R., Galleano, M., and Garcia, G. A., 2010. Identification, cloning and characterization of an aldo-keto reductase from *Trypanosoma cruzi* with quinone oxido-reductase activity. *Mol Biochem Parasitol* 173, 132-141.
15. Gomes, J. A., Molica, A. M., Keesen, T. S., Morato, M. J., de Araujo, F. F., Fares, R. C., Fiuza, J. A., Chaves, A. T., Pinheiro, V., Nunes, M. D., Correa-Oliveira, R., and da Costa Rocha, M. O., 2013. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. *Hum Immunol*.
16. Helmersson-Karlqvist, J., Arnlov, J., Larsson, A., and Basu, S., 2013. Prostaglandin F2alpha formation is associated with mortality in a Swedish community-based cohort of older males. *Eur Heart J*.

17. Helmersson, J., and Basu, S., 2006. Intra-day variation of in vivo prostaglandin F2alpha formation in healthy subjects. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80, 93-99.
18. Hirata, T., and Narumiya, S., Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. *Adv Immunol* 116, 143-174.
19. Kabututu, Z., Martin, S. K., Nozaki, T., Kawazu, S., Okada, T., Munday, C. J., Duszenko, M., Lazarus, M., Thuita, L. W., Urade, Y., and Kubata, B. K., 2002. Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 32, 1693-1700.
20. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., and Tanabe, M., KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* 40, D109-114.
21. Kelly, J. M., Ward, H. M., Miles, M. A., and Kendall, G., 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 20, 3963-3969.
22. Kilunga, K. B., Inoue, T., Okano, Y., Kabututu, Z., Martin, S. K., Lazarus, M., Duszenko, M., Sumii, Y., Kusakari, Y., Matsumura, H., Kai, Y., Sugiyama, S., Inaka, K., Inui, T., and Urade, Y., 2005. Structural and mutational analysis of *Trypanosoma brucei* prostaglandin H2 reductase provides insight into the catalytic mechanism of aldoketoreductases. *J Biol Chem* 280, 26371-26382.
23. Kubata, B. K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O., 2000. Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*. *J Exp Med* 192, 1327-1338.
24. Kubata, B. K., Duszenko, M., Martin, K. S., and Urade, Y., 2007. Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends Parasitol* 23, 325-331.
25. Kubata, B. K., Kabututu, Z., Nozaki, T., Munday, C. J., Fukuzumi, S., Ohkubo, K., Lazarus, M., Maruyama, T., Martin, S. K., Duszenko, M., and Urade, Y., 2002. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 196, 1241-1251.
26. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
27. Le Loup, G., Pialoux, G., and Lescure, F. X., 2011. Update in treatment of Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* 24, 428-434.
28. Lima, F. M., Oliveira, P., Mortara, R. A., Silveira, J. F., and Bahia, D., 2010. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *N Biotechnol* 27, 837-843.
29. Lorenzi, H. A., Vazquez, M. P., and Levin, M. J., 2003. Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 310, 91-99.
30. Machado, F. S., Mukherjee, S., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., and Ashton, A. W., 2011. Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Parasitol* 76, 1-31.
31. Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilescu, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I., Stern, L. S., Wang, Z., Ullu, E., and Tschudi, C., 2000. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6, 163-169.
32. Maya, J. D., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., Lopez-Munoz, R., and Morello, A., 2011. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res* 43, 323-331.
33. Moncayo, A., 2003. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 577-591.
34. Murakami, M. T., Rodrigues, N. C., Gava, L. M., Honorato, R. V., Canduri, F., Barbosa, L. R., Oliva, G., and Borges, J. C., 2013. Structural studies of the *Trypanosoma cruzi*

