Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Citocromo P450 reductasas y metabolismo redox en Trypanosoma cruzi

Portal, Patricio

2013-03-22

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Portal, Patricio. (2013-03-22). Citocromo P450 reductasas y metabolismo redox en Trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Portal, Patricio. "Citocromo P450 reductasas y metabolismo redox en Trypanosoma cruzi". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-22.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

"Citocromo P450 reductasas y metabolismo redox en *Trypanosoma cruzi*"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área QUÍMICA BIOLÓGICA

Lic. Patricio Portal

Directora: Dra. María Cristina Paveto

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres", Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2013.

RESUMEN

"Citocromo P450 reductasas y metabolismo redox en *Trypanosoma cruzi*"

La citocromo P450 reductasa (CPR) es una flavoproteína que coordina la transferencia de electrones desde el NADPH hacia distintas hemoproteínas, como los citocromo P450 (CYPs), el citocromo b5, y la hemooxigenasa. Los CYPs se encuentran involucrados tanto en la síntesis de compuestos endógenos, tales como esteroles y ácidos grasos, como en la activación y detoxificación de compuestos exógenos. Pese a que existen numerosos genes CYP funcionales en mamíferos, existe sólo una CPR en cada especie. La producción de una clase especial de esteroles, entre los que se incluyen el ergosterol y otros metil-esteroles, es una importante vía metabólica involucrada en el crecimiento y la viabilidad celular de microorganismos eucarióticos, como protozoos u hongos, que se encuentra ausente en mamíferos. En *T. cruzi* se han identificado y caracterizado bioquímicamente una familia de genes integrada por tres putativas CPRs, llamadas *Tc*CPR-A, *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C, cuyas secuencias poseen los dominios conservados para FMN, FAD y NADPH. *Tc*CPR-A carece del domino hidrofóbico amino terminal. La sobreexpresión de *Tc*CPR-B en epimastigotes incrementa su resistencia a drogas, sugiriendo su participación en el metabolismo de detoxificación del parásito. En la búsqueda de un rol fisiológico para las *Tc*CPRs, en el presente trabajo se analizó el efecto de la sobreexpresión de las mismas, centrándose principalmente en su posible participación en la biosíntesis de esteroles. Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente para CPR fue utilizada en ensayos de complementación con las *Tc*CPRs recombinantes de *T. cruzi.* La baja tasa de crecimiento y la disminución de la resistencia al ketoconazole de la levadura mutante, lograron revertirse parcialmente sólo con *Tc*CPR-B y -C. La sobreexpresión de *Tc*CPR-A en células de epimastigotes resulta letal, produciendo un aumento del contenido de ADN, una morfología aberrante y numerosas alteraciones ultraestructurales. La sobreexpresión de *Tc*CPR-B y -C incrementó la biosíntesis de ergosterol y la relación $NADP^+$/NADPH. Los parásitos transgénicos con mayor contenido de ergosterol presentaron un aumento en el orden de membrana, con la respectiva disminución de la endocitosis. Notablemente, *Tc*CPR-B se ha encontrado en reservosomas mientras que *Tc*CPR-C

se ha localizado en el retículo endoplasmático. Los resultados obtenidos en esta Tesis junto al correspondiente análisis bibliográfico permiten proponer un rol para las *Tc*CPRs en mecanismos de estrés (*Tc*CPR-A), en reacciones de detoxificación (*Tc*CPR-B) y en la biosíntesis de esteroles (*Tc*CPR-C).

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, Citocromo P450, Citocromo P450 reductasa, metabolismo, detoxificación, síntesis de ergosterol.

ABSTRACT

"Cytochrome P450 reductases and redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*"

Cytochrome P450 reductase (CPR) is a flavoprotein that coordinates transfer of electrons from NADPH to various hemoproteins such as cytochrome P450 (CYPs), cytochrome b5, and heme oxygenase. CYPs are involved both in the synthesis of endogenous compounds, such as sterols and fatty acids, as in the activation and detoxification of exogenous compounds. Although there are numerous functional CYP genes in mammals, there is only one CPR in each species. Sterol production is an important metabolic pathway involved in cell growth and viability. Eukaryotic microorganisms such as protozoa and fungi produce a special class of sterols absent in mammals, including ergosterol and other methyl-sterols. It has been identified and biochemically characterized three putative CPRs in *Trypanosoma cruzi*, called *Tc*CPR-A, *Tc*CPR-B and *Tc*CPR-C. These sequences have the characteristic conserved domains for FMN, FAD and NADPH. However *Tc*CPR-A lacks the N-terminal hydrophobic domain. Overexpression of *Tc*CPR-B epimastigotes of *T. cruzi* increased drug resistance, suggesting it involvement in detoxification metabolism of the parasite. In search for a physiological role of *Tc*CPRs, function of these enzymes and the effect of overexpression were analyzed, focusing mainly on their possible involvement in sterol biosynthesis. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant, CPR deficient strain, was used in complementation assays with recombinant *Tc*CPRs. Only *Tc*CPR-B and -C partially succeed to reverse low growth rate and decreased resistance to ketaconazole of the mutant. Overexpression of *Tc*CPR-A is lethal in epimastigote cells, producing an increase in DNA content, aberrant morphology and numerous ultrastructural alterations. *Tc*CPR-B and -C overexpression increased ergosterol biosynthesis and $NADP^+$/NADPH ratio. Moreover, transgenic parasites present more ergosterol and higher membrane order, with a corresponding decrease in endocytosis. Notably, *Tc*CPR-B was found in reservosomas, while *Tc*CPR-C was located in the endoplasmic reticulum. Results obtained in this Thesis suggest a role for *Tc*CPRs in stress mechanisms (*Tc*CPR-A), in detoxification reactions (*Tc*CPR-B) and in biosynthesis of sterols (*Tc*CPR-C).

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Cytochrome P450, Cytochrome P450 reductase, metabolism, detoxification, ergosterol synthesis.

Los resultados que se incluyen en la presente Tesis fueron parcialmente publicados en:

"Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi*. Suggested role on drug resistance". **Portal P**, Fernandez Villamil S, Alonso GD, De Vas MG, Flawia MM, et al. (2008). Molecular and biochemical parasitology 160: 42-51. [1]

"The NADPH-cytochrome P450 reductase family in *Trypanosoma cruzi* is involved in the sterol biosynthesis pathway." De Vas MG, **Portal P**, Alonso GD, Schlesinger M, Flawia MM, et al. (2011). International journal for parasitology 41: 99-108. [2]

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por formarme a lo largo de todos estos años, y al CONICET, a la ANPCyT, al INGEBI, al Institut Pasteur, al Institut Curie, y a la UCSF y ASBMB por financiar mis estudios e investigaciones.

A Cris, mi directora, porque supo guiarme dándome la libertad de explorar e investigar. Por haberme apoyado y brindado confianza. Por su dedicación, colaboración e infinita paciencia. Por llenar de alegría el laboratorio y que fuera siempre un gusto trabajar juntos.

A Mirtha y el Doc, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su laboratorio y poder realizar esta Tesis Doctoral, y sentirme orgulloso de haber formado parte de su grupo de trabajo.

A la Tere, por las interesantes discusiones científicas y su muy considerada ayuda.

A Guille y Silvia por su amistad y sus valiosas colaboraciones en los experimentos.

A Juan Carlos, mi director de estudios, por sus consejos, su apoyo y sus generosas ayudas a lo largo de todos estos años.

Al Dr. Gilles Truan y la Dra. Laurence Vermis por cederme las levaduras y plásmidos, y por sus aportes y discusiones.

A la Dra. Larissa Podust por permitirme realizar ensayos en su laboratorio junto a la Dra. Claudia Calvet, y colaborar en esta línea de trabajo.

El trabajo realizado no hubiese sido posible sin mis queridos compañeros de laboratorio: Ale, Cata, Cristian, Salito, Fasso, Maru, Patri, y Laura, porque fueron un grupo de trabajo súper divertido, con los que pude compartir excelentes momentos y compartir tantas charlas gourmet. Porque todos colaboraron con mi trabajo. Agradezco especialmente a Matu y Dalmo, con quienes pude realizar experimentos codo a codo, formarnos juntos y avanzar en este proyecto.

A Briar, Guille, Fede, Rodri y Lucas, excelente grupo de amigos que me dió la ciencia. Gracias por compartir tan buenos momentos juntos dentro y fuera del laboratorio.

A Marta, Daniel, Mariano, Alicia y especialmente Irma por su enorme colaboración.

A Francisco, Mari, Leo, Gladys, Rubén y Norma, que permitieron que podamos trabajar, facilitando los materiales, y su buena predisposición.

A mis amigos Juan, Germán y Fabián por compartir tanta diversión y muy especialmente a Lionel, por bancarme, ayudarme y estar siempre que lo necesito.

A mi primo Alex por recibirme con la mejor onda y hacerme conocer San Francisco.

A todos los compañeros y amigos del INGEBI e IByME.

A mis amigos de la facultad Fer, Carli, Marian, Mimi y Juan por pasar tantos buenos momentos juntos. Porque con su compañía y amistad pude hacer esta carrera, y me alegra seguir contando con ustedes.

A la familia Maymó por su cariño.

A toda mi familia por acompañarme siempre, y brindarme su apoyo.

A Danton y Tomi, mis hijos de cuatro patas, mis fieles compañeros todos estos años.

A mis hermanos, Fede y Geral, mis sobrinos, Mateo, Valen, Paul y Léonie, y mis cuñados, Romi y Seb, porque a pesar de la distancia y el océano que nos separa nunca estamos lejos. Son mi orgullo y alegría.

A July, mi amor y compañera, por ayudarme y bancarme en este proyecto. Por quererme y cuidarme en todo momento. Me haces muy feliz.

Y finalmente a mis papás, por el enorme esfuerzo que hicieron educándome y dándome lo que necesito en esta vida. Por haber sabido criarme, respetarme y quererme tanto. Nada de esto hubiese sido posible sin ustedes.

Dedicado a mis padres

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNi: ARN de interferencia.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATP: Adenosín trifosfato.

CPR: Citocromo P450 reductasa.

CYP: Citocromo P450.

CYP51: Lanosterol-14-α-demetilasa.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

D.O.: Densidad óptica

Erg.: Ergosterol

Lan.: Lanosterol

FAD: Flavin adenin dinucleótido.

FMN: Flavin mononucleótido.

G.P.: Polarización general.

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido.

NAD+: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada).

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

O.N.: *Overnight* - Durante la noche

ORF: *Open Reading frame* - Marco abierto de lectura.

PCR: *Polymerase chain reaction* - Reacción en cadena de la polimerasa.

RE: Retículo endoplasmático.

ROS: *Reactive Oxygen Species* – Especies reactivas de oxígeno.

*Tc*CPR: *Trypanosoma cruzi* Citocromo P450 reductasa.

ÍNDICE

INDICE

RESUMEN **2**

ABSTRACT **4**

AGRADECIMIENTOS **7**

ABREVIATURAS **10**

INDICE **12**

1. INTRODUCCIÓN **16**

1.1. La Enfermedad de Chagas 21
1.2. Tratamiento de la enfermedad 22
1.3. El vector 24
1.4. El *Trypanosoma cruzi* 25
1.5. El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* 27
1.6. Biología celular de *T. cruzi* 29
1.7. Endocitosis en *T. cruzi* 33
1.8. Metabolismo redox 36
1.9. Sistema de detoxificación 39
1.10. El Citocromo P450: características generales 41
1.11. Mecanismo enzimático del CYP 44
1.12. Reductasas del Citocromo P450 (CPR) 46
1.13. Citocromos P450 en tripanosomátidos 47
1.14. El ergosterol en tripanosomátidos 48
1.15. Antecedentes 50

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **55**

2.1. Hipótesis de trabajo 55
2.2. Objetivos generales y específicos del trabajo 55

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN **57**

3.1. Localización subcelular de las *Tc*CPRs 57
3.2. Búsqueda de un rol fisiológico para las *Tc*CPRs mediante ensayos de complementación en levaduras 59
3.2.1. Análisis del crecimiento en medio líquido 61
3.2.2. Análisis del crecimiento en medio sólido 64
3.2.3. Sensibilidad al ketoconazole 65
3.2.4. Análisis del contenido lipídico de las levaduras 67
3.3. Generación de parásitos sobreexpresantes para las tres formas de *Tc*CPRs 71
3.4. La sobreexpresión de *Tc*CPR-A resulta letal 73
3.5. *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C participan en la biosíntesis de esteroles en *T. cruzi* 79
3.6. Análisis del estado redox 81
3.7. Los parásitos que sobreexpresan *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C poseen un mayor orden de membrana 82
3.8. Interacción de las reductasas con el CYP51 85

4. CONCLUSIÓN **90**

5. MATERIALES Y MÉTODOS **97**

5.1. ANÁLISIS *IN SÍLICO* 97

5.1.1. Bases de Datos *97*

5.1.2. Programas *97*

5.2. CULTIVO DE BACTERIAS 97

5.2.1. Cepas de Escherichia coli *97*

5.2.2. Medios de Cultivo Bacteriano *98*

5.2.3. Antibióticos *98*

5.2.4. Otras Soluciones *98*

5.3. CULTIVO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* 98

5.3.1. Cepas de Trypanosoma cruzi *98*

5.3.2. Medios de cultivo tripanosomas y células *99*

5.4. CULTIVO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 99

5.4.1. Cepas de levaduras Saccharomyces cerevisiae *99*

5.4.2. Medios de cultivos de levaduras *100*

5.5. VECTORES 100

5.5.1. Vectores para Bacterias *100*

5.5.2. Vectores para Parásitos *100*

5.5.3. Vector para Levaduras *100*

5.6. ÁCIDOS NUCLEICOS: METODOLOGÍAS 101

5.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *101*

5.6.2. Clonado *102*

5.6.3. Transformaciones *104*

5.6.4. Secuenciación *108*

5.6.5. Southern Blot *108*

5.6.6. Northern Blot *111*

5.7. PROTEÍNAS 112

5.7.1. Extractos proteicos *112*

5.7.2. Expresión de Proteínas Recombinantes en bacterias *113*

5.7.3. Purificación de cuerpos de inclusión *114*

5.7.4. Generación de Anticuerpos Específicos *115*

5.7.4. Cuantificación de Proteínas *115*

5.7.5. Western Blot *116*

5.8. METODOLOGÍAS REALIZADAS CON LEVADURAS 117

5.8.1. Curvas de crecimiento en medio líquido *117*

5.8.2. Curva de crecimiento en medio sólido *118*

5.8.3. Sensibilidad al ketoconazole *118*

5.8.4. Análisis del contenido lipídico de las levaduras *119*

5.8.5. Extracción de lípidos *119*

5.8.6. Cromatografía gaseosa y espectrometría de masa *120*

5.9. METODOLOGÍAS REALIZADAS CON PARÁSITOS 121

5.9.2. Extractos proteicos de parásitos *121*

5.9.3. Localización subcelular mediante inmufluorescencia indirecta *121*

5.9.4. Determinación de las concentraciones de $NADP^+$ y NADPH *122*

5.9.5. Análisis de esteroles en T. cruzi *122*

5.9.6. Determinación del orden de membrana *123*
5.9.7. Incorporación de FITC-BSA *123*
5.9.8. Análisis del ciclo celular *123*
5.9.9. Microscopía electrónica *124*
5.10. MEDICIÓN ENZIMÁTICA 125
5.11. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN 125

6. BIBLIOGRAFÍA 127

7. ANEXO 135
7.1. CROMATOGRAMAS 135
7.2. ESPECTROMETRÍA DE MASA 138
7.3. MICROSCOPÍAS DE BARRIDO 143
7.3.1. Parásitos pTREX-TcCPR-A *143*

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana, conocida como "Enfermedad de Chagas" es causada por el parásito unicelular *Trypanosoma cruzi*. Éste protozoario presenta una gran variedad de cepas e infecta 150 especies de 24 familias de animales domésticos y silvestres. El *T. cruzi* es transmitido principalmente por insectos triatominos hematófagos o en transfusiones sanguíneas contaminadas. Esta enfermedad, que hasta el momento es incurable, afecta a más de 15 millones de personas en 21 países de América latina (Figura I1) y causa más de 12 mil muertes por año [3].

Figura I1. *Países endémicos para la enfermedad de Chagas.* [4]

Si bien el número de casos ha disminuido en los últimos años, esta enfermedad resulta una zoonosis endémica (proceso patológico que se mantiene a lo largo de mucho tiempo en una población o zona geográfica) muy compleja y continúa representando una grave amenaza para la salud de los países de la región [3] (Tabla 1). En la Argentina, 2,5 millones de personas se encuentran infectadas, representando el 4% de la población del país, donde cada año se registran 1.000 casos de niños que nacen infectados. Existen 19 provincias argentinas donde el Chagas es una enfermedad endémica, y 200.000 son las viviendas con alto riesgo de infestación con vinchucas (datos obtenidos del Ministerio de la Nación Argentina).

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año

2010, alrededor de 10 millones de personas se encontraban infectadas con *T. cruzi* en las áreas endémicas.

Parámetros epidemiológicos	1990	2000	2006
Muertes por año	>45.000	21.000	12.500
Casos de infección humana	30 millones	18 millones	15 millones
Nuevos casos por año	700.000	200.000	41.200
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones
Número de países endémicos	21	21	21

Tabla 1. *Parámetros epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas* (Fuente O.M.S. 2007)

La infección se transmite principalmente mediante el insecto vector triatomino, a través de sus heces contaminadas con *T. cruzi*. Otras vías de infección son por transfusión de sangre contaminada, por vía congénita de madre a hijo, por vía de transplante de órganos, o bien por transmisión accidental en casos de investigación en laboratorios. A éstas se incluye también la vía oral, debido a la ingesta de parásitos, y sería la tercera causa en importancia de incidencia de la enfermedad, alcanzando hasta el 50% de los casos en algunas regiones de Brasil. Esta última vía cobró particular interés tras el brote ocurrido en Florianópolis, en el estado de Santa Catarina, al sur de Brasil en el año 2005 cuando cerca de 30 personas resultaron infectadas y otras 5 murieron tras haber ingerido jugos de caña de azúcar contaminada con heces de triatominos. Existe evidencia que sugiere la capacidad de *T. cruzi* de sobrevivir en jugos de caña de azúcar por más de 24 hs. y conservar su infectividad [5]. La capacidad de sobrevivir en el estómago de los individuos estaría dada por sus proteínas de superficie del tipo mucinas, que les otorgan una gran resistencia a la proteólisis, para luego adherirse a las células de la mucosa intestinal e invadir al huésped [6].

En relación con la enfermedad de Chagas congénita, se han notificado casos en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, Honduras, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela y, han registrado casos en España. El riesgo de

transmisión congénito varía según la cepa de *T. cruzi*, la parasitemia de la madre, la existencia de lesiones en la placenta. El riesgo de transmisión se ha estimado en un promedio de 5% [3].

La enfermedad se encuentra ampliamente difundida, principalmente en las áreas rurales de todo el continente latinoamericano, asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda (Figura I2), donde pueden habitar los insectos vectores de la enfermedad. Los insectos transmisores de la enfermedad pertenecen a especies del género Triatoma, Rhodnius y Panstrongylus, siendo el *Triatoma infestans* la especie característica de la región Argentina. En la figura I3 se observa el mapa de distribución de los insectos vectores y las iniciativas de erradicación de los mismos [7]. Está considerada como la enfermedad parasitaria con mayor carga económica en América Latina debido a su prolongada cronicidad. Los programas de control han centrado generalmente sus presupuestos y sus estrategias hacia la eliminación de la transmisión por transfusión y vectorial, eliminando los insectos vectores más asociados al hábitat humano. Estos abordajes dejan relegado a un segundo plano al paciente enfermo, y no otorgan una solución a las millones de personas que ya se encuentran infectadas.

Figura I2. *Imágenes de viviendas de bajos recursos y malas condiciones de higiene, que favorecen la presencia de vinchucas*.

Existen ciertos recursos destinados a la lucha contra la enfermedad, lo que le otorga cierta presencia en el interior de las instituciones de salud. Sin embargo, hay una actitud pasiva, provocada por el desconocimiento de la magnitud de la enfermedad, en cuanto a la detección de casos y solamente se notifican aquéllos en los que las personas han desarrollado una patología concreta. Esta situación opaca todos los demás casos (más del 70%) de personas que están infectadas por *T. cruzi* y que no presentan manifestaciones aparentes, lo que disminuye la percepción sobre el verdadero alcance de la enfermedad, y lleva a una subestimación del interés comercial que pueda suscitar la enfermedad.

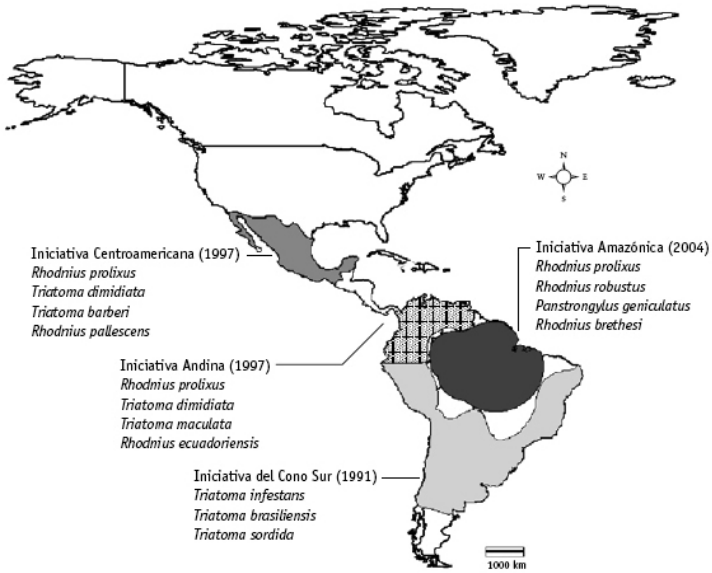


Figura I3. *Áreas geográficas correspondientes a los diferentes insectos vectores y los países que conformar las iniciativas de erradicación*.

Actualmente, en la mayoría de los países de América Latina se ha establecido por ley la obligatoriedad de que los bancos de sangre dispongan de sistemas de tamización para prevenir la transmisión de *T. cruzi* por medio de las transfusiones; sin embargo, varios países aún no decretan la obligatoriedad para el diagnóstico y la tamización a nivel nacional. Es importante agregar que dicha transmisión no se limita a los países en los que la enfermedad es endémica. La migración de personas infectadas por *T. cruzi* plantea un problema de salud pública, incluso, en países en los que no hay transmisión vectorial del parásito, como Canadá, Estados Unidos y

España, en donde se han comunicado casos de transmisión de *T. cruzi* por transfusiones sanguíneos. El riesgo de transmisión del parásito por una transfusión de una unidad de 500 ml de sangre total oscila entre 12% y 20%. De igual manera, se han reportado en los últimos años varios casos de trasplante de órganos asociados a la enfermedad de Chagas en los Estados Unidos.

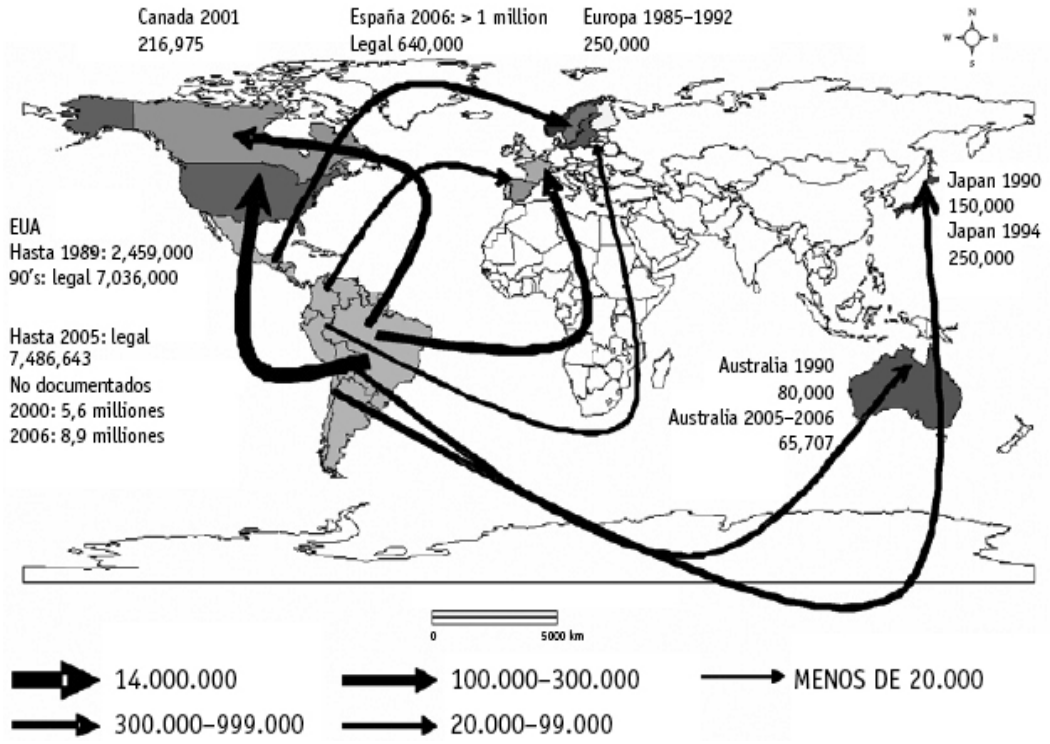


Figura I4. *Flujo de migraciones de América Latina hacia regiones no endémicas para la Enfermedad de Chagas*.

El mapa de la figura I4 muestra la dimensión de la expansión de la infección por *T. cruzi* en países no endémicos debida a las migraciones de individuos infectados hacia países como los Estados Unidos, Canadá y, en Europa, principalmente, España. Esta globalización de la enfermedad de Chagas obliga a los países no endémicos a establecer medidas de prevención y control, además del establecimiento de nuevas políticas y estrategias para la tamización de donantes en bancos de sangre, así como el eventual seguimiento y tratamiento de los pacientes infectados [8].

1.1. La Enfermedad de Chagas

Las manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas se caracterizan en 4 fases principales:

1- Período de incubación: Cuando se trata de transmisión vertical, es decir a partir del insecto vector, este período oscila entre 5 y 12 días, mientras que en el caso de la transmisión por transfusión de sangre o plasma, los primeros síntomas aparecen entre los 25 a 45 días.

2- Fase Aguda: Los síntomas generales de esta etapa son fiebre prolongada, decaimiento, anorexia, astenia, vómitos, diarrea, cefalea, irritabilidad, llanto persistente, inquietud, convulsiones, tos, palpitaciones, etc. Se observa también inflamación de los ganglios linfáticos e hipertrofia del hígado y bazo. Durante esta etapa, los parásitos invaden varios tejidos y órganos y pueden ser detectados fácilmente en la sangre periférica. La etapa aguda puede resultar fatal en niños. En la figura I5 se observan las lesiones características de esta fase tales como lesiones en la piel y edemas.

3- Fase Crónica silenciosa, latente o indeterminada: luego de superada la fase aguda se entra en una fase de latencia que puede durar muchos años o el resto de la vida. Se considera que están dentro de esta fase los pacientes que tengan pruebas serológicas y/o parasitológicas positivas para la enfermedad, ausencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad, electrocardiograma convencional y corazón, colon y esófago radiológicamente normales. El 70-85% de los pacientes permanecerán en esta etapa por el resto de su vida.

4- Fase Crónica sintomática: Se puede manifestar como miocardiopatía chagásica o como formas digestivas crónicas.

Aunque se reconoce la permanencia del parásito durante todo el curso de la enfermedad, la poca frecuencia con que en la fase crónica son hallados quistes parasitarios en tejidos y la desproporción entre el hallazgo de parásitos y la intensidad de la cardiopatía, han sido siempre argumentos en contra de la hipótesis de que las lesiones están directamente relacionadas con la presencia del parásito.

Debido a la controversia respecto a las lesiones ocurridas en la patogénesis en gran parte al papel de autoinmunidad, y a las reacciones cruzadas mediadas por antígenos comunes entre *T. cruzi* y el hospedador.

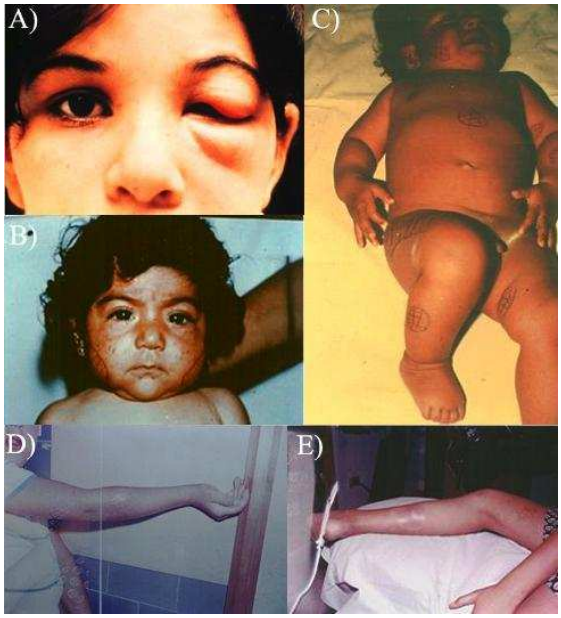


Figura I5. *Lesiones características de la fase aguda debido a la inoculación de Trypanosoma cruzi por la picadura del insecto vector*. A) Signo de Romaña. B) Lipochagoma geniano. C) Chagoma hematogénico. D) y E) Chagoma de inoculación.

1.2. Tratamiento de la enfermedad

En la década de 1960, la investigación de numerosos análogos de los nitrofuranos llevó al hallazgo del nifurtimox (Bayer 2502, Lampit®), una droga tripanocida que ha mostrado ser efectiva tanto en la infección aguda, como en la crónica. La acción tripanocida del nifurtimox parece estar relacionada con la capacidad de esta droga de generar productos de reducción parcial del oxígeno (O_2^-, H_2O_2, OH^- y otras especies reactivas del oxígeno (ROS)) [9,10,11], contra lo cual el *T. cruzi* se muestra parcialmente deficiente en mecanismos de defensa, por un proceso conocido como "Redox cycling" [12]. Este mecanismo que se encuentra detallado más adelante, estaría mediado por enzimas capaces de reducir a estos compuestos tales como los citocromos P450, cuya actividad ha sido previamente

demostrada.

Otro nitro compuesto, un derivado 2-nitromidazol, el benznidazol (Rochagam®, en Brasil y Radanil® en Argentina) constituye con el nifurtimox los únicos medicamentos actualmente reconocidos y comercializados como drogas anti-*T. cruzi* (Figura I6). A pesar de las similitudes entre el modo de acción de nitrofuranos y nitroimidazoles, en varias situaciones el nifurtimox y el benznidazol parecen diferir en los mecanismos de toxicidad contra este parásito [13]. Algunos hallazgos sugieren que el efecto tóxico del benznidazol en el *T. cruzi* no depende de la formación de radicales libres de oxígeno y se ha planteado la posibilidad de que la actividad de este medicamento no implique nitroreducción sino que posiblemente haya una acción inhibitoria directa en el ADN [14].

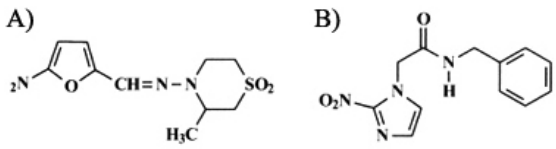


Figura I6. *Estructura química del Nifurtimox (A) y del Benznidazol (B).*

El nifurtimox y el benznidazol han mostrado capacidad de curar la enfermedad en una proporción entre 70 y 100% de los casos agudos tratados. Sin embargo, en la fase crónica, no se recomienda el tratamiento en los pacientes con la forma cardíaca por la falta de evidencia consistente con relación a la cura parasitológica. La administración del tratamiento etiológico debe acompañarse de la implementación de medidas tendientes a garantizar que el paciente no vuelva a tener contacto con triatominos.

En el tratamiento con nifurtimox y el benznidazol la dosis terapéutica es muy cercana a la dosis tóxica, lo que hace que estos medicamentos no sean bien tolerados por algunos pacientes. La mayor frecuencia de efectos secundarios que algunos atribuyen al uso del nifurtimox se explica por la mayor electronegatividad de los nitrofuranos lo que los hace más citotóxicos. El benznidazol además de producir síntomas generales como náuseas, pérdida de apetito, distensión abdominal y cefalea, algunas veces puede producir reacciones de mayor importancia, que en algunos

casos obligan a la suspensión del medicamento. Además, se sospecha de un efecto carcinogénico atribuido a las drogas nitro-heterocíclicas.

1.3. El vector

La existencia de la enfermedad de Chagas humana es un hecho puramente accidental, en la medida en que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos, forzando a los triatominos infectados a ocupar viviendas humanas, y llevando a cabo el proceso de domiciliación y, así, encontrando refugio y suficiente alimento en la sangre humana y la de los animales domésticos. De esta manera, el hombre entra a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas [15].

Los hemípteros son insectos chupadores. Éstos se caracterizan por presentar un aparato bucal chupador, en forma de rostro articulado, ojos compuestos, antenas generalmente septadas, alas anteriores divididas en una parte basal coreácea y una apical membranosa y alas posteriores enteramente membranosas. Poseen metamorfosis incompleta: a partir de huevos surgen formas jóvenes (ninfas), que sufren mudas hasta alcanzar el estadío adulto. Se las agrupa en tres grupos según sus hábitos alimenticios:

• Fitófagos: hemípteros que viven de la savia retirada de pequeñas plantas. Su rostro es recto y largo (compuesto de cuatro segmentos), que traspasa el primer par de patas del insecto cuando se encuentra retraído.

• Entomófagos o predadores: viven de la hemolinfa de otros insectos, que son tomados por las patas anteriores e inmovilizados por una salvia paralizante. El rostro, casi siempre curvado, en forma de gancho, presenta tres segmentos. Su extremidad libre traspasa el primer par de patas cuando se encuentra retraída.

• Hematófagos: representados por los triatomíneos que viven de la sangre de mamíferos y aves. Presentan también un rostro con tres segmentos, pero éste es recto y no sobre pasa el primer par de patas cuando se encuentra retraído. En este grupo se encuentran los triatomíneos de interés médico. De hábitos principalmente nocturnos,

se alimentan durante la noche, pero también en lugares obscuros durante el día. Procuran huir de lugares iluminados pues la luz los incomoda, razón por la cual en su ambiente natural, habitan grietas y lugares obscurecidos, saliendo por la noche para alimentarse. Su picada no es dolorosa y no molesta al individuo, realizándola generalmente sobre el rostro ya que este queda descubierto durante el sueño.

La figura I7 muestra las fotografías de distintos insectos vectores transmisores de la Enfermedad de Chagas, los huevos y los distintos estadíos larvales de *Triatoma infestans*.

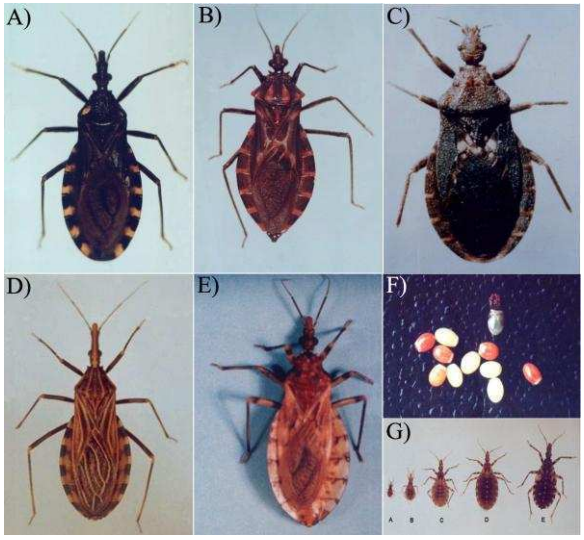


Figura I7. *Insectos vectores transmisores de la Enfermedad de Chagas*. A) *Triatoma infestans*, B) *Pastrongylus megistus*, C) *Microtriatoma borbai*, D) *Rhodnius neglectus*, E) *Triatoma sordida*. F) Huevos de *Triatoma infestans*. G) Diferentes estadíos larvales de *Triatoma infestans* hasta el adulto.

1.4. El *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoario flagelado, del Phyllum Euglenozoa, de la clase Kinetoplastea [16]. Los protozoos son microorganismos unicelulares, eucariotas que divergieron muy temprano en la evolución, caracterizados por carecer de pared celular, y presentar nutrición heterótrofa. Los protozoos se han clasificado basándose fundamentalmente en su morfología y en particular en los órganos de locomoción. Los parásitos del hombre pertenecen a los siguientes grupos: amebas (*Sacordina*), ciliados (*Ciliophora*), microsporidios (*Microsporidia*), apicomplexa

(*Apicomplexa*) y flagelados (*Mastigophora*), a los que pertenece el *T. cruzi*. Las diferencias morfológicas y sobre todo los órganos de locomoción así como la reproducción sexual han constituido elementos decisivos para su clasificación.

Existe una gran cantidad de protozoarios de interés médico. Estos provocan diversas enfermedades tales como la malaria (*Plasmodium sp.*), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*), vaginitis (*Trichomonas vaginalis*), giardiosis (*Giardia lamblia*). Otros protozoarios de la familia *Tripanosomatidae*, muy cercanos evolutivamente con *T. cruzi*, provocan también serias enfermedades en humanos, tal es el caso del agente etiológico de la enfermedad del sueño, el *Trypanosoma brucei*, y de *Leishmania sp.* que provoca la leishmaniasis.

Dentro del género Trypanosoma, tanto *T. cruzi* como *T. brucei* comparten una gran cantidad de características morfológicas como bioquímicas. El hecho de que *T. brucei* posea el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi), ausente en *T. cruzi*, ha permitido en muchos trabajos científicos utilizar a *T. brucei* como modelo ante la falta de herramientas genómicas y validar funciones de proteínas de *T. cruzi*. Sin embargo, al realizar este tipo de analogías resulta imperioso recordar que estos parásitos divergieron en la evolución hace aproximadamente 100 millones de años.

Antiguamente los estudios indican que en la naturaleza se podían encontrar dos grupos principales de poblaciones de *T. cruzi* [17]. El primero, *T. cruzi* I, asociado al ciclo silvestre y provocando infecciones más leves y menor morbilidad en los seres humanos. El segundo, *T. cruzi* II, estrechamente vinculado con el ciclo doméstico y produce infecciones y alta morbilidad en los seres humanos. Este último era dividido en los subgrupos IIa, IIb, IIc, IId y IIe [18].