- Old Yellow Enzyme: Insights into enzyme dynamics and specificity. *Biophys Chem* 184, 44-53.
35. Murta, S. M., Krieger, M. A., Montenegro, L. R., Campos, F. F., Probst, C. M., Avila, A. R., Muto, N. H., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R., Nirde, P., Bruna-Romero, O., Goldenberg, S., and Romanha, A. J., 2006. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 146, 151-162.
 36. Nagajyothi, F., Machado, F. S., Burleigh, B. A., Jelicks, L. A., Scherer, P. E., Mukherjee, S., Lisanti, M. P., Weiss, L. M., Garg, N. J., and Tanowitz, H. B., 2012. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol* 14, 634-643.
 37. Notredame, C., Higgins, D. G., and Heringa, J., 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302, 205-217.
 38. Noverr, M. C., Erb-Downward, J. R., and Huffnagle, G. B., 2003. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev* 16, 517-533.
 39. Nunes, M. C., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., and Ribeiro, A. L., 2013. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol* 62, 767-776.
 40. Okamoto, N., Yamaguchi, K., Mizohata, E., Tokuoka, K., Uchiyama, N., Sugiyama, S., Matsumura, H., Inaka, K., Urade, Y., and Inoue, T., 2011. Structural insight into the stereoselective production of PGF2alpha by Old Yellow Enzyme from *Trypanosoma cruzi*. *J Biochem* 150, 563-568.
 41. Opperman, D. J., Sewell, B. T., Litthauer, D., Isupov, M. N., Littlechild, J. A., and van Heerden, E., 2010. Crystal structure of a thermostable old yellow enzyme from *Thermus scotoductus* SA-01. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 426-431.
 42. Rassi, A., Jr., Rassi, A., and Marcondes de Rezende, J., 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am* 26, 275-291.
 43. Rassi, A., Jr., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A., 2010. Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-1402.
 44. Requena-Mendez, A., Lopez, M. C., Angheben, A., Izquierdo, L., Ribeiro, I., Pinazo, M. J., Gascon, J., and Munoz, J., 2013. Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11, 957-976.
 45. Sharma, J., Eickhoff, C. S., Hoft, D. F., Ford, D. A., Gross, R. W., and McHowat, J., 2013. The absence of myocardial calcium-independent phospholipase A2gamma results in impaired prostaglandin E2 production and decreased survival in mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 81, 2278-2287.
 46. Sugiyama, S., Tokuoka, K., Uchiyama, N., Okamoto, N., Okano, Y., Matsumura, H., Inaka, K., Urade, Y., and Inoue, T., 2007. Preparation, crystallization and preliminary crystallographic analysis of old yellow enzyme from *Trypanosoma cruzi*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63, 896-898.
 47. Taylor, M. C., and Kelly, J. M., 2006. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol* 6, 32.
 48. Uchiyama, N., Kabututu, Z., Kubata, B. K., Kiuchi, F., Ito, M., Nakajima-Shimada, J., Aoki, T., Ohkubo, K., Fukuzumi, S., Martin, S. K., Honda, G., and Urade, Y., 2005. Antichagasic activity of komaroviquinone is due to generation of reactive oxygen species catalyzed by *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 5123-5126.
 49. Vazquez, M. P., and Levin, M. J., 1999. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239, 217-225.

50. Wilkinson, S. R., Bot, C., Kelly, J. M., and Hall, B. S., 2011. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr Top Med Chem* 11, 2072-2084.
51. Yamaguchi, K., Okamoto, N., Tokuoka, K., Sugiyama, S., Uchiyama, N., Matsumura, H., Inaka, K., Urade, Y., and Inoue, T., 2010. Structure of the inhibitor complex of old yellow enzyme from *Trypanosoma cruzi*. *J Synchrotron Radiat* 18, 66-69.
52. Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., and Sturm, N. R., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12, 240-253.