En la actualidad, basándose en los modelos evolutivos se ha optado por clasificar a las poblaciones de *T. cruzi* utilizando otra nomenclatura: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI [19]. La línea CL Brener utilizada en el Proyecto Genoma de *T. cruzi* [16] pertenece a TcVI. Esta línea, proveniente de la hibridación de ancestros TcII y TcIII, presenta una enorme heterogeneidad en su ADN, y presenta consecuentemente severas dificultades en el estudio y ensamble de su genoma.

Existen algunas pruebas de que la distribución de estas poblaciones de parásitos está relacionada con las especies de insectos vectores y su comportamiento

biológico y de que esto tiene importantes consecuencias epidemiológicas en la enfermedad de Chagas humana [20,21].

1.5. El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El *T. cruzi* tiene un ciclo biológico complejo, que involucra cuatro formas principales de desarrollo, dos en el insecto vector y dos en el hospedador mamífero: el epimastigote y el tripomastigote metacíclico predominan en el insecto vector; en tanto que el amastigote y el tripomastigote sanguíneo (forma infectiva no replicativa) se encuentran en el mamífero, siendo la primera intracelular [22,23]. En la figura I8 se muestra el ciclo de vida del *T. cruzi*, en el que alterna su ciclo entre el hospedador triatomino y el mamífero hospedador.

El epimastigote es la forma replicativa y no infectiva que se observa en el intestino del hospedador invertebrado. Este se divide por fisión binaria y posee un tamaño aproximado de 20-40 µm de largo, con un flagelo de unos 20 µm que sale en un lateral. Éste se diferencia a tripomastigote metacíclico (promastigote) y se lo encuentra en las heces del triatomino. Su tamaño es de 20 a 25 µm y, al igual que el epimastigote, posee un flagelo lateral, diferenciando estas dos formas por la posición relativa del kinetoplasto (descripto más adelante) entre otros aspectos. El tripomastigote metacíclico invade el hospedador mamífero penetrando a través de la piel lastimada o mucosas, pasando al torrente sanguíneo e infectando células musculares y macrófagos. Una vez dentro de la célula, los tripomastigotes metacíclicos se ubican en el citoplasma y se diferencian en amastigotes.

El amastigote es la forma replicativa y no infectiva del hospedador mamífero, donde se divide nuevamente por fisión binaria. Posee un tamaño de 5 µm, y un flagelo de a penas 1µm. Cuando el número de parásitos es elevada dentro de la célula, éstos se diferencian a la forma tripomastigote sanguíneo, de aspecto muy similar al tripomastigote metacíclico, pero con marcadas diferencias en cuanto a su expresión génica y antígenos específicos.

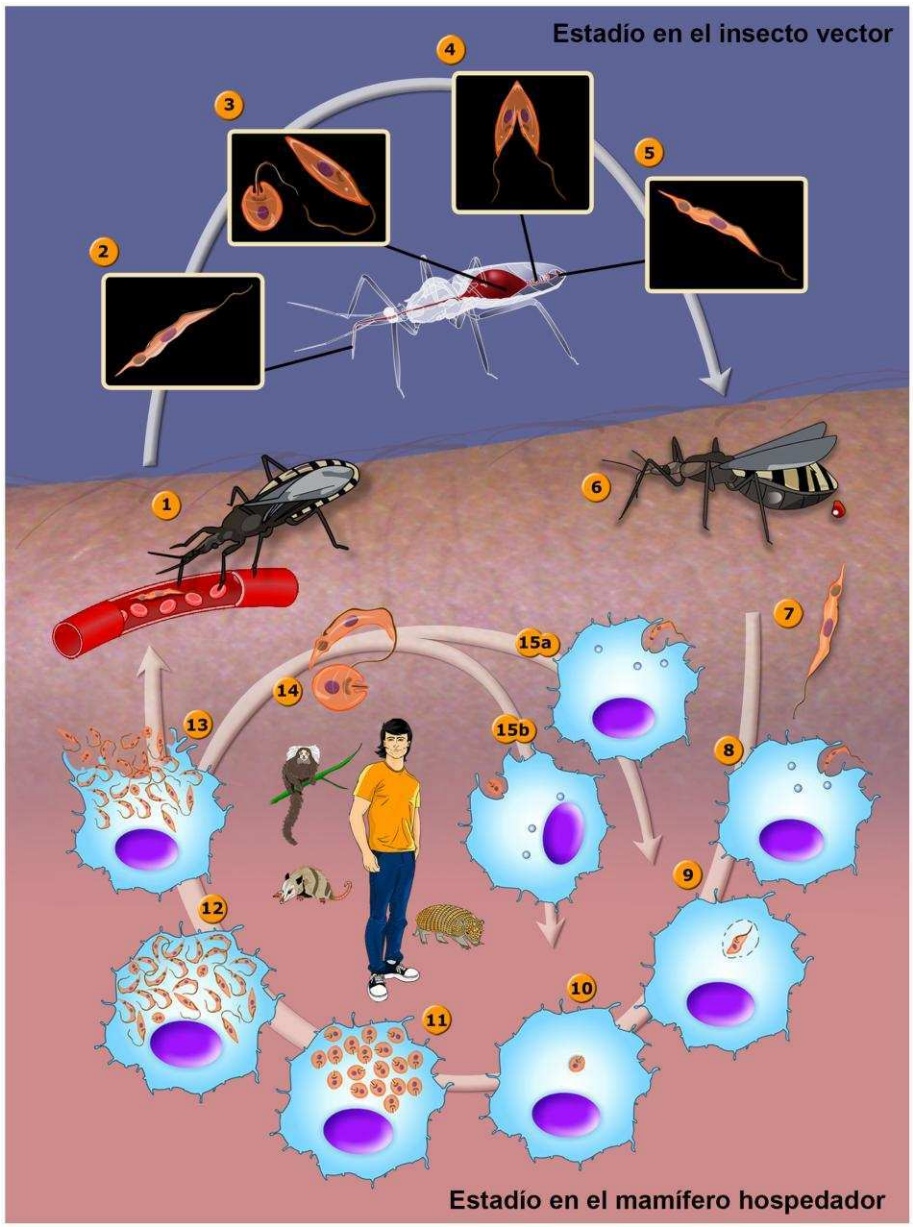


Figura I8. *Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi*. (Tomada de Teixeira y cols. [24]). 1) El insecto vector (hembra o macho) pica al hospedador mamífero ingiriendo tripomastigotes ubicados en la sangre. 2) Tripomastigotes metacíclicos. 3) Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes y esferomastigotes. 4) Los epimastigotes se multiplican en el intestino medio del insecto. 5) En la parte posterior del intestino, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos. 6) El insecto vector defeca heces junto a los tripomastigotes metaccíclicos en cercanía de la picadura del hospedador mamífero. 7) Forma tripomastigote metacíclico. 8) Los tripomastigotes metacíclicos infectan macrófagos. 9) Los tripomastigotes metacíclicos se transforman en amastigotes. 10) Los amastigotes son liberados de la vacuola parasitófora. 11) Los amastigotes se multiplican en el citoplasma. 12) Los amastigotes se transforman en tripomastigotes. 13) Los tripomastigotes se escapan de la célula. 14) Formas amastigote y tripomastigote. 15) (a) Tripomastigote y (b) amastigote infectando macrófagos. En el centro de la figura se observan los reservorios animales más importantes en el mantenimiento del parásito en el ambiente doméstico y peridoméstico.

La gran densidad de tripomastigotes sanguíneos dentro de la célula provocan la ruptura de la membrana plasmática, permitiendo la liberación de los tripomastigotes sanguíneos que pasan a la sangre para recomenzar un ciclo de infección de nuevas células, o bien ser absorbidos junto con la sangre por un nuevo triatomino y así completar el ciclo [22].

1.6. Biología celular de *T. cruzi*

La superficie celular del *T. cruzi* está formada por tres estructuras morfológicamente diferentes [22,25]: el glicocalix, la membrana plasmática y los microtúbulos sub-peliculares. El glicocalix está formado por glicoconjugados (que pueden ser detectados con lectinas marcadas) uniformemente distribuidos sobre el cuerpo celular y el flagelo. Esta cubierta es muy fina en las formas epimastigote y amastigote y más gruesa en los tripomastigotes. Existen evidencias de que azúcares como manosa, N-acetilglucosamina y galactosa de la superficie del parásito serían importantes para la interacción del parásito con el hospedador [26]. A su vez también sería importante una glicoproteína de superficie con actividad de trans-sialidasa y neuraminidasa, que sería capaz de remover residuos de ácido siálico de las células del hospedador y transferirlos a proteínas aceptoras del tripomastigote metacíclico [16,26]. La importancia de estas trans-sialidasas es señalada en el reciente trabajo sobre el genoma de *Trypanosoma cruzi*, donde se indica que esta superfamilia llegaría a tener el impresionante número de 1430 genes. Otras superfamilias de superficie que se señalan son las MASP ("mucin associated surface proteins", "proteínas de superficie asociadas a mucinas"), las mucinas y la metaloproteasa GP63 [16].

Este análisis a nivel genómico está apoyado por las observaciones hechas en la publicación del proteoma de *T. cruzi.* En este último trabajo se señala que habría grandes variaciones en los niveles de las trans-sialidasas y MASPs entre los distintos estadíos de diferenciación del parásito, siendo estos niveles muy altos en la forma de tripomastigote sanguíneo [27]. La mayoría de las glicoproteínas está anclada a la membrana plasmática a través de un ancla de tipo "GPI" (glicosil-fosfatidil-inositol) [16,26,28]. Si bien este tipo de anclaje se da en otros organismos eucarióticos, en *T.*

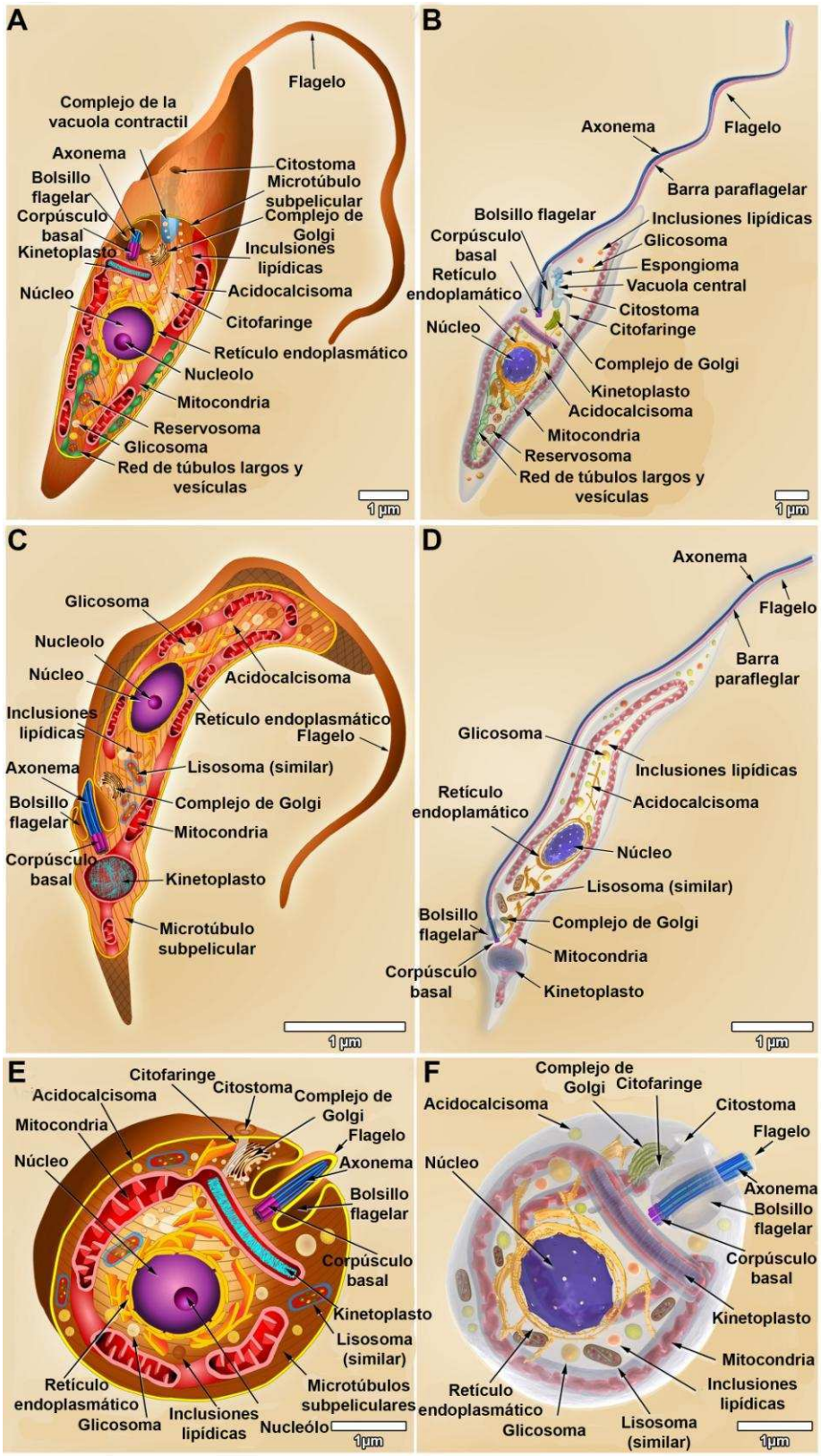


Figura I9. *Representaciones esquemáticas de las tres principales morfologías de Trypanosoma cruzi*. Representaciones 2D (izquierda) y 3D (derecha) de epimastigote (A-B), tripomastigote (C-D) y amastigote (E-F). Nótese la diferencia de escala en que fueron representadas las formas, siendo el tripomastigote considerablemente más pequeño. Adaptado de Texeira y cols. [24]

cruzi la frecuencia con la que éstos ocurren es muy alta. A su vez se ha visto que este anclaje es vital ya que si se trata con drogas que detienen la vía metabólica de síntesis del GPI se puede arrestar el crecimiento de los parásitos [26].

Entre los componentes más importantes de la membrana plasmática se encuentran los esteroles. Tal como será descripto más adelante, el parásito sintetiza ergosterol, pero también es capaz de obtener colesterol cuando endocita partículas de LDL ("lipoproteínas de baja densidad") [26,28].

El tercer componente de la superficie del parásito está conformado por los microtúbulos subpeliculares. Estos microtúbulos están estrechamente asociados a la membrana plasmática (incluso después de una lisis del parásito siguen asociados al purificar la fracción que corresponde a la membrana plasmática) y le dan rigidez al parásito. Los microtúbulos subpeliculares aparecen conectados entre sí por filamentos de diámetro más pequeño constituyendo el citoesqueleto cortical [22].

El flagelo de *T. cruzi* es el responsable de la motilidad del parásito así como también de la adhesión a las células intestinales durante la infección del invertebrado. Éste varía su longitud (entre 1 µm a 20 µm) y su ubicación en los distintos estadios de desarrollo. El axonema tiene una organización de microtúbulos típica de los flagelos eucarióticos, "9 + 2" (nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central). El flagelo se origina a partir de una invaginación de la membrana llamada bolsillo paraflagelar (ver figura I9) y en el caso de los estadíos de epimastigote y tripomastigote también se puede unir al cuerpo del parásito por uniones de tipo desmosomas. Por debajo del eje, o axonema del flagelo se ubica una estructura llamada bastón paraflagelar que tendría un rol en la motilidad flagelar y también sería importante en la división mitótica [29]. Esta última estructura es exclusiva del Phylum *Euglenozoa.*

El citoesqueleto está constituido por microfilamentos de actina y microtúbulos de tubulina y los filamentos intermedios están ausentes [30]. Hay 5 genes putativos para centrinas que se postula tendrían que ver con la diversidad de los "centros organizadores de microtúbulos" (MTOCs) en la organización del citoesqueleto. La importancia del citoesqueleto de tubulina se acentúa al analizarse la superfamilia de proteínas motoras de kinesina que serían más de 40 comparadas con las 31 humanas [30].

El núcleo es similar en su organización al de otras células eucaróticas, es pequeño y su diámetro es de 2,5 µm. Posee poros y se continúa con el retículo endoplasmático [22,25]. En epimastigotes y amastigotes, que son las formas replicativas, el núcleo es esférico, el nucleolo es grande y hay una pequeña cantidad de heterocromatina. Contrariamente, en los tripomastigotes el núcleo es más ovalado y no se reconoce el nucleolo y la heterocromatina aparece dispersa [31].

T. cruzi, como los otros miembros de la familia Trypanosomatidae posee una sola mitocondria que se extiende a lo largo del cuerpo del parásito llamado mitocondrión. Cerca del cuerpo basal se encuentra una estructura fibrilar especializada de la mitocondria que contiene un complejo arreglo de ADNs circulares (figura I11). Esta estructura se llama kinetoplasto, y es diagnóstica del orden Kinetoplastida [22,26]. El kinetoplasto de amastigote y epimastigote tiene una morfología similar, es un disco cóncavo de 1 µm de largo y 0,1 µm de ancho.

El peroxisoma de *T. cruzi* se denomina glicosoma; son organelas esféricas de 0,7 µm de diámetro distribuidas por todo el cuerpo del parásito. A diferencia de los peroxisomas eucarióticos típicos, en éstos no está presente la enzima *catalasa.* Esta organela recibe su nombre debido a que la glucólisis se lleva a cabo en este compartimiento y no en el citosol como es habitual en otras células eucarióticas. Otras rutas metabólicas como metabolismo del peróxido, ß-oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de pirimidinas o la ruta de recuperación de purinas ocurren aquí. Una similitud con los peroxisomas típicos es que las proteínas que se encuentran en éstos poseen el peptidoseñal de localización SKL (aunque en *T. cruzi* habría una versatilidad mayor al cambio de alguno de estos aminoácidos) [22,25].

El ácidocalcisoma es una organela de tamaño variable que posee un pH ácido y que se ubica por todo el citoplasma. Los ácidocalcisomas reservan Ca^{2+} y se sugiere que esto sería importante para que el parásito pueda adaptarse a distintos ambientes donde la disponibilidad de calcio es baja. Otra función sería la de acumular reservas de energía en la forma de pirofosfato inorgánico y también como polifosfatos de cadena corta. En tercer lugar la existencia de una ATPasa de protones (H^+) indicaría que podría tener un rol en la regulación del pH intracelular [22,25,26].

El bolsillo flagelar ha sido señalado como una organela extracelular ya que forma un compartimento cerrado porque se une a la membrana plasmática con la

membrana del flagelo (ver figura I9). En esta zona ocurre una intensa endocitosis y exocitosis [22,25]. El complejo citostoma-citofaringe es una especialización del bolsillo flagelar, y es aquí donde ocurre la endocitosis de partículas que luego se acumulan en compartimentos tipo lisosomas llamados reservosomas.