IX. ANEXO

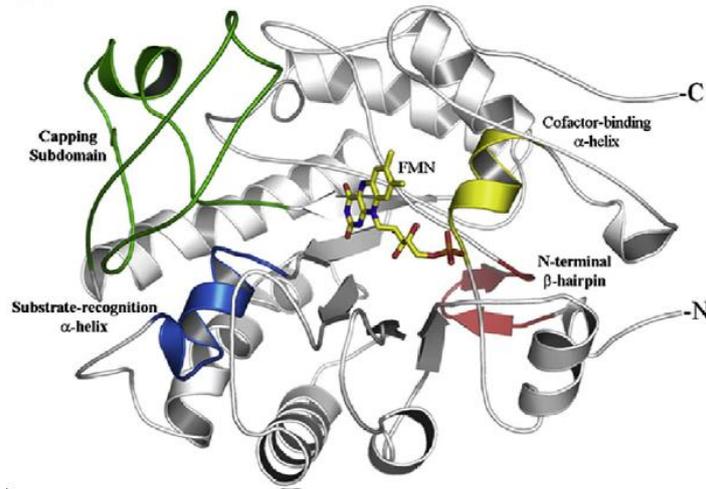


Figura 1. Estructura de TcOYE de *Trypanosoma cruzi*. En plegamiento global TcOYE muestra el plegamiento canónico (α / β) 8-barril con un grupo protésico FMN situado en la cavidad del sitio activo. La proteína también posee elementos barril adicionales característicos. Estos incluyen el motivo β -hairpin N-terminal, el subdominio capping, el motivo- α helicoidal y la α -hélice "interior". Extraído de (Murakami, et al., 2013)

MRGSHHHHHGSACELGTMATFPELLRPLKLGRYTLRNRIIMAPLTRCQATEDGHVPRTESMLKYYEDRASAGLIA
 EATMVQPNYTGFLTEPGIYSDAQIEEWRKIVDAVHKKGGLIFLQLIHAGRAGIPEKILQQPKSDQDPLAGRLLAASAIP
 IKDHRIPAYFAASGEKETYGVPEELTDDEVNRNGIPLFVEGAKNAIFKAGFDGVEIHGANGYLLDAFFRESSNKRQSGP
 YAGTTIDTRCQLIYDVTKSVCDVGS DRVGLRISPLNGVHGMIDSNPEALTKHLCKKIEPLSLAYLHYLRGDMVNQIQI
 GDVVAWVRGSGVVKISNLRYDFEEDQQIREGKVDVAVFGAKFIANPDLVERAQHDWPLNEPRPETYTYTRTAVGY
 NDYPTYNN

Figura 2. Secuencia de TcOYE recombinante utilizada en este trabajo

	10	20	30	40	50	60	70	80
TcOYE/1-379	MATFPELLRPLKLGRYTLRNRIIMAPLTRCQATED	GHVPRTESMLKYYEDRASAGLIAEATMVQPNYTGFLTEPGIYSD						
TcPGFS/Kubata/1-379	MATFPELLRPLKLGRYTLRNRIIMAPLTRCQATED	DHVPRTESMLKYYEDRASAGLIAEATMVQPNYTGFLTEPGIYSD						
Murakami/1-379	MATFPELLRPLKLGRYTLRNRIIMAPLTRCQATED	GHVPRTESMLKYYEDRASAGLIAEATMVQPNYTGFLTEPGIYSD						
	90	100	110	120	130	140	150	160
	AQIEEWRKIVDAVHKKGGLIFLQLIHAGRAGIPEKILQQ	PKSDQDPLAGRLLAASAIPKIDHRIPAYFAASGEKETYGV						
	AQIEEWRKIVDAVHKKGGLIFLQLIHAGRAGIPEKILQQ	PKSDQDPLAGRLLAASAIPKIDHRIPAYFAASGEKETYGV						
	AQIEEWRKIVDAVHKKGGLIFLQLIHAGRAGIPEKILQQ	PKSDQDPLAGRLLAASAIPKIDHRIPAYFAASGEKETYGV						
	170	180	190	200	210	220	230	240
	EELTDDEVNRNGIIPLFVEGAKNAIFKAGFDGVEIHGANGYLLDAFFRESSNKRQSGPYAGTTIDTRCQLIYDVTKSV	CDVGS DRVGLRISPLNGVHGMIDSNPEALTKHLCKKIEPLSLAYLHYLRGDMVNQIQIGDVVAWVRGSGVVKISNLRYDFE						
	EELTDDEVNRDGIIPLFVEGAKNAIFKAGFDGVEIHGANGYLLDAFFRESSNKRQSGPYAGTTIDTRCQLIYDVTKSV	CDVGS DRVGLRISPLNGVHGMIDSNPEALTKHLCKKIEPLSLAYLHYLRGDMVNQIQIGDVVAWVRGSGVVKISNLRYDFE						
	EELTDDEVNRNGIIPLFVEGAKNAIFKAGFDGVEIHGANGYLLDAFFRESSNKRQSGPYAGTTIDTRCQLIYDVTKSV	CDVGS DRVGLRISPLNGVHGMIDSNPEALTKHLCKKIEPLSLAYLHYLRGDMVNQIQIGDVVAWVRGSGVVKISNLRYDFE						
	250	260	270	280	290	300	310	320
	VGS DRVGLRISPLNGVHGMIDSNPEALTKHLCKKIEPLSLAYLHYLRGDMVNQIQIGDVVAWVRGSGVVKISNLRYDFE							
	VGS DRVGLRISPLNGVHGMIDSNPEALTKHLCKKIEPLSLAYLHYLRGDMVNQIQIGDVVAWVRGSGVVKISNLRYDFE							
	VGS DRVGLRISPLNGVHGMIDSNPEALTKHLCKKIEPLSLAYLHYLRGDMVNQIQIGDVVAWVRGSGVVKISNLRYDFE							
	330	340	350	360	370			
	ADQQIREGKVDVAVFGAKFIANPDLVERAQHDWPLNEPRPETYTYTRTAVGYNDYPTYN							
	ADQQIREGKVDVAVFGAKFIANPDLVERAQDNWPLNEPRPETYTYTRTAVGYNDYPTYN							
	ADQQIREGKVDVAVFGAKFIANPDLVERAQHDWPLNEPRPETYTYTRTAVGYNDYPTYN							