Los reservosomas se localizan en la región posterior de la célula y tienen un diámetro de 0.7 µm. En los reservosomas se encuentra la proteasa cruzipaína que es vital en el proceso de diferenciación del parásito a la forma infectiva y en la infección de células de mamíferos [32]. La función que desempeña el reservosoma no es totalmente comprendida hasta la fecha, pero se sabe que además de proteasas, existe un gran número de enzimas que participan en la biosíntesis de lípidos [33,34]. Diversos estudios indican una gran acumulación de esteroles en estas estructuras, llegando a observarse inclusiones lipídicas dentro de las mismas. El proteoma de esta estructura [33], revela la presencia de un gran número de enzimas de la vía de biosíntesis de lípidos, lo que sugeriría que esta estructura no sólo participaría como estructura de reserva, sino que posiblemente presente una activa participación en la síntesis. Estudios realizados por Lepesheva y cols. [35] sugieren la presencia en esta estructura de la enzima CYP51, responsable de la demetilación del lanosterol en el retículo endoplasmático. Los estudios realizados sugieren que el reservosoma desaparece completamente cuando los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes, sugiriendo que los compuestos que se acumulan en esta organela son consumidos durante el proceso de diferenciación [36]. Hasta la fecha no resulta claro en qué forma se da la biogénesis de estas organelas, por fusión de múltiples vesículas endocíticas o por maduración de endosomas tempranos. Los estudios realizados hasta la fecha sugieren múltiples funciones para estas organelas [37].

1.7. Endocitosis en *T. cruzi*

El proceso de ingestión de macromoléculas es fundamental para la nutrición de la célula. La endocitosis es fundamental para que virus, bacterias y protozoos puedan penetrar dentro del hospedador. Los diversos mecanismos de endocitosis, clasificados según el tamaño de partículas ingeridas, se denominan: fagocitosis,

macropinocitosis y pinocitosis. En los dos primeros procesos, se forman grandes vacuolas a través de extensiones de la membrana plasmática, propulsadas mediante la polimerización de filamentos de actina. En el procesos de pinocitosis, se forman pequeñas vesículas a partir de invaginaciones de la membrana. Este último, de mayor complejidad, se clasifica dependiendo de la participación de las proteínas citoplasmáticas dinamina, clatrina y caveolina. En la figura I10, se encuentran esquematizados los procesos de endocitosis en células de mamífero.

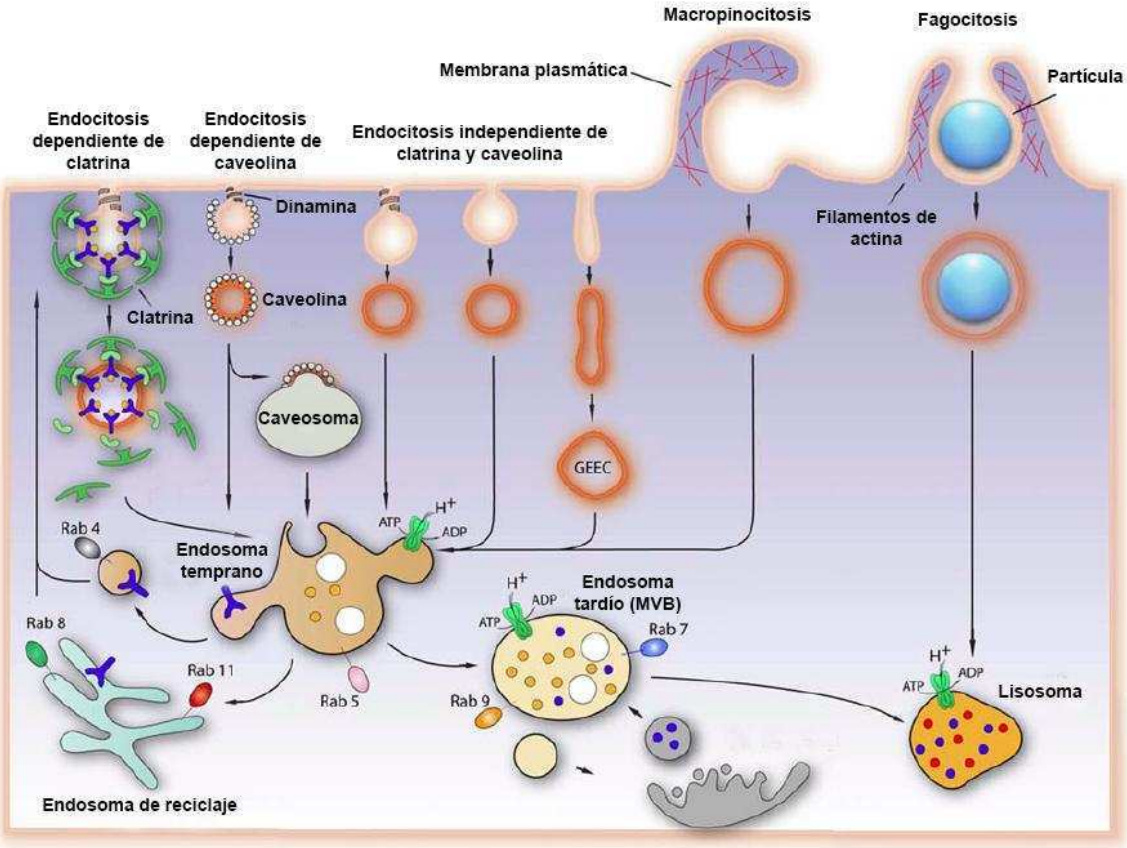


Figura I10. *Representación esquemática del camino endocítico en células de mamífero*. La pinocitosis, representada a la izquierda de la figura, ocurre por tres vías: dependiente de clatrina, dependiente de caveolina, e independiente de clatrina y caveolina. Las diferentes vesículas que se forman se fusionan al endosoma temprano, donde las moléculas son redistribuidas hacia el endosoma de reciclaje para su retorno a la membrana plasmática, o bien hacia el endosoma tardío o el cuerpo multivesicular (MVB). En el endosoma tardío las enzimas hidrolíticas comienzan la degradación de las moléculas, y finaliza en el lisosoma que recibe la carga. A la derecha de la figura se encuentra esquematizada la internalización de partículas y volúmenes de fluidos grandes. Todos los compartimientos reciben iones (H^+) bombeados activamente desde el citosol [38].

Estudios realizados en *T. cruzi* han demostrado peculiaridades en los mecanismos de endocitosis que los distinguen de otras células [39]. En primer lugar, la endocitosis ocurriría fundamentalmente en la forma epimastigote, siendo muy baja en la forma amastigote y ausente en tripomastigote. En segundo lugar, el epimastigote posee dos sitios de ingesta de macromoléculas: el bolsillo flagelar y el citostoma. En tercer lugar, la carga de las vesículas endocitadas son entregadas a estructuras características llamadas reservosomas, que se localizan en la parte posterior de estos protozoos [38].

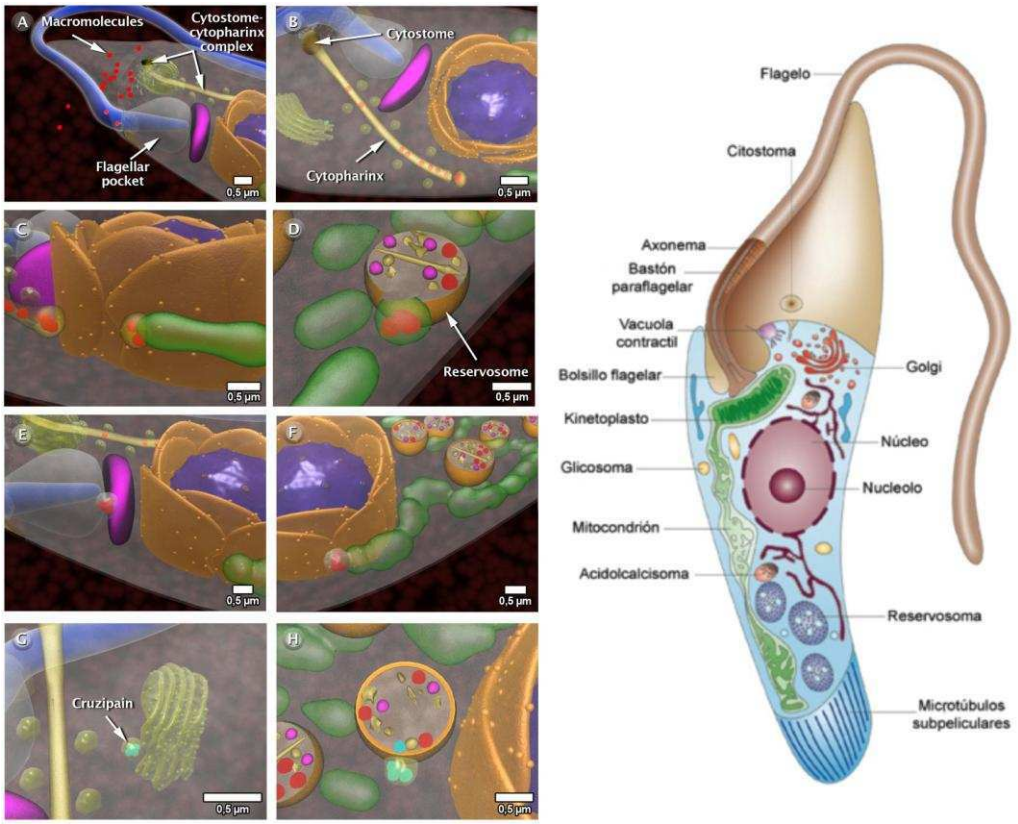


Figura I11. *El camino endocítico en epimastigotes de T. cruzi.* (A) La endocitosis ocurre a través de dos sitios de ingesta de macromoléculas: el complejo citostoma-citofaringe y el bolsillo flagelar. (B) En el complejo citostoma-citofaringe las macromoléculas migran a través del citofaringe y son internalizadas mediante vesículas pequeñas, que se forman en la porción final del complejo. (C) Subsequentemente, las macromoléculas atraviesan la célula por la red tubular de endosomas y son entregadas al reservosoma (D). (E) Las macromoléculas son también internalizadas vía vesículas que se forman en el bolsillo flagelar. (F) El camino endocítico continúa a lo largo de una red de largos túbulos y vesículas que se extienden hacia la parte posterior de la célula, y regresan en sentido opuesto hasta el reservosoma. (G) En este modelo se sugiere que las moléculas de cruzipaina, junto a otras proteasas, son procesadas y liberadas del complejo de Golgi. (H) Vesículas conteniendo estas moléculas interactúan con el camino endocítico y son transportadas hacia los reservosomas. A la derecha de la figura se encuentra esquematizado un epimastigote de *T. cruzi* para una mayor comprensión.

En la figura I11 se observa un esquema detallado del proceso de endocitosis. Para una mayor comprensión del esquema, un video con una explicación exhaustiva se encuentra en el siguiente acceso: http://www.youtube.com/watch?v=1G-zhjvfbeA.

1.8. Metabolismo redox

Las células intercambian continuamente materia y energía con el entorno, introduciendo materia y transformándola con el objetivo de construir, renovar sus estructuras y conseguir la energía necesaria para sus funciones. Estas transformaciones que ocurren por medio de un conjunto de reacciones químicas, catalizadas por enzimas, se denominan metabolismo. Los objetivos del metabolismo son obtener energía útil (ATP) para la célula, convertir nutrientes exógenos en precursores de macromoléculas, construir macromoléculas y la formación y degradación de las macromoléculas. Muchas reacciones del metabolismo son procesos redox u oxidorreducción, en los que ocurre una transferencia de electrones donde una molécula se oxida y otra se reduce.

Estas reacciones tienen muchas veces como consecuencia la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés Reactive Oxygen Species) tales como el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical oxidrilo (HO^-) y del nitrógeno como el óxido nítrico (NO^-) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) [40]. Este tipo de moléculas altamente reactivas son capaces de reaccionar e inducir daños a distintos componentes celulares:

- Daño en el ADN: la oxidación de residuos del nucleótido guanina a 7-hidro-8-oxo-deoxiguanosina lleva luego a la transversión de G:C a T:A, o la generación de dímeros de timina, provocando así mutaciones y deleciones.

- Daño a proteínas: las proteínas son un blanco perfecto del ataque de radicales libres debido a que unen con frecuencia metales de transición generándose hidroxilo en sitios específicos y oxidando grupos sulfihidrilos, inhibiendo su correcto funcionamiento o desnaturalizando las proteínas.

- Daño a lípidos: la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y lipoproteínas lleva a

la peroxidación de los mismos, afectando la fluidez de los fosfolípidos y conduciendo a un daño de las membranas, lo que provoca un mal funcionamiento de la mitocondria y otras organelas, y la rigidez de la membrana plasmática y una pérdida de su función biológica [41].

A su vez, el ataque de las ROS sobre otras moléculas genera nuevas especies reactivas en una reacción en cadena [42], tales como $R^{-}OH$ (donde R representa cualquier grupo). En la tabla 2 figura una lista de reacciones que dan lugar a la formación de radicales libres:

Reacciones de radicales libres
$2O_2^{\bullet -} + 2H^+$ (SOD) = (SOD) $H_2O_2 + O_2$
$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} = O_2 + Fe^{2+}$
$Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + HO^- + HO^\bullet$
$HO^\bullet + RH = R^- + H_2O$
$R^- + O_2 = ROO^\bullet$
$ROO^\bullet + RH = ROOH + R^-$
$R^- + ROO^-(R^-) = ROOR(R\text{-}R)$
$2ROO^- = [ROOOOR] = ROH + RO + O_2$

Tabla 2. *Reacciones de radicales libres. SOD = Superóxido dismutasa*.

Si bien en bajos niveles las ROS están involucradas en procesos tales como transducción de señales [43,44], un desbalance en el daño molecular y estructural provocado por las ROS se denomina comúnmente estrés oxidativo, y está vinculado a procesos de envejecimiento celular [45], necrosis y muerte celular programada.

Para protegerse de este daño, la célula cuenta con sistemas antioxidantes. Se los suele agrupar en orgánicos o enzimáticos. Los mecanismos homeostáticos con que el organismo enfrenta el daño oxidativo que habitualmente causan estas especies son numerosos y diversos, reflejando la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas, como también los numerosos compartimientos donde actúan en el organismo y la propiedades físicas de éstos. Los antioxidantes orgánicos suelen ser incorporados o sintetizados tales como la vitamina C, la vitamina E, el β-caroteno, flavonoides, ácido lipoico o ubiquinona y fundamentalmente el glutatión (GSH). El

sistema enzimático comprende la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del O_2 a H_2O_2, la glutatión-peroxidasa (GSH-Px) y la glutatióntransferasa (GTr), que reducen hidroperóxidos a alcoholes, y la catalasa (Cat), que reduce H_2O_2 a H_2O.

Al ser organismos aeróbicos y parásitos intracelulares, los tripanosomas están expuestos a especies reactivas del oxígeno y nitrógeno que se originan del metabolismo celular o son producidas por el hospedador. Los tripanosomátidos son más sensibles frente al estrés oxidativo respecto a sus hospedadores ya que carecen de la enzima catalasa, y las enzimas glutatión reductasa (GR) y tiorredoxina reductasa (TyrR) responsables del mantenimiento de los niveles de glutatión [46]. No obstante, estos organismos poseen sistemas antioxidantes que les permiten llevar a cabo la detoxificación de las especies reactivas. El tripanotión (N_1,N_8-(bis)glutationilespermidina) es el principal mecanismo en el mantenimiento del metabolismo redox en tripanosomátidos [47] y ha sido propuesta como blanco terapéutico [48]. Se trata de un ditiol de bajo peso molecular, que consiste en dos moléculas de glutatión unidas covalentemente mediante una molécula de espermidina [49] (Figura I11).

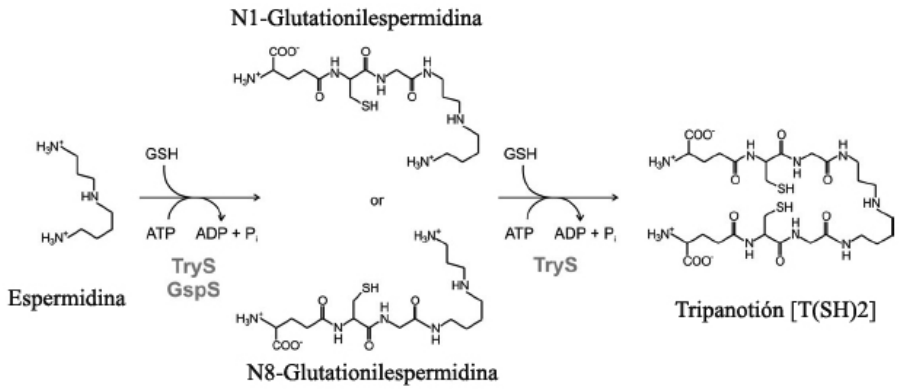


Figura I11. *Biosíntesis del tripanotión.*

La función principal de esta molécula es la eliminación de hidroperóxidos mediante las enzimas triparredoxina peroxidasa (TXNPx), ascorbato peroxidasa (APx) y la glutatión peroxidasa (GPx). Además, la conjugación de moléculas reactivas al tripanotión forma un complejo estable que es fácilmente excretable. Las

reacciones de detoxificación en las que participa el tripanotión se encuentran esquematizadas en la figura I12. Otra enzima de gran importancia en el metabolismo redox del *Trypanosoma cruzi* es la superóxido dismutasa (SOD) [50]. Ésta juega un rol esencial en la regulación de los niveles de especies reactivas del oxígeno, y mediante su acción citoprotectora resguardaría a la célula de procesos apoptóticos. La correcta regulación de estas enzimas resulta fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular y la supervivencia, ya que la deleción de la SOD provoca un aumento en la sensibilidad a las drogas tripanocidas debido a la incapacidad de la célula de liberarse de los $O_2^{\bullet -}$ generados. Por el contrario, la sobreexpresión de la SOD genera una gran cantidad de H_2O_2, y probablemente debido a la ausencia de la catalasa, aumenta la sensibilidad a las drogas.

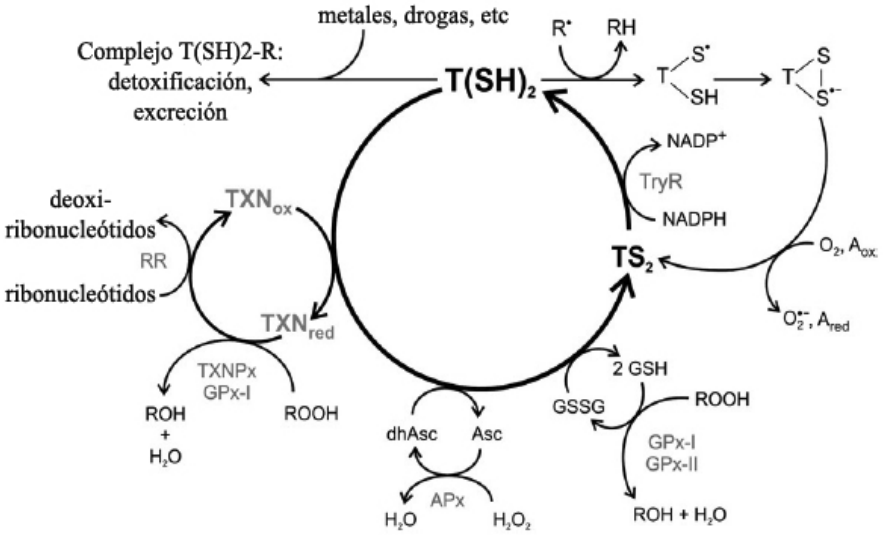


Figura I12. *Metabolismo de hidroperóxidos mediado por el tripanotión.*

1.9. Sistema de detoxificación

En las células eucariotas, las enzimas antes descriptas forman parte de un complejo sistema de detoxificación tal como se muestra en el esquema de la figura I13. El sistema de detoxificación consta principalmente de dos fases [51]. Ante la presencia de compuestos tóxicos para la célula, ya sean de origen endobiótico tales

como productos indeseados del metabolismo, o de origen exógeno como drogas y otros xenobióticos el sistema de detoxificación es el responsable de su eliminación.