Figura 3. Alineamiento múltiple realizado con secuencias proteicas. 1 Secuencia aminoacídica de TcOYE clonada en este trabajo. 2 secuencia aminoacídica de TcOYE caracterizada por Kubata et al. obtenida de la base de datos NCBI (número de acceso: AB075599.1). Los estudios estructurales de Okamoto se realizaron con esta proteína. 3 Secuencia aminoacídica de TcOYE de la cepa 17WTS que utilizaron Murakami et al. Para los estudios estructurales. GenBankID: 61741940.

Las imágenes mostradas en las figuras 4 y 5 corresponden a la misma proteína en formas cristalinas diferentes interactuando con su ligando, FMN.

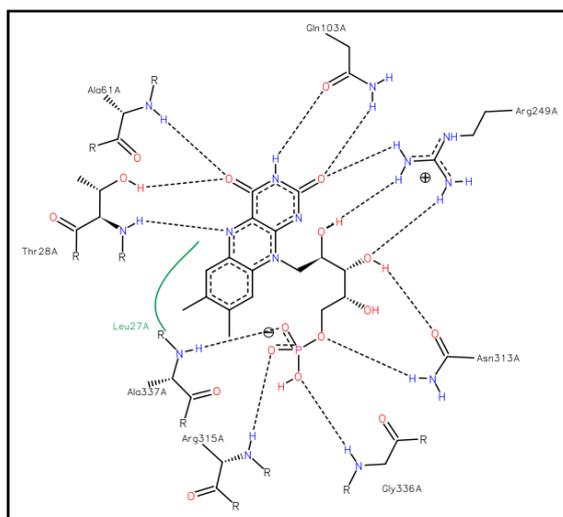


Figura 4. Interacciones que se establecen entre el ligando FMN y la proteína TcOYE (código PDB: 4E2B) determinadas por Murakami et al. Las líneas negras punteadas indican enlaces de hidrógeno, puentes salinos, interacciones metálicas; las líneas sólidas verdes indican interacciones hidrofóbicas. Extraído de la base de datos Protein Data Bank (PDB).

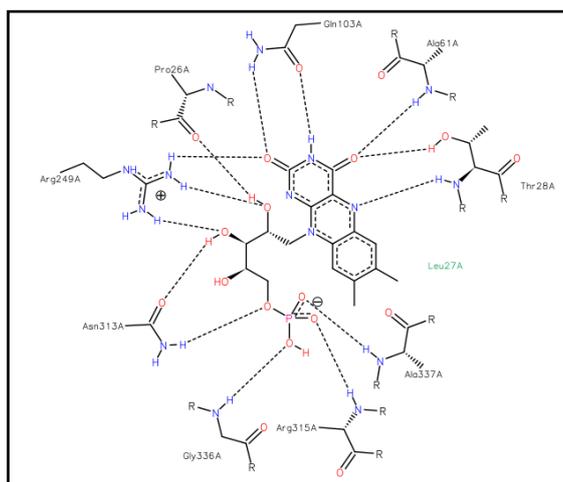


Figura 5. Interacciones que se establecen entre el ligando FMN y la proteína TcOYE (código PDB: 4E2D) determinadas por Murakami et al. Las líneas negras punteadas indican enlaces de hidrógeno, puentes salinos, interacciones metálicas; las líneas sólidas verdes indican interacciones hidrofóbicas. Extraído de la base de datos Protein Data Bank (PDB).