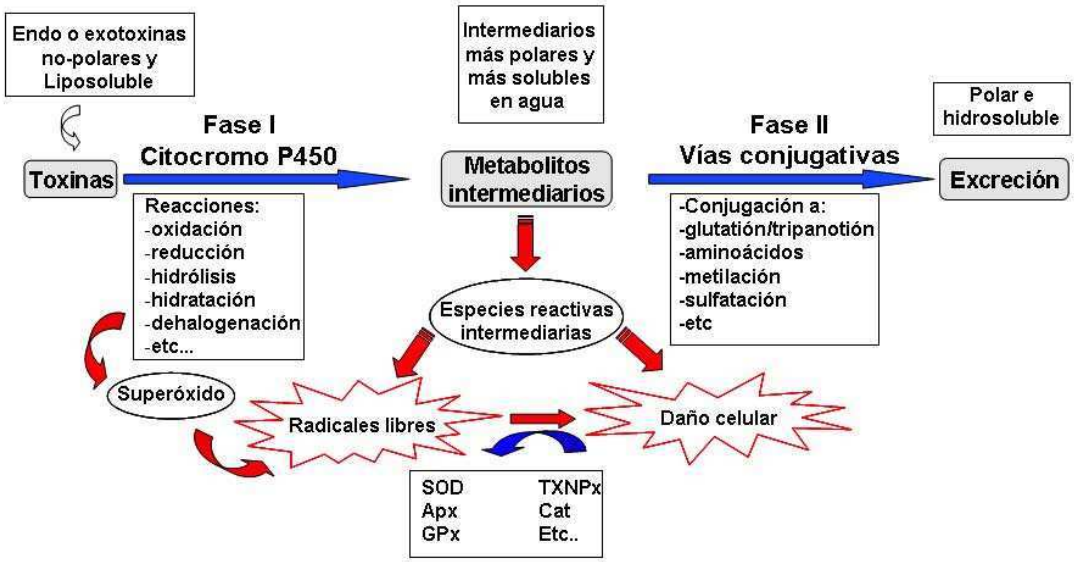


Figura I13. *Sistema de detoxificación celular*.

Las reacciones catalizadas por este sistema tienen como finalidad la biotransformación de estos compuestos nocivos para la célula en productos más solubles en agua y de ese modo facilitar su excreción. Las enzimas de este sistema son clasificadas como enzimas de fase I y fase II [51]. Las enzimas de fase I catalizan las reacciones de funcionalización, generalmente mediado por reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, introduciendo grupos funcionales reactivos de carácter polar (hidroxilo: -OH; sulfidrilo: -SH: amino, $-NH_2$ ó carboxilo: -COOH). Las reacciones de fase II catalizan reacciones de conjugación a otras moléculas, los metabolitos generados por las reacciones de la fase I, se combinan con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos de conjugación que son rápidamente excretados. Los metabolitos generados por estas dos fases son excretados con la ayuda de proteínas de membrana (del tipo MDR, del inglés "Multi Drug Resistance") que los bombean fuera de la célula. Algunos autores se refieren a estas últimas como reacciones de fase III.

En general, las enzimas de fase I son capaces de transformar múltiples

substratos y catalizar reacciones diferentes [52]. Se trata de proteínas catalíticas de naturaleza muy diversa entre las que se incluyen enzimas con actividad monooxigenasa, como el citocromo P450 o la flavin monooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehido deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), la epóxido hidrolasa, esterasas, y otras. El citocromo P450 es sin duda el miembro más destacado de este grupo de enzimas y el que ha sido más ampliamente estudiado.

1.10. El Citocromo P450: características generales

Las reacciones de fase I se realizan fundamentalmente mediante el sistema de Citocromo P450 (CYP). Este sistema es el principal componente en el mecanismo de detoxificación, el cual presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de substratos que es capaz de metabolizar. Si bien el CYP interviene fundamentalmente en reacciones de oxidación, también es capaz de catalizar reducciones, hidrataciones o hidrólisis. Salvo contadas excepciones, el CYP requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el substrato. Se trata de reacciones de monooxigenación en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del substrato, mientras que el otro es reducido hasta agua.

$$RH + NADPH + O_2 + H^+ \xrightarrow{\text{monooxigenasa}} ROH + NADP^+ + H_2O$$

$$NADPH + O_2 + H^+ \xrightarrow{\text{oxidasa}} NADP^+ + H_2O_2$$

$$RH + LOOH \xrightarrow{\text{peroxidasa}} ROH + LOH$$

Figura I14. *Reacciones enzimáticas de oxidación*.

Las enzimas que catalizan este tipo de oxidaciones son conocidas como monooxigenasas u oxidasas de función mixta (figura I14). Estas reacciones difieren de las catalizadas por las oxidasas del metabolismo intermediario, con formación de

peróxido de oxígeno, y de las reacciones de peroxidación en las cuales el átomo de oxígeno introducido en el substrato procede de peróxidos y no del oxígeno molecular. Tal como se mencionó antes, entre las oxidaciones catalizadas por los CYPs se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S-dealquilaciones, deaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones.

Entre sus substratos se incluyen tanto moléculas pequeñas como otras mucho mayores, aromáticas o lineales, tanto planas como globulares, que contengan o no heteroátomos. Esta amplia especificidad de substrato es debida a la existencia de múltiples formas de la enzima, cada una de las cuales se ha adaptado para el metabolismo de grupos de compuestos relacionados estructuralmente. Aún así, esta versatilidad no tiene precedentes y ninguna otra enzima puede acomodarse a substratos de naturaleza química tan dispar.

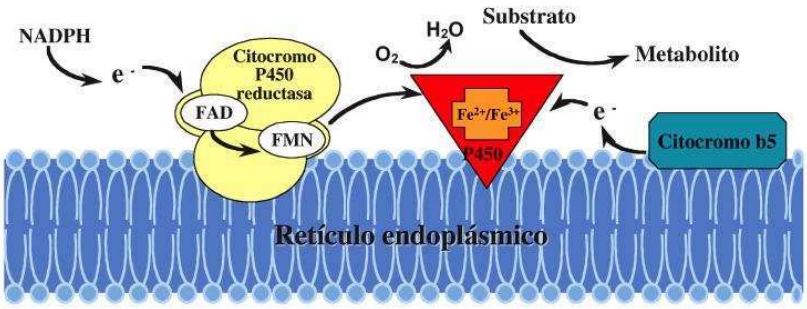


Figura I15. *Esquema del sistema de detoxificación del Citocromo P450.*

Los CYPs son hemoproteínas catalíticas en las cuales un grupo tiol del aminoácido cisteína sirve como quinto ligando al átomo de hierro del grupo hemo y el sexto ligando es una molécula de agua. En general los CYPs de eucariotas tienen un peso molecular que oscila entre 50 y 60 kDa. La similitud en la secuencia de aminoácidos entre los diferentes CYPs es relativamente baja, llegando a ser menor del 20% en algunos casos. La alta conservación de la región del hemo, que se corresponde con el centro catalítico del enzima, refleja un mecanismo común de transferencia de electrones y de protones y de activación de oxígeno. El CYP permanece anclado a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al

extremo N-terminal, por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana tal como lo muestra la figura I15.

El monóxido de carbono puede unirse al hierro ferroso (forma reducida de la hemoproteína) del CYP para formar un complejo Fe^{2+}-CO, produciendo un cambio en el máximo de absorbancia del grupo hemo (pico de Soret) a 450 nm. Esta propiedad es precisamente la que dio origen a que estas enzimas pasaran a denominarse como Citocromo P450 (P es por pigmento), a pesar de que, como se comprobó posteriormente, estas hemoproteínas no son citocromos, en el sentido estricto de la palabra. Este máximo de absorbancia característico del CYP es utilizado para su cuantificación espectrofotométrica. El grupo tiol de la cisteína ligado al átomo de hierro es el responsable de este pico de Soret.

Los CYPs pueden clasificarse en cuatro clases en función de cómo acceden los electrones desde el NADPH hasta el centro catalítico de la enzima. Las proteínas de clase I utilizan una reductasa que contiene FAD y una ferrosulfoproteína (ferridoxina). Las de clase II usan una cadena de transferencia de electrones más corta y sólo necesitan una reductasa del citocromo P450 (CPR) que contiene FAD/FMN para la transferencia de electrones. Las de clase III son autosuficientes y no requieren un donador de electrones, mientras que las de clase IV reciben los electrones directamente del NADPH.

En los organismos eucariotas los CYPs de clase I se encuentran asociados a la membrana interna de la mitocondria. El origen filogenético de las formas de CYP mitocondrial identificadas en diferentes especies animales (no han sido descriptos en plantas) parece no estar relacionado con los CYPs de clase I de los procariotas, a pesar de sus analogías en la cadena de transporte electrónico. En los mamíferos estos CYPs catalizan diversos pasos de la biosíntesis de hormonas esteroideas y vitamina D_3.

Las enzimas de clase II son las más abundantes en eucariotas. Los CYPs y las NADPH-Citocromo P450 reductasas no están asociados y ambos están anclados de forma independiente en la cara externa de la membrana del retículo endoplásmico mediante la región hidrofóbica del extremo amino-terminal (ver figura I15).

La actividad de algunos CYPs se ve favorecida por la presencia de citocromo

b_5 que facilita la transferencia de electrones desde el NADPH. Estas enzimas participan en múltiples funciones biosintéticas. A modo de ejemplo, en los hongos se encargan de la síntesis de esteroles de membrana y micotoxinas, y en los vegetales intervienen en los procesos de síntesis y catabolismo de hormonas, la oxidación de ácidos grasos, las rutas metabólicas que conducen a la lignificación y la síntesis de pigmentos y compuestos de defensa (antioxidantes, fitoestrógenos, aromas). En los animales, entre sus funciones fisiológicas se incluyen la biosíntesis y el catabolismo de moléculas señalizadoras, hormonas esteroideas, ácido retinoico y colesterol.

Además de sus funciones biosintéticas, los CYPs de clase I y de clase II participan en los procesos de metabolización de xenobióticos. No obstante, en ocasiones participan en procesos de activación contribuyendo a la aparición de fenómenos tóxicos.

Los CYPs de clase III participan en la síntesis de prostaglandinas en mamíferos, mientras que el P450 de clase IV sólo se ha identificado en hongos. Ambas clases de enzimas se podrían considerar como las formas más ancestrales de CYPs que participan en la detoxificación de especies activadas de oxígeno.

1.11. Mecanismo enzimático del CYP

El primer paso del proceso catalítico consiste en la unión del substrato y el desplazamiento del solvente en la sexta posición de coordinación del átomo de hierro. Como consecuencia de ello se originan cambios en el estado de spin, en el potencial redox y en el máximo de absorbancia de la hemoproteína.

En el segundo paso se produce la reducción del complejo hemoproteína-substrato al estado ferroso (el Fe^{3+} del grupo hemo pasa a Fe^{2+}) gracias al aporte de un electrón y al aumento en el potencial redox originado en el paso anterior.

El tercer paso es la unión del oxígeno molecular para formar un complejo superóxido.

En el cuarto paso se produce el aporte de un segundo electrón con la

formación de una especie activada de oxígeno. A partir de este punto el mecanismo no se conoce con certeza. La naturaleza de la especie activada de oxígeno es desconocida (se apunta que pudiera ser una mezcla de complejos hierro-peroxo o hierro-oxo con la hemoproteína). En cualquier caso, se trataría de un oxidante electrofílico de vida muy corta formado por la protonación del dioxígeno (O=O). El resultado final sería la liberación de uno de los átomos de oxígeno en forma de una molécula de agua y la incorporación del otro en el substrato. En la Figura I16 está representado el proceso que daría lugar a la formación de un metabolito hidroxilado. El resultado de la actividad enzimática del CYP no siempre es la inserción de oxígeno en la molécula del substrato, pudiendo catalizar también reacciones de deshidratación, deshidrogenación, isomerización, dimerización, e incluso reducción.

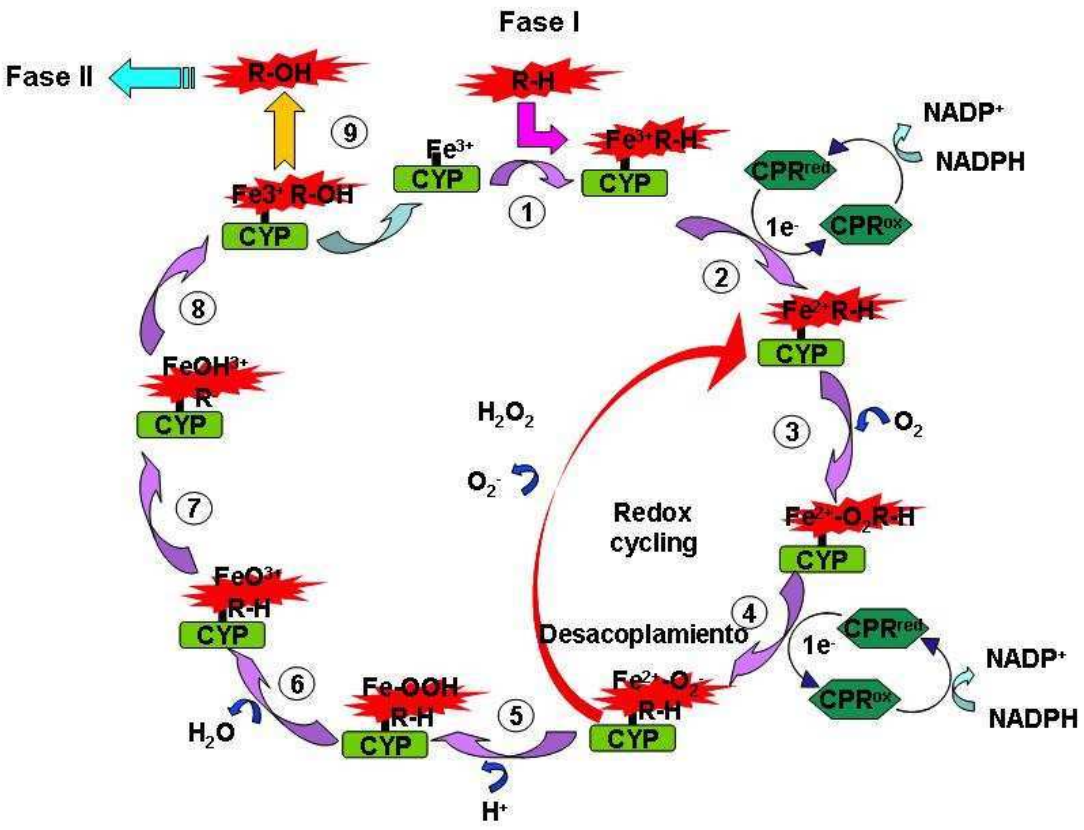


Figura I16. Ciclo *catalítico del Citocromo P450 (CYP) para la hidroxilación de un compuesto (RH)*. Los electrones cedidos por la Citocromo P450 reductasa (CPR) provienen del NADPH. El desacoplamiento de este ciclo provoca el fenómeno de "Redox Cycling" generando la aparición de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, capaces de provocar daño celular.

El desacoplamiento del ciclo catalítico del CYP se produce cuando los

electrones del cofactor NADPH son consumidos sin formación de metabolitos oxidados. Esto ocurre cuando a) el intermediario Fe^{2+}-O_2 se autooxida liberando anión superóxido y regenerando el enzima en estado férrico; b) el intermediario Fe^{3+}-hidroperóxido se disocia en una molécula de H_2O_2 y enzima férrico; ó c) la especie Fe=O en lugar de oxidar el sustrato es reducida a una molécula de agua por transferencia adicional de electrones. La CPR juega un rol fundamental en el mantenimiento del acoplamiento de este sistema, con el aporte de electrones a partir del NADPH, siendo el factor limitante de estas reacciones. El Citocromo b_5 (Cit b_5) es también capaz de ceder un electrón adicional al CYP, pero toma sus electrones del NADH.

1.12. Reductasas del Citocromo P450 (CPR)

Las CPR son flavoproteínas que contienen flavin adenin dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN). Estas enzimas catalizan la transferencia de electrones desde el NADPH vía FAD y FMN hacia el grupo prostético hemo del CYP. La estructura de estas proteínas presenta los dominios característicos de unión a FAD, FMN y NADPH, que es homólogo al domino reductasa de las Óxido Nítrico Sintasas (NOS).

Estas enzimas poseen un tamaño aproximado de 78 kDa y se encuentran asociadas a la membrana a través de su domino aminoterminal, pudiendo detectar su presencia en las fracciones microsomales. Se ha propuesto que una CPR se encontraría rodeada hasta por diez CYP ancladas sobre la cara citosólica de la membrana del retículo endoplasmático, entrando en contacto con cada una de ellas y cediendo sus electrones alternativamente.

De allí que la CPR sea el factor limitante en las reacciones catalizadas por los CYP. Además de la capacidad de reducir al CYP, las CPR son capaces de reducir a otros compuestos cediendo sus electrones. En animales y muchos otros organismos existe un único gen que codifica para CPR. Esta única enzima es la responsable de la interacción con una diversidad de CYPs capaces de expresarse en una misma célula. Hasta muy recientemente, sólo en plantas se había descrito la presencia de dos genes,

que difieren principalmente en el largo de su dominio transmembrana, pero se desconoce que función diferencial ejerza cada una. Trabajos recientes acompañados por los avances en el secuenciamiento de los genomas de diversos organismos revelan la existencia de otras isoformas de CPR.

1.13. Citocromos P450 en tripanosomátidos

Mediante estudios bioquímicos realizados en los años 70 por el Dr. Stoppani, se había demostrado la existencia de diversos citocromos en fracciones subcelulares de *Trypanosoma cruzi* [53,54]. Una década más tarde el Dr. Agosin demostró una actividad Citocromo c reductasa dependiente de NADPH en estos mismos organismos. Más aún, éste y otros autores demostraron la existencia de actividad de CYP *in vivo* [55]. La existencia de estas enzimas detoxificantes proveyó una explicación plausible al fenómeno de resistencia [56]. Agosin demostró también que la actividad Citocromo c reductasa dependiente de NADPH se encontraba no sólo en la fracción microsomal, sino también en la citosólica [57,58,59,60]. En la década del 90 el Dr. Fairlamb describió la presencia de Citocromo P450 oxidasas de función mixta en *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leismania donovani* [55,61]. No fue sino hasta el año 2003 en que se clonó el primer, y hasta ahora único, CYP de *T. cruzi*. Se trata del CYP51, llamado Lanosterol-14-α-demetilasa. Esta enzima esencial en la vía metabólica de la síntesis del ergosterol ha sido caracterizada y se considera uno de los blancos más promisorios en la cura de la Enfermedad de Chagas [61,62,63,64].

La identidad entre los genes que codifican para el CYP51 en tripanosomátidos es muy alta, entre el 76 % y el 81 %, a diferencia del 22% que comparten con el resto de los CYP (Figura I17). Eso permite concluir a Lepesheva y cols. [62] que el análisis de los citocromos desde el punto de vista filogenético corrobora la teoría que predice para los tripanosomátidos un origen evolutivo a partir de un ancestro distinto de los organismos fotosintéticos.

```
MT              76 : Y-PFMTPIFGEGVVFD
Nocardia        76 : Y-PFMKPIFGEGVVFD
M.capsulatus    79 : Y-RIMTPIFGRGVVFD
Potato         107 : Y-QFNVPTFGPGVVFD
Cotton         106 : Y-QFNVPTFGPGVVFD
Onion          108 : Y-QFNVPTFGPGVVFD
Pine           107 : Y-QFNVPTFGPGVVFD
G.algae        102 : Y-DFNVPTFGRGVVFD
R.algae        130 : Y-AFSVPIFGKGVVYD
Slime mold      94 : Y-RFVTPVFGKGVVYD
TB             103 : Y-SFMVPVFGEGVAYA
TB.gambiense   103 : Y-SFMVPVFGEGVAYA
T.congolense   103 : Y-SFMVPVFGEGVAYA
T.vivax        103 : Y-AFMVPVFGEGVAYA
T.cruzi        103 : Y-TIMTPVFGEGVAYA
L.major        102 : Y-SFMVPVFGEGVAYA
L.infantum     102 : Y-SFMVPVFGEGVAYA
L.braziliensis 102 : Y-SFMVPVFGEGVAYA
Monkey         130 : YSRLTTPVFGKGVAYD
Bull           132 : YSRLTTPVFGKGVAYD
Rat            131 : YGRLTTPVFGKGVAYD
Chicken        123 : YSRLTTPVFGKGVAYD
Frog           129 : YSRLTTPVFGKGVAYD
Zebrafish      123 : YARLTTPVFGKGVAYD
C.albicans     118 : YKHLTTPVFGKGVIYD
S.cerevisiae   126 : YAHLTTPVFGKGVIYD
M.fruticola    122 : YTVLTTPVFGKDVVYD
B.graminis     122 : YTVLTTPVFGTDVVYD
U.necator      122 : YTNLTTPVFGRDVVYD
C.posadasii    122 : YSPLTTPVFGRHVVYD
V.inaequalis   119 : YSPLTTPVFGSDVVYD
V.nashicola    119 : YSPLTTPVFGSDVVYD
                     Y  ▲     FG
```

Figura I17. *Biodiversidad de CYP51 en tripanosomátidos*. Para su comparación con otros eucariontes inferiores se alinearon un total de 83 secuencias de las que se muestran algunas más representativas. La flecha señala los residuos específicos para cada taxón.

1.14. El ergosterol en tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son similares a los hongos en cuanto a la composición celular y biosíntesis de esteroles [65]. A diferencia de los mamíferos, que sintetizan colesterol, los epimastigotes producen principalmente ergosterol [66]. *T. cruzi* posee cantidades muy significativas de colesterol exógeno [66], principalmente en amastigotes [67]. No obstante, todas las formas del parásito son extremadamente sensibles a inhibidores de la síntesis de esteroles. La depleción de esteroles provoca la muerte celular debido a la disrupción de sus membranas, demostrando una necesidad por esteroles específicos que no son sintetizados por el hospedador [68]. Esta ruta biosintética es considerada uno de los blancos terapéuticos más atractivos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas [69]. Inhibidores de la biosíntesis de esteroles han demostrado poseer una potente actividad contra *T. cruzi* [70], y se sugiere la posibilidad de desarrollar inhibidores aún más potentes, ya que la industria farmacéutica ha desarrollado una gran variedad de compuestos derivados como agentes anti-fúngicos [69]. Existe una enorme cantidad de trabajos que sugieren la utilización de azoles derivados del ketoconazol como agente tripanocida, tales como

Figura I18. *Esquema de las enzimas y metabolitos intermedios que intervienen en la biosíntesis del ergosterol en S. cerevisiae desde el Acetil-CoA.* Se compone por tres vías metabólicas distintivas: la vía de síntesis de mevalonato, la de isoprenoides (no se describe en detalle los múltiples pasos que las componen) y finalmente la vía de síntesis del ergosterol (con sus pasos detallados). Las proteínas que intervienen en las reacciones están indicadas en azul, y en rojo están marcados algunos componentes claves de este metabolismo. Las flechas rojas indican los pasos enzimáticos en los que está propuesta la CPR como dadora de electrones. En el pasaje del lanosterol al 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trienol interviene el CYP51 (Lanosterol-14α-demetilasa).

el posaconazol [71,72,73,74]. Este camino metabólico ha sido profundamente estudiado y caracterizado en *Saccharomyces cerevisiae* [75,76], y por lo tanto debido a su similitud resulta más sencillo su comprensión en los parásitos.

En la figura I18 se observa la vía metabólica que conduce a la formación del ergosterol en levaduras. El gen erg11 es el que codifica para el CYP51 (ER11), responsable de la demetilación del lanosterol y dependiente de la CPR para su actividad. Se ha propuesto también que ERG1 y ERG5 son proteínas cuyo dador de electrones sería la CPR [77].

Hasta aquí se ha revisado la importancia de las reacciones catalizadas por el sistema de Citocromo P450 en el metabolismo celular. Estas enzimas participan en procesos de detoxificación y biosíntesis de un gran número de compuestos esenciales para la célula y se las ha vinculado a mecanismos de resistencia a drogas ya que está aumentada su actividad en organismos patógenos resistentes [78]. Por estos motivos es que han sido propuestos como blancos terapéuticos en *T. cruzi* [79]. Se ha remarcado también la importancia de la enzima Citocromo P450 reductasa en las reacciones mediadas por los CYP.

1.15. Antecedentes

Durante la realización de la Tesina de Licenciatura titulada "Clonado, expresión y caracterización de una familia de citocromo P450 reductasas de *Trypanosoma cruzi*", se obtuvieron una serie de resultados que fueron oportunamente publicados [1], los cuales sentaron las bases para luego poder desarrollar el trabajo correspondiente a esta Tesis doctoral.

Dicho trabajo se inició con la búsqueda de una óxido nitrico sintasa (NOS), debido a los reportes previos que describen esta actividad en extractos de parásitos [80]. Estas enzimas catalizan la conversión de L-arginina en L-citrulina + óxido nítrico. Las NOS de animales tienen en su estructura un dominio oxigenasa (por el que se unen a la arginina) en su extremo amino-terminal y un dominio reductasa en el extremo carboxilo-terminal, que a su vez está compuesto por un dominio de unión

a FMN, FAD y NADPH, mediante los cuales transfiere los electrones desde el NADPH hacia la arginina. Éste dominio reductasa posee una gran homología con las CPR, y se piensa que las NOS podrían haber evolucionado a partir de estas enzimas [81].

En la búsqueda de este gen en la base de datos del genoma de *T. cruzi* no se pudo hallar ninguna secuencia que fuera capaz de codificar para un péptido que tuviera homología con el dominio oxigenasa de la NOS. No obstante, se encontraron tres secuencias con alta identidad con el dominio reductasa y eran indicados como putativas CPRs. La existencia de múltiples isoformas de esta enzima en el parásito, a diferencia de su hospedador mamífero en el que se encuentra una única CPR, resultaba de particular interés, ya que podría representar un blanco terapéutico, y proporcionar información que contribuya a explicar el fenómeno de resistencia a drogas y la capacidad para la supervivencia del parásito en los diferentes ambientes que sufre a lo largo del ciclo de vida.

En el período señalado se han identificado, clonado, expresado y parcialmente caracterizado tres genes de *T. cruzi* correspondientes a putativos Citocromo P450 reductasas. Las tres secuencias presentan una alta identidad con CPRs de otros organismos, y fueron denominadas *Tc*CPR-A, *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C. La descripción de estas enzimas contempló en primer lugar la caracterización *in silico* de las mismas, pudiendo identificarse los dominios canónicos de unión a los cofactores FMN, FAD y NADPH de las CPRs (Figura I19).

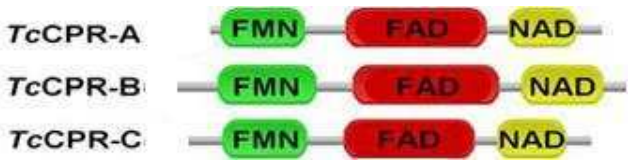


Figura I19. *Comparación esquemática de las tres CPRs de T. cruzi*

Interesantemente, se observó que *Tc*CPR-A carecía del dominio transmembrana en su región amino-terminal presente en las otras dos secuencias. Más aún, al realizar un árbol filogenético de estas enzimas (Figura I20), *Tc*CPR-B y

*Tc*CPR-C agruparon junto a otros CPRs de diversos organismos, mientras que *Tc*CPR-A se ubicó en un grupo separado junto a otras flavoproteínas.

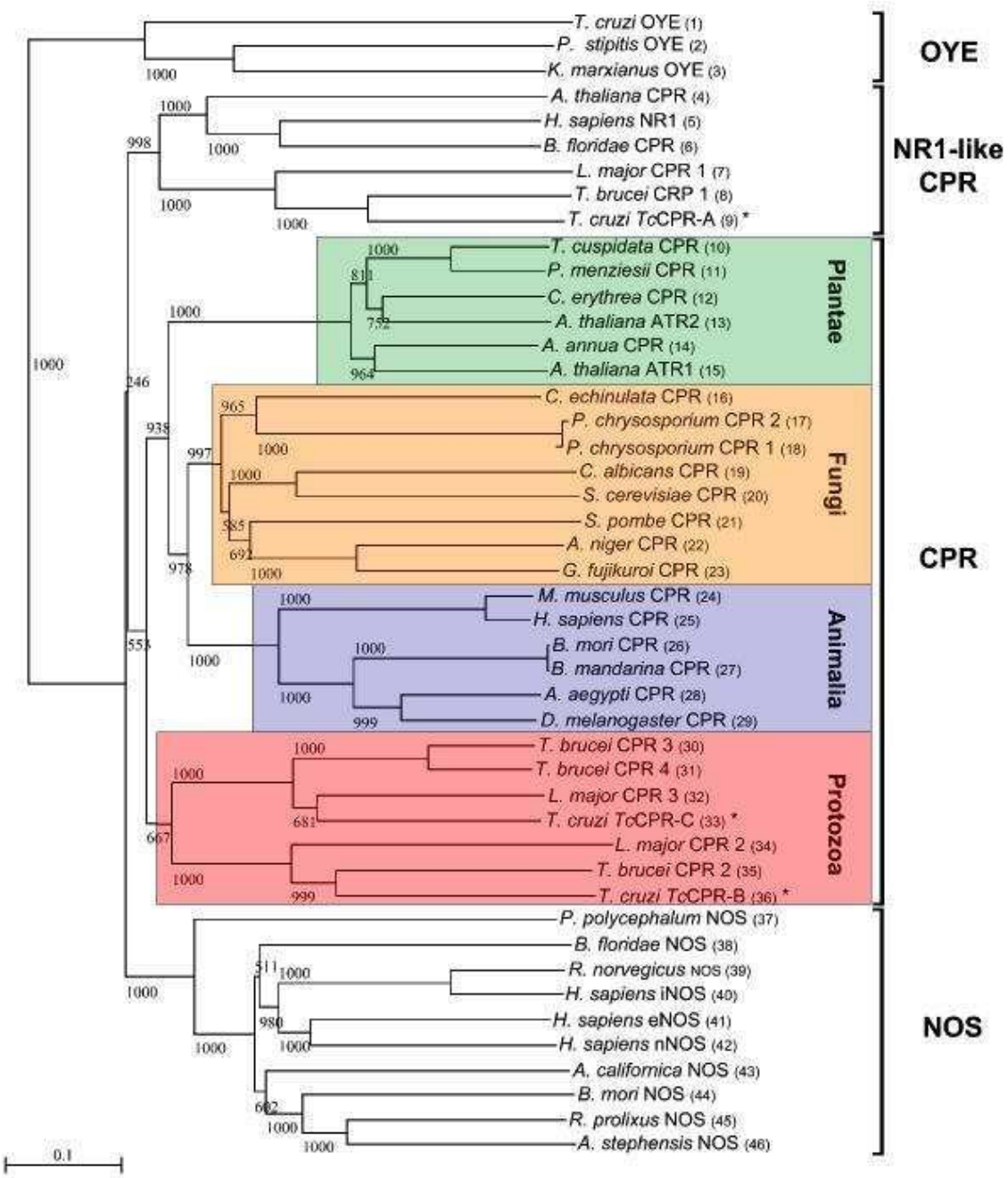


Figura I19. *Árbol filogenético construido a partir de la comparación de secuencias anotadas o atribuídas de CPRs, NOS y OYE (Old Yellow Enzyme).*

A fin de caracterizar bioquímicamente estas enzimas, las tres fueron clonadas en diferentes vectores de expresión para bacterias, lo que permitió su expresión y purificación. La caracterización bioquímica de las mismas constó de la determinación de las constantes cinéticas, la capacidad de reducir al citocromo c, su dependencia por NADPH y no por NADH (característico de las CPRs), su inhibición por DPI (inhibidor clásico de flavoproteínas) y la capacidad de catalizar reacciones dependientes de CYP en sistemas reconstituidos *in vitro*.

Durante este período, se clonaron *Tc*CPR-A y *Tc*CPR-B en el vector pTREX, para sobreexpresar estas enzimas en *T. cruzi*. La sobreexpresión de *Tc*CPR-A no pudo lograrse, ya que la misma resultaba letal. Por el contrario, parásitos que sobreexpresaban *Tc*CPR-B fueron obtenidos de forma estable. Al realizar un ensayo de resistencia a drogas se pudo observar que la sobreexpresión de *Tc*CPR-B confería a los parásitos una mayor resistencia a la droga tripanocida benznidazol (Figura I21).

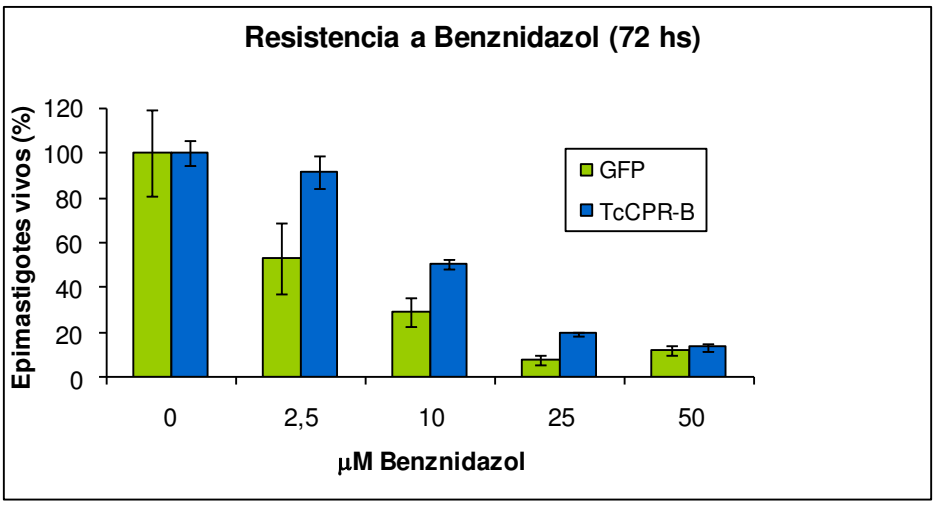


Figura I21. *Resistencia al Benznidazol.* Los epimastigotes que sobreexpresan *Tc*CPR-B aumentan la sobrevida en presencia de benznidazol respecto de los transfectados con la proteína GFP (Control).

HIPÓTESIS
Y
OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis de trabajo

En *Trypanosoma cruzi* se encuentran las enzimas del sistema de citocromo P450. Estas enzimas podrían participar en reacciones de biosíntesis de lípidos y estar mediando el fenómeno de resistencia a drogas al participar en mecanismos de detoxificación.

2.2. Objetivos generales y específicos del trabajo

El objetivo general de este trabajo se basa en el estudio de los mecanismos de detoxificación y la biosíntesis de ergosterol en *Trypanosoma cruzi*. Este estudio proveerá importantes respuestas a interrogantes de la biología del parásito, y una oportunidad para el desarrollo racional de nuevas drogas terapéuticas para el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana.

Las enzimas del sistema de citocromo P450 participan en una gran diversidad de rutas metabólicas tanto en la biosíntesis del ergosterol (esterol de vital importancia en protozoarios) como en mecanismos de detoxificación celular. Los genes que codifican para estas proteínas se encuentran presentes en *Trypanosoma cruzi*. Los objetivos particulares de esta Tesis doctoral son la caracterización de las citocromo P450 reductasas de *T. cruzi*, en cuanto a su bioquímica, su localización celular, la interacción con citocromos P450 y la función biológica en la que intervienen en el parásito. Los resultados de este trabajo aportarán importantes conocimientos sobre el metabolismo de tripanosomátidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Localización subcelular de las *Tc*CPRs

La localización subcelular de las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroles aún no ha sido totalmente esclarecido en tripanosomátidos. Se sabe que los pasos iniciales de la biosíntesis de esteroles en animales y plantas se producen principalmente en el citosol y los posteriores generalmente en el retículo endoplasmático (RE) [65].

Tal como se ha demostrado previamente mediante Western blot [1], utilizando antisueros policlonales de ratón contra las proteínas recombinantes, *Tc*CPR-A, *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C se encuentran en diferentes fracciones subcelulares en epimastigotes. Con el fin de encontrar elementos que permitan explicar la presencia de tres reductasas de citocromo P450 en *T. cruzi* y además, investigar posible rol fisiológico, se analizó su co-localización con diferentes marcadores de organelas de tripanosomátidos (citosol, ER, glicosoma y reservosoma).

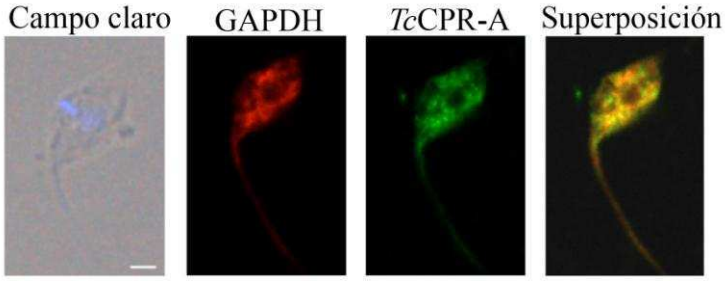


Figura R1. *Localización subcelular de TcCPR-A.* El revelado con el anticuerpo contra la proteína recombinante y el anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (verde) coincide sólo parcialmente con el anticuerpo marcador de glicosomas (rojo). La barra blanca indica 2 µm.

La localización subcelular de *Tc*CPR-A resultó particularmente elusiva. Se podría predecir que la localización de esta enzima tendría un patrón citoplasmático. No obstante, realizando ensayos de inmunolocalización mediante microscopía de epifluorescencia y confocal, se observó un patrón puntillado, como si se encontrara

dentro de vesículas. Se observa en la figura R1 una co-localización parcial de *Tc*CPR-A con el marcador de glicosoma α-GAPDH. Los intentos por co-localizar esta enzimas en gotas lipídicas mediante el marcador Nile Red no fueron existosos.