Tabla 6. En la Tabla se indican los aminoácidos de TcOYE que contactan con su ligando FMN y las posiciones en la secuencia determinados por Murakami et al. Estos datos se obtuvieron de la base de datos PDB.

Aminoácido	Código de letra	Posición en la secuencia de TcOYE
Prolina	P	26
Treonina	T	28
Alanina	A	61
Glutamina	Q	103
Arginina	R	249
Asparagina	N	313
Arginina	R	315
Glicina	G	336
Alanina	A	337

Tabla 2. En la tabla se muestra los dominios predichos por Pfam para las proteínas recuperadas de KEGG utilizadas para realizar estudio filogenético.

Organismo	Comienzo	Final	Dominio	P-valor
<i>Yersinia_pestis</i>	3	341	Oxidored_FMN	4.9e-90
<i>Yarrowia_lipolytica</i>	6	343	Oxidored_FMN	5.5e-105
<i>Xanthomonas_citri</i>	10	344	Oxidored_FMN	1e-69
<i>Thalassolituus_oleivorans</i>	13	338	Oxidored_FMN	2e-81
<i>Tetrahymena_thermophila</i>	9	346	Oxidored_FMN	1.5e-82
TcOYE	7	355	Oxidored_FMN	1.3e-67
<i>Pseudoalteromonas_haloplanktis</i>	7	332	Oxidored_FMN	2.5e-66
<i>Streptococcus_suis</i>	9	328	Oxidored_FMN	1.8e-59
<i>Stenotrophomonas_maltophilia</i>	2	343	Oxidored_FMN	9.2e-84
<i>Sinorhizobium_meliloti</i>	3	346	Oxidored_FMN	4.6e-85
<i>Sulfolobus_islandicus</i>	5	324	Oxidored_FMN	2.2e-67
<i>Schizosaccharomyces_pombe</i>	6	353	Oxidored_FMN	5.4e-125
<i>Schizosaccharomyces_pastorianus</i>	16	368	Oxidored_FMN	6.6e-136
<i>Schizosaccharomyces_cerevisiae</i>	16	368	Oxidored_FMN	3.2e-134
<i>Scheffersomyces_stipitis</i>	13	361	Oxidored_FMN	5.5e-103
<i>Ruminococcus_torques</i>	5	335	Oxidored_FMN	4.2e-90
<i>Ruminococcus_obeum</i>	7	338	Oxidored_FMN	1.6e-91
<i>Roseburia_intestinalis</i>	8	372	Oxidored_FMN	2.3e-62
<i>Ralstonia_solanacearum</i>	4	336	Oxidored_FMN	1.8e-71
<i>Ralstonia_eutropha</i>	13	345	Oxidored_FMN	2.2e-92
<i>Pseudomonas_fluorescens</i>	4	335	Oxidored_FMN	1.3e-75
<i>Paenibacillus_polymyxa</i>	14	358	Oxidored_FMN	5.4e-74
<i>Osativa_japonica</i>	12	341	Oxidored_FMN	1.1e-91
<i>Natronomonas_moolapensis</i>	3	341	Oxidored_FMN	2.4e-71
<i>Natronomonas_pharaonis</i>	2	339	Oxidored_FMN	2.2e-75
<i>Microbacterium_testaceum</i>	4	335	Oxidored_FMN	2.9e-74
<i>Micavibrio_aeruginosavorus</i>	4	340	Oxidored_FMN	2.7e-78
<i>Leishmania_braziliensis</i>	11	343	Oxidored_FMN	4.8e-80
<i>Lactobacillus_casei</i>	8	335	Oxidored_FMN	5.1e-75
<i>Kluyveromyces_lactis</i>	16	367	Oxidored_FMN	2.4e-138
<i>Halorhabdus_tiamatea</i>	38	379	Oxidored_FMN	1.1e-74
<i>Herminimonas_arsenicoydans</i>	4	335	Oxidored_FMN	8e-74
<i>Faecalibacterium_prausnitzii</i>	7	339	Oxidored_FMN	4.4e-49
<i>Erwinia_tasmaniensis</i>	6	351	Oxidored_FMN	4.1e-84
<i>Eubacterium_rectale</i>	8	335	Oxidored_FMN	1.8e-94
<i>Enterobacter_cloacae</i>	5	344	Oxidored_FMN	5.2e-91
<i>Dickeya_dadantii</i>	3	329	Oxidored_FMN	2.8e-80
<i>Cycloclasticus_zanckes</i>	3	328	Oxidored_FMN	1.4e-81
<i>Clostridium_saccharoperbutylacetonicum</i>	16	337	Oxidored_FMN	1.4e-78
<i>Clostridium_saccharolyticum</i>	5	340	Oxidored_FMN	1.1e-45
<i>Cryptococcus_neoformans</i>	8	349	Oxidored_FMN	7.5e-89
<i>Coprothermobacter_proteolyticus</i>	3	318	Oxidored_FMN	2e-93
<i>Collimonas_fungivorans</i>	26	355	Oxidored_FMN	3e-56
<i>Coprococcus_catus</i>	9	337	Oxidored_FMN	8.4e-67
<i>Clostridium_acetobutylicum</i>	2	317	Oxidored_FMN	1.2e-90
<i>Candida_glabrata</i>	16	368	Oxidored_FMN	2.8e-126
<i>Candida_dubliniensis</i>	11	327	Oxidored_FMN	4e-80
<i>Candida_albicans</i>	17	360	Oxidored_FMN	9.2e-118
<i>Campylobacter_fetus</i>	3	317	Oxidored_FMN	3.5e-74
<i>Burkholderia_multivorans</i>	6	343	Oxidored_FMN	2e-84
<i>Butyrivibrio_fibrisolvens</i>	8	344	Oxidored_FMN	7.5e-71
<i>Bacillus_megaterium</i>	4	325	Oxidored_FMN	2e-98
<i>Ashbya_gossypii</i>	16	366	Oxidored_FMN	1e-113
<i>Acinetobacter_baumannii</i>	6	352	Oxidored_FMN	1.7e-88
<i>Achromobacter_xylosoxidans</i>	4	337	Oxidored_FMN	1.5e-71