En la figura R2, se observa que *Tc*CPR-B localiza principalmente en áreas específicas en la región posterior del parásito, con un patrón típico de reservosomas. Esto fue confirmado mediante la co-localización parcial de *Tc*CPR-B con cruzipaína, enzima característicamente ubicada en esa estructura subcelular (Figura R2D). *Tc*CPR-C se encuentra principalmente en RE, con una marcada concentración alrededor del núcleo y el kinetoplasto, coincidente con el marcador de RE, la proteína BIP (Figura R2F). Se obtuvieron resultados similares con el marcador de RE calreticulina.

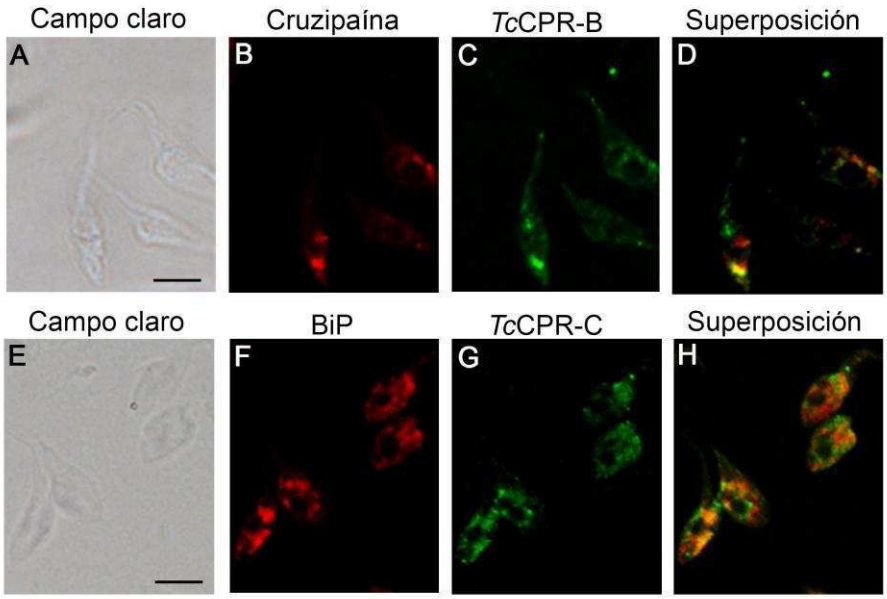


Figura R2. *Localización subcelular de TcCPR-B y -C.* La morfologia de los epimastigotes se observó por microscopía de campo claro (A,E). Las *Tc*CPRs se revelaron con los anticuerpos generados contra las proteínas recombinantes *Tc*CPR-B (C) y *Tc*CPR-C (G). Reservosomas y RE se visualizaron usando anticuerpos anti-cruzipaína (B) y anti-proteína BIP (F) respectivamente. Los anticuerpos secundarios estaban conjugados a CY3 (rojo) o Alexa Fluor 488 (verde). La superposición de los campos rojo y verde se ve en (D,H). Barra de escala: 2 µm

El hallazgo de *Tc*CPR-B en reservosomas de epimastigotes, aunque inesperado, no resulta totalmente sorprendente. La biogénesis del reservosoma

implica el tráfico de vesículas desde el complejo del bolsillo flagelar que se fusionan con membranas del aparato de Golgi y retículo endoplasmático y migran hacia la región posterior del parásito. Diversos estudios proteómicos de esta organela han revelado la presencia de enzimas del metabolismo lipídico [33,36]. En tripanosomátidos se encuentran esteroles estructurales en diversas membranas: plasmática, mitocondrial, glicosomal y del reservosoma propiamente dicho [90,91,92]. En el trabajo de Lepesheva y cols. [35] se ha podido observar mediante microscopía electrónica la presencia de la enzima CYP51 en reservosomas. Estos resultados sugieren que el metabolismo del ergosterol podría llevarse a cabo en diferentes organelas en estos parásitos y tal vez de manera redundante.

3.2. Búsqueda de un rol fisiológico para las *Tc*CPRs mediante ensayos de complementación en levaduras

A fin de poder discriminar y confirmar cuáles de entre las tres reductasas de *T. cruzi* son capaces de participar en procesos catalizados por CPR *in vivo*, se decidió realizar ensayos de complementación en levaduras. Para ello, se utilizaron levaduras de la cepa WRΔ, derivadas de la cepa W303-1B, las cuales fueron bloqueadas ("knockeadas") para el gen de la CPR de levadura (NCP1) [82]. Éstas presentan un fenotipo característico: colonias pequeñas, crecimiento lento, alta sensibilidad a antibióticos, y bajo contenido de ergosterol.

La validez de los resultados obtenidos en ensayos de complementación es susceptible de cuestionamientos. La correcta expresión, plegado y actividad funcional de una proteína proveniente de un organismo (*T. cruzi*) expresada en otro organismo (*S. cerevisiae*) es, cuanto menos *a priori*, un interrogante. La interacción entre proteínas provenientes de organismos que en muchos casos poseen millones de años de divergencia evolutiva, podría constituir un obstáculo en la interpretación de los resultados obtenidos. Existen diversos factores que podrían comprometer el correcto funcionamiento del sistema, tales como:

- Niveles de expresión de las proteínas.

- Divergencia evolutiva de las proteínas en los dominios de interacción, no admitiendo la formación del complejo proteína-proteína.
- Divergencia en las secuencias de las señales peptídicas de localización, lo que no permitiría interacción física entre los componentes del sistema.

Por estos motivos las conclusiones que se pueden extraer de la misma son sin lugar a dudas controversiales. No obstante, numerosos trabajos han demostrado que la técnica de complementación resulta válida y de gran utilidad, incluso entre organismos evolutivamente tan distantes o más que levaduras y humanos [93]. Los Kinetoplástidos han divergido muy temprano en la evolución de los eucariotas, sin embargo, tanto *T. cruzi* como *S. cerevisiae* son organismos unicelulares, agrupados dentro de los llamados "eucariotas inferiores", y comparten un gran número de aspectos, entre los que se destaca el metabolismo del ergosterol, muy conservado entre estos dos, y que interesa en este caso particular. Esta técnica es por lo tanto tan valedera o más que otras relacionadas, como la de la medición de actividad *in vitro* en ensayos de reconstitución. Siempre que se consideren los puntos mencionados anteriormente, las conclusiones y conjeturas obtenidas al respecto resultarán válidas.

Las secuencias codificantes para *Tc*CPR-A, *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C fueron amplificadas utilizando cebadores específicos para las mismas, y luego subclonadas en el vector de expresión en levaduras pYES2 según se describe en Materiales y Métodos. A fin de contar con un control positivo, se utilizó la autocomplementación mediante la expresión de la proteína de levadura NCP1 recombinante.

Se realizaron las siguientes transformaciones de levaduras:

Nombre	Cepa de levadura utilizada	Secuencia en el vector
W303-1B	W303-1B	(vacío)
WRΔ	WRΔ	(vacío)
WRΔ-Y	WRΔ	NCP1
WRΔ-A	WRΔ	*Tc*CPR-A
WRΔ-B	WRΔ	*Tc*CPR-B
WRΔ-C	WRΔ	*Tc*CPR-C

Tabla R1. *Transformaciones en levaduras*

Se transformó la cepa W303-1B con el vector pYES2 vacío como control de la expresión nativa de la reductasa de la levadura. La cepa WRΔ a su vez también

fue transformada con el vector vacío a fin de contar con un control negativo, y por supuesto, con los vectores que contienen las secuencias codificantes para *Tc*CPR-A, *Tc*CPR-B, *Tc*CPR-C y NCP1.

3.2.1. Análisis del crecimiento en medio líquido

Se decidió evaluar si la expresión de *Tc*CPR-A, *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C era, cada una de ellas, capaz de revertir la deficiencia en el crecimiento de la cepa WRΔ. A fin de constatar si el sistema empleado en el estudio funcionaba correctamente, se hicieron crecer las levaduras en medio SD-U (ver Materiales y Métodos). La presencia de glucosa en el medio reprimiría la expresión de las proteínas clonadas en el vector, por lo que no se esperaría encontrar diferencias entre las distintas WRΔ transformadas con cada vector.

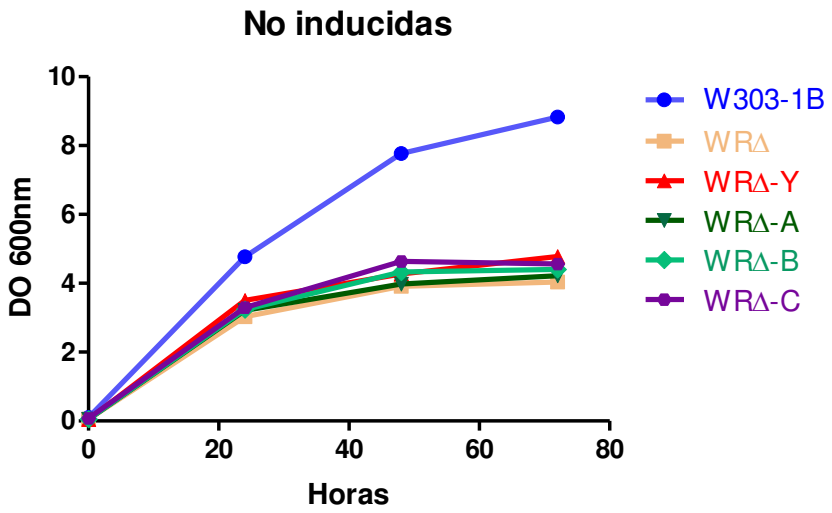


Figura R3. Comparación de la tasa de crecimiento en medio SDU de las cepas de levaduras parental (W303-1B), deficiente en CPR (WRΔ), autocomplementada (WRΔ-Y), transformada con *Tc*CPR-A (WRΔ-A), con *Tc*CPR-B (WRΔ-B), y con *Tc*CPR-C (WRΔ-C).

Dado que se observaba un mayor retraso en el crecimiento en las levaduras inducidas (SGR-U), se decidió modificar ligeramente el protocolo, realizando un pre-cultivo en medio inductor (ver Materiales y Métodos). No obstante, y pese a que

los experimentos fueron realizados de ese modo, el retraso en el crecimiento persistió.

En la figura R3 se observa claramente que al cabo de 48 horas las distintas cepas de WRΔ no presentan diferencias en el crecimiento entre ellas, pero sí con la cepa parental W303-1B, cuyo crecimiento fue significativamente mayor. Este control permitió validar el método empleado. Se decidió entonces evaluar el sistema haciendo crecer las levaduras en medio SGR-U, es decir en ausencia de glucosa, y con galactosa más rafinosa (esta última aporta una fuente de carbono y evita así la metabolización de la galactosa que mantiene el sistema de expresión activado).

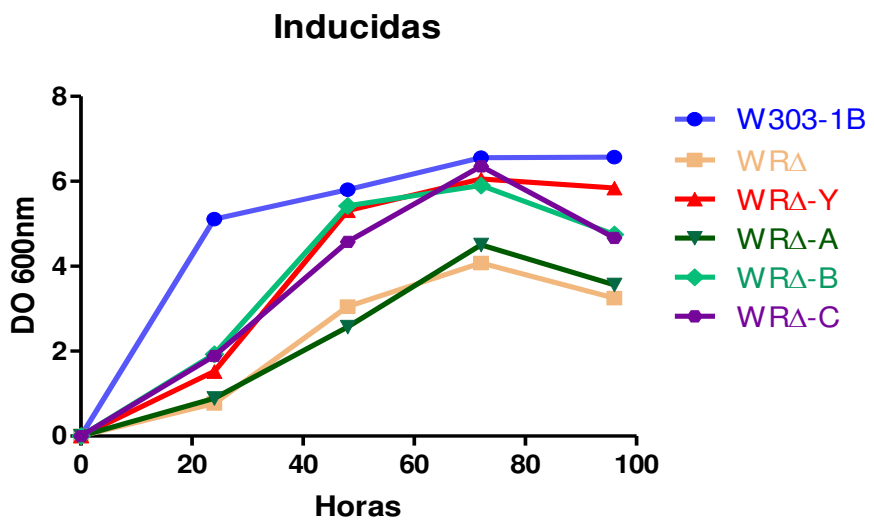


Figura R4. Comparación de la tasa de crecimiento de las mismas cepas de levaduras que en Figura R3 pero en medio SGR-U (inductor).

En primer lugar, en la figura R4 se observa que el crecimiento de la levadura salvaje W303-1B es sensiblemente menor en este medio de cultivo. La ausencia de glucosa, y la utilización de rafinosa (y galactosa) en el medio resultan probablemente en una menor capacidad de crecimiento. Se monitoreó el crecimiento de las levaduras hasta 96 horas posteriores a la inoculación a fin de evaluar el comportamiento de las mismas y poder elegir el mejor punto de comparación. Tal como puede observarse en el gráfico, la cepa W303-1B presenta un mayor crecimiento que las demás. No obstante, se advierte que el crecimiento de las levaduras WRΔ presenta diferencias entre los distintos clones transformados. En

primer lugar, se observa que WRΔ-A no presenta diferencias con WRΔ. Por el contrario, WRΔ-Y (autocomplementada) presenta un marcado aumento en el crecimiento, aunque los niveles no alcancen los de W303-1B. Si bien esto no sería la situación ideal de una autocomplementación, este resultado es previsible teniendo en cuenta las reservas antes mencionadas acerca de la técnica de complementación. Las cepas WRΔ-B y WRΔ-C presentan un crecimiento menor que WRΔ-Y, pero mayor que WRΔ y WRΔ-A.

Dado que las levaduras se encuentran prácticamente en fase estacionaria a las 48 horas, es decir que han alcanzado el nivel máximo de crecimiento, se eligió este punto para graficar.

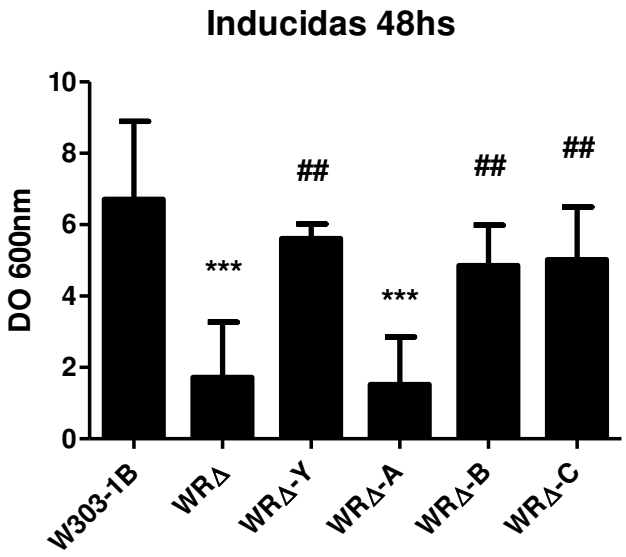


Figura R5. Diferencia en la tasa de crecimiento de las cepas salvaje, mutante deficiente y complementadas, luego de 48 h en medio inductor SGR-U. ***p<0.001 vs WT; ##p<0.01 vs mutante WRΔ.

En la Figura R5 se aprecia que las levaduras WRΔ que expresan *Tc*CPR-B, *Tc*CPR-C recuperan la tasa de crecimiento de manera similar a las que expresan NCP1, es decir que las reductasas de B y C de *Trypanosoma cruzi* son capaces de crecer a niveles semejantes a los de la levadura autocomplementada. Por el contrario, WRΔ-A no fue capaz de crecer más que las levaduras WRΔ. Con respecto a WRΔ-A, en algunas repeticiones del experimento, se observó una deficiencia en el crecimiento, obteniendo valores iguales a 0 para la absorbancia, o valores cercanos al

inóculo (10^6 células/ml) para el conteo por microscopía. Esto podría significar que de algún modo, la expresión de *Tc*CPR-A resulta tóxica para la levadura, o bien que algún parámetro no fue correctamente evaluado. No obstante, se obtuvieron curvas de crecimiento para esta cepa en algunas oportunidades, inclinándonos por ello, a descartar aquéllas que no presentaran crecimiento.

Este experimento permite concluir que *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C son capaces de complementar, al menos en forma parcial, a levaduras deficientes en la reductasa del Citocromo P450 dependiente de NADPH.

3.2.2. Análisis del crecimiento en medio sólido

A partir de los resultados obtenidos en medio líquido, se decidió evaluar el crecimiento de las levaduras en medio sólido (Figura R6). Mediante esta técnica es posible visualizar en forma directa el crecimiento, apreciando el tamaño y morfología de las colonias.

Nuevamente, y tal como ocurrió en medio líquido, se observó un retraso en el crecimiento en las levaduras crecidas en medio SGR-U. Por el contrario, en medio SD-U, 24 horas luego de realizar la inoculación, las levaduras W303-1B ya presentaban un crecimiento para los inóculos más concentrados, y un leve crecimiento para los distintos clones de las levaduras WRΔ. A las 48 horas, si bien la diferencia no parece tan marcada como lo es en medio líquido, se observa que el crecimiento para W303-1B es mayor que el de la levadura mutante WRΔ, y ésta no presenta diferencias apreciables respecto a las transformadas con los distintos vectores.

Por el contrario, en las placas con medio SGR-U agar, se observa que el crecimiento de las levaduras WRΔ transformadas con *Tc*CPR-B, *Tc*CPR-C y NCP1 alcanzan valores similares, aunque inferiores a los de la cepa W303-1B. Se distingue también que las levaduras WRΔ y la transformada con *Tc*CPR-A prácticamente no presentan crecimiento. A fin de comprobar que las mismas se encontraban efectivamente vivas al momento de ser inoculadas, esta placa fue dejada 24 horas más en la estufa a 28ºC, pudiendo observarse un leve crecimiento de las mismas. En

este punto de 48 horas, se pudo apreciar mejor el crecimiento de las levaduras W303-1B y WRΔ-Y, WRΔ-B y WRΔ-C.

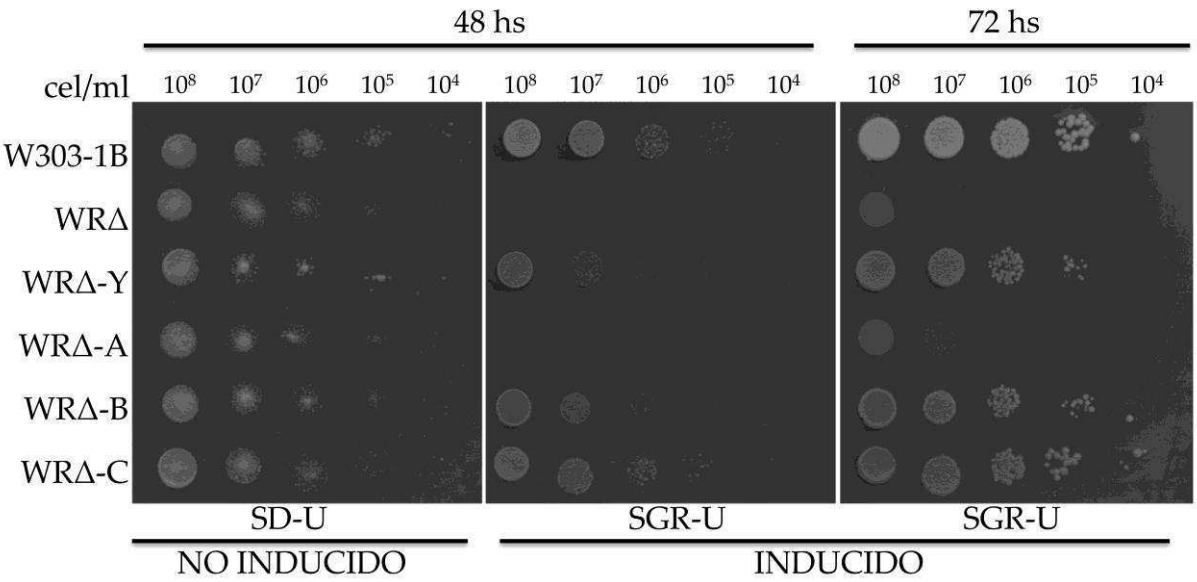


Figura R6. *Inducción de la expresión de CPRs recombinantes en medio sólido con Galactosa (SGR-U).* Se inocularon diluciones seriadas de cada cepa creciéndolas en estufa a 28ºC el tiempo indicado.