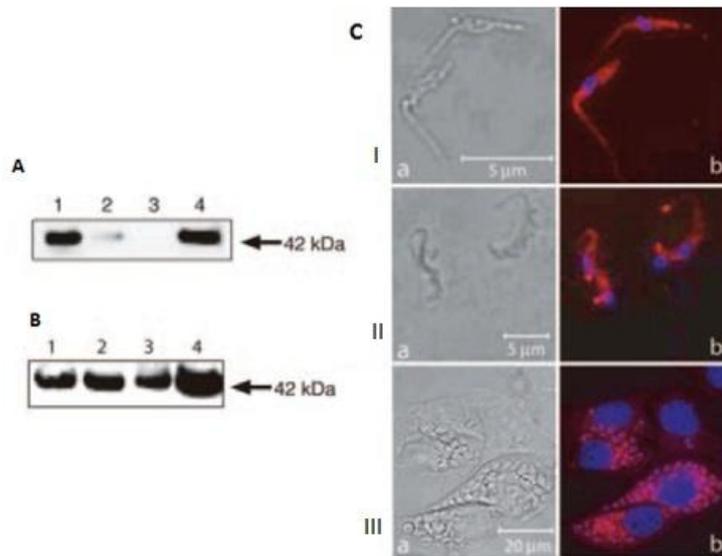


Figura 6. **A.** Análisis por inmunoblot de los lisados de *T. cruzi* epimastigotas luego de la incubación sin (carril 1) y con concentraciones crecientes de anticuerpo anti-*TcOYE* (carril 2 y 3). En el carril 4 sembraron *TcOYE* recombinante. **B.** Inmunoblot de lisados de epimastogites (carril 1), tripomastigotas (carril 2), y amastigotas (carril 3) con anticuerpo anti *TcOYE*. En el carril 4 sembraron *TcOYE* recombinante. **C** Imágenes de contraste de fase (izquierda) y fluorescencia (derecha) de (I) epimastigotas, (II) tripomastigotas y (III) amastigotas en células Hela. Extraído de (Uchiyama, et al., 2005).