A partir de este resultado se puede concluir que *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C fueron capaces de complementar a las levaduras deficientes para la reductasa. Por el contrario, *Tc*CPR-A no fue capaz de restaurar el crecimiento de las mismas en medio sólido.

3.2.3. Sensibilidad al ketoconazole

En el trabajo de Truan et al. [82], se reportó que las levaduras WRΔ presentan una mayor sensibilidad al antibiótico ketoconazole. El mecanismo propuesto para explicar la acción de este compuesto es la inhibición del 14-lanosterol-α-demetilasa. Dado que las levaduras WRΔ son deficientes en la reductasa responsable de aportar los electrones para esta enzima, poseen una mayor sensibilidad en presencia del antibiótico. Se decidió entonces evaluar si las levaduras complementadas eran capaces de revertir este fenotipo. Para ello se realizó un ensayo de halo de inhibición del crecimiento por dicha droga.

Se tuvo que considerar de igual modo los tiempos de crecimiento. A partir del ensayo anterior (crecimiento en medio sólido), resultaba claro que la aparición del crecimiento en placas era distinto para cada cepa de levadura. Se pudo constatar que luego de la aparición del halo de inhibición, el tamaño no se modificó aún pasados varios días de incubación. Se decidió entonces permitir a las levaduras crecer el tiempo suficiente para que resultara evidente este halo.

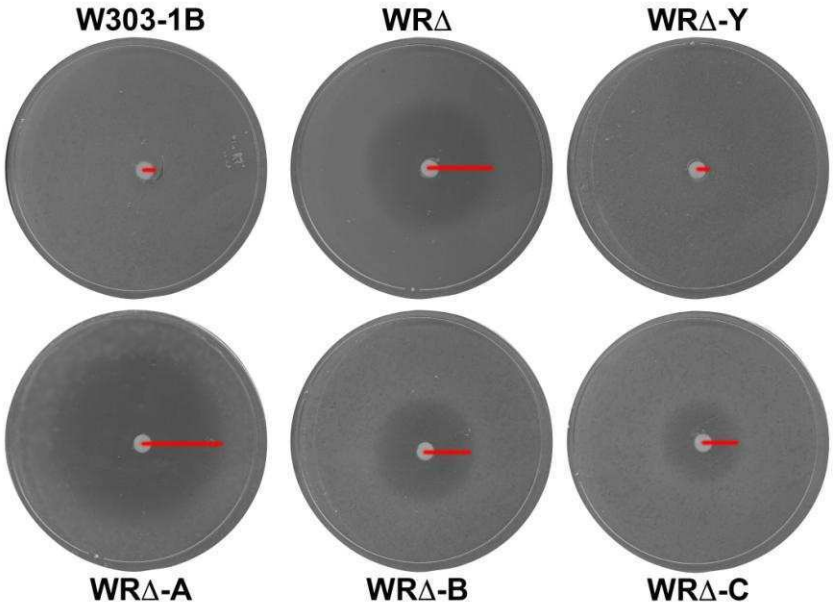


Figura R7. Idénticos inóculos de cada cepa se plaquearon incluidos en el medio de cultivo según se detalla en Materiales y Métodos. El disco que se observa en el centro de cada placa lleva embebido 5 µg de ketoconazol. Las barras rojas marcan la distancia cubierta por el halo de inhibición del crecimiento. La tabla R2 completa el análisis de este resultado.

Tal como puede observarse en la figura R7 la concentración elegida de ketoconazole produce un halo de inhibición menor a 6 mm para las levaduras W303-1B, mientras que el de WRΔ resulta de 18 mm aproximadamente. Al observar el efecto de la droga sobre las levaduras WRΔ-Y, se puede apreciar que las mismas son capaces de autocomplementarse perfectamente (halo menor a 7 mm), resultando prácticamente indistinto de la cepa W303-1B. No obstante, la densidad celular observada a trasluz en la placa resultaba visiblemente menor. Esto resulta congruente con los resultados anteriores, en el que la tasa de crecimiento de las levaduras autocomplementadas eran menores que las W303-1B.

Si se observa a las levaduras WRΔ-A, se puede apreciar un halo de inhibición de gran tamaño (29 mm aproximadamente), incluso superando al de la cepa WRΔ. Este resultado indicaría que la expresión de *Tc*CPR-A provocaría una mayor susceptibilidad de las levaduras a la droga. Tal como se pudo advertir en los ensayos de crecimiento líquido, de algún modo aún no comprendido, esta reductasa parecería inhibir el crecimiento de las levaduras, e inducir una susceptibilidad mayor.

Cepa	Tamaño del halo
W303-1B	< 6 mm
WRΔ	18 mm
WRΔ-Y	< 7 mm
WRΔ-A	29 mm
WRΔ-B	15 mm
WRΔ-C	12 mm

Tabla R2. Radio del halo de inhibición del crecimiento, medido en milímetros desde el centro del disco hasta el borde del halo.

En cuanto a las levaduras WRΔ-B y WRΔ-C, se puede ver en la figura R7 que la expresión de estas reductasas es capaz de revertir en cierto grado la susceptibilidad de las mismas al ketoconazole. El tamaño del halo de inhibición para éstas, de 15 mm y 12 mm respectivamente, se encuentra entre el de la condición de WRΔ y el de la cepa autocomplementada. Se puede concluir que la complementación en este ensayo fue parcial para estas proteínas. La expresión de *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C confiere una resistencia parcial respecto a las levaduras WRΔ.

3.2.4. Análisis del contenido lipídico de las levaduras

El contenido lipídico de las levaduras crecidas en medio inductor fue analizado mediante cromatografía gaseosa y espectrometría de masa. La vía metabólica de la síntesis de ergosterol consta de varios pasos, tal como se describió

en Introducción (Figura I18). En levaduras, se ha propuesto que la CPR interviene en el pasaje del escualeno al epóxido de escualeno a través de ERG1, en la demetilación del lanosterol al 4,4,-dimetil-colesta-8,14,24-trienol mediante ERG11, y finalmente en en el pasaje del ergosta-5,7-dienol al ergosta-5,7,22,24-tetraen-3β-ol al reducir a ERG5.

Se evidencia en la figura R8 un cambio en el perfil lipídico de la cepa WRΔ respecto de la cepa salvaje W303-1B. La cepa mutante posee un menor contenido de ergosterol, pero un mayor contenido de lanosterol. La cepa autocomplementada WRΔ-Y posee un mayor contenido de ergosterol que la cepa mutante, no obstante, se observa un gran aumento en lanosterol y 4-metil-episterol. No resulta claro el motivo por el cual se dio este gran aumento en estas especies, pero de algún modo el sistema parecería estar fuertemente activado en la síntesis de estos lípidos. Al evaluar las cepas complementadas con las reductasas *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C se observa una reversión parcial del fenotipo.

Los resultados obtenidos en este ensayo presentan más interrogantes que respuestas. En primer lugar, se observa una disminución en los valores de ergosterol de todas levaduras que sobreexpresan reductasas respecto a la cepa mutante WRΔ. No obstante, esto podría explicarse por un aumento porcentual de otras especies intermediarias. Si se compara las cepas W303-1B y la cepa WRΔ, resulta sencillo observar un elevado valor de ergosterol en la cepa salvaje, y un menor valor en la cepa mutante. Por el contrario, el contenido de lanosterol de W303-1B es menor que el de WRΔ, tal como se esperaría. Sin embargo, al observar las levaduras complementadas surgen controversias. Todas las levaduras mutantes complementadas revelan un elevado valor porcentual de lanosterol, y un bajo valor de ergosterol. Sin embargo estos resultados podrían explicarse por las variaciones en el contenido de los intermediarios.

Se observa un marcado aumento en el porcentaje de escualeno en las levaduras WRΔ-A. Este incremento también puede ser apreciado en las levaduras WRΔ-B y WRΔ-C. Por el contrario, las levaduras WRΔ-Y presentan una disminución en este valor. Considerando la figura I18, una disminución en el contenido de escualeno hubiese sido esperable, si es que la reductasa participa en la reacción catalizada por ERG1. Este parecería ser el caso para NCP1, y explicaría el

valor encontrado en WRΔ-Y. No obstante resulta un interrogante la acumulación de escualeno en las levaduras que expresan las reductasas de *T. cruzi*.

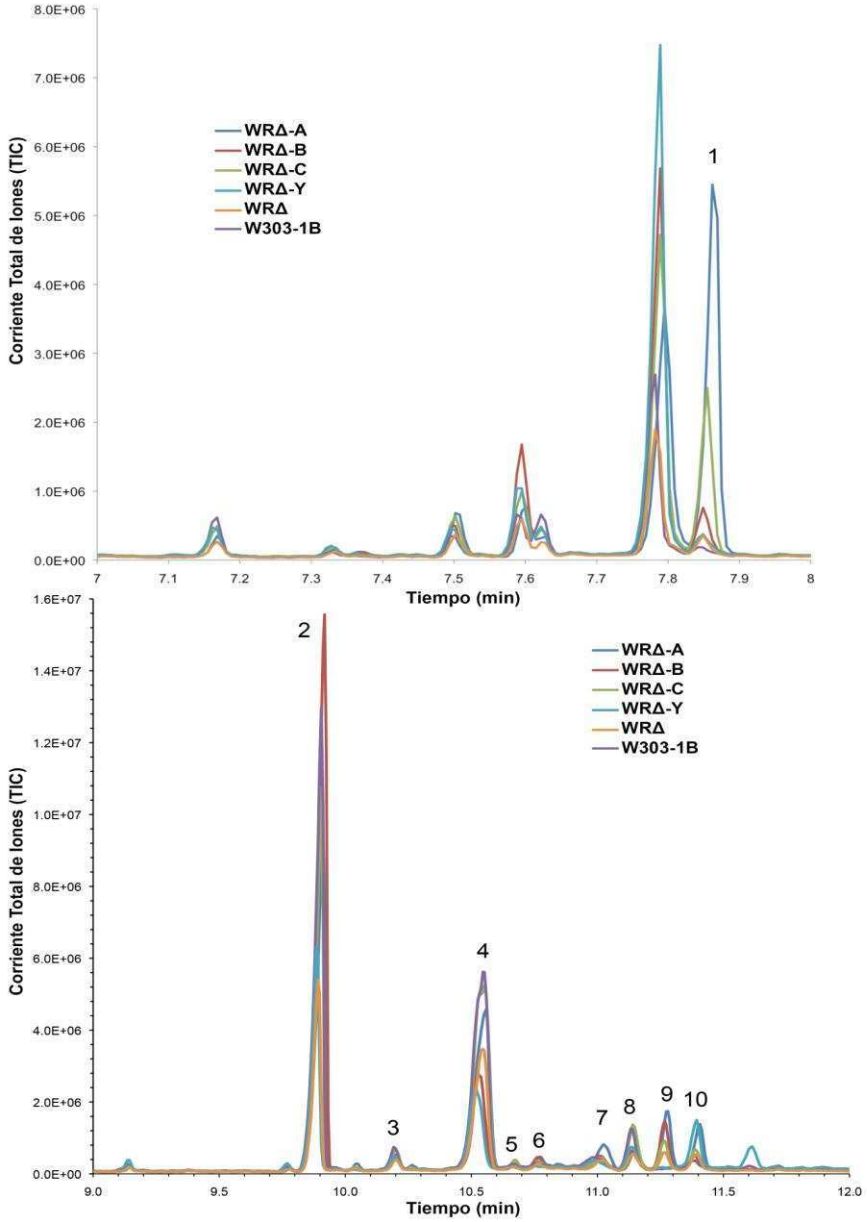


Figura R8. *Separación de la fracción de esteroles de las distintas cepas de levadura por cromatografía gaseosa*. Los cromatogramas se obtuvieron por GC/MS acoplada. Las cepas salvaje (W303-1B), mutante deficiente (WRΔ) y complementadas (WRΔ-Y, WRΔ-A, WRΔ-B, WRΔ-C) se distinguen en el gráfico por el color. Los picos identificados con número son: (1) Escualeno; (2) Colesterol (agregado a la muestra como estándar interno); (3) Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3β-ol; (4) Ergosterol; (5) Fecosterol; (6) Ergosta-5,7-dienol; (7) Episterol; (8) C4-dimetil (?); (9) C4-hidroxi (?); (10) Lanosterol. Las características del equipo y las condiciones de la separación se describen en Materiales y Métodos. Los cromatogramas individuales de cada cepa, al igual que las espectrometrías de masa de cada pico se encuentran en la sección Anexo.

Las especies C4-dimetil(?) y C4-hidroxi(?) no fueron identificadas con precisión, pero se trata de especies que se encuentran post-lanosterol. Algunas de las levaduras complementadas parecen mostrar un aumento en estas especies. El pasaje del ergosta-5,7-dienol al ergosta-5,7,22,24-tetraen-3β-ol es catalizado por ERG5. Esta enzima sería dependiente de NCP1.

Tal como se puede observar en la Tabla R3, el valor para la primera especie resulta despreciable en las levaduras W303-1B y en las WRΔ-Y y WRΔ-C, observando un fuerte aumento de la siguiente especie. Este resultado sugeriría una participación de la reductasa en esta reacción.

	WRΔ-A	WRΔ-B	WRΔ-C	WRΔ-Y	W303-1B	WRΔ
Escualeno	18.2	4.8	8.3	0.9	1.7	1.9
Lanosterol	8.8	5.2	4.4	9.9	1.1	6.7
C4-dimetil(?)	4.2	7.4	9.5	9.8	9.8	7.2
C4-hidroxi(?)	10.7	15.9	5.8	21.5	2.1	6.9
Fecosterol	1.1	1.4	1.9	0.7	0.6	1.1
Episterol	7.3	7.2	3.9	5.3	4.9	5.9
Ergosta-5,7-dienol	1.9	5.6	0	0	0.6	3.4
Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3β-ol	2.3	4.1	3.6	5.6	5.1	3.3
Ergosterol	45.5	48.5	62.5	46.4	74.1	63.5

Tabla R3. *Porcentajes de lipídicos en las levaduras.* Las especies señaladas con (?) no lograron ser identificadas con precisión. (Valores expresados en porcentaje sobre el total de esteroles cuantificados)

Los resultados obtenidos en este experimento no resultan del todo convincentes, debido a que no se observa una reversión absoluta de los contenidos lipídicos de la cepa mutante a la cepa salvaje en las levaduras complementadas. Esto ni siquiera se observa en la cepa autocomplementada, dificultando aún más su comprensión. Un abordaje desde la perspectiva de flujos metabólicos, en el que se considere las concentraciones de cada especie y cada enzima, podría llegar a ser más esclarecedor.

3.3. Generación de parásitos sobreexpresantes para las tres formas de *Tc*CPRs

Con el propósito de profundizar la investigación sobre el rol que cumplen las reductasas del citocromo P450 de *T. cruzi*, se recurrió a una herramienta de ingeniería genética frecuentemente utilizada para éste parásito: la sobreexpresión. Epimastigotes de la cepa CL Brener fueron transformados utilizando el vector de expresión pTREX, con las secuencias codificantes para *Tc*CPR-A, *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C respectivamente. Tal como se había estudiado anteriormente, la sobreexpresión de *Tc*CPR-B otorgaba una mayor resistencia al benznidazol [1]. Sin embargo, dado que el sistema de Citocromo P450 participa también en procesos biosintéticos, se decidió evaluar la participación de dichas proteínas en la biosíntesis de esteroles.

No se logró obtener parásitos transformados establemente con la construcción pTREX-*Tc*CPR-A aún después de numerosos intentos.

La obtención de los parásitos que sobreexpresan establemente *Tc*CPR-B ya fue descripta en la tesis de licenciatura "Metabolismo redox en *Trypanosoma cruzi*. Citocromo P450 reductasas", y en el trabajo "Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi*. Suggested role on drug resistance" [1].

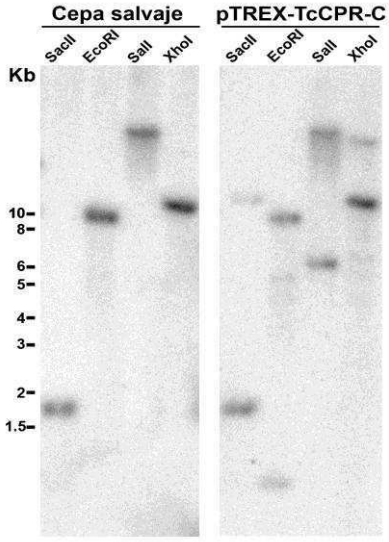


Figura R9. Southern blot realizado para demostrar la presencia de al menos una banda extra en el ADN genómico de los parásitos transfectados con *Tc*CPR-C. Se utilizaron enzimas de restricción que no cortan dentro de la zona de hibridación de la sondas radioactiva.

Los parásitos que sobreexpresan *Tc*CPR-C fueron obtenidos luego de 60 días de selección con el antibiótico G418. Esto pudo comprobarse mediante Southern blot, Northern blot y Western blot tal como se observa en la figuras correspondientes. En la figura R9 la banda extra corresponde a una segunda copia del gen *Tc*CPR-C, indicando la integración exitosa de la misma en el genoma del parásito.

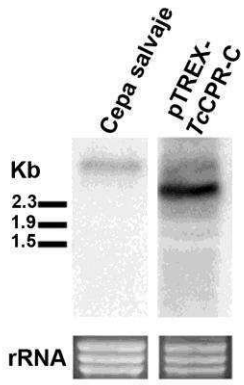


Figura R10. Northern blot que revela la expresión del mensajero correspondiente a *Tc*CPR-C sobreexpresado. Los pesos moleculares fueron determinados a partir de la fotografía del gel antes de transferir, donde se observan los ARN ribosomales.

En la figura R10, puede verse claramente un aumento en el nivel de mensajero correspondiente a *Tc*CPR-C, con un concomitante aumento en los niveles de expresión de la proteína (Figura R11).

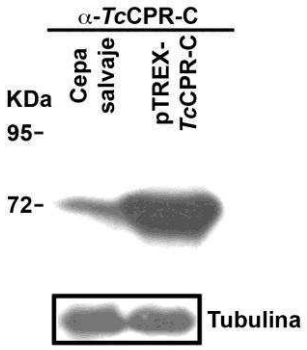


Figura R11. *Sobreexpresión de la proteína TcCPR determinada por Western blot*. La banda correspondiente a *Tc*CPR se reveló indistintamente con anti-His-tag o con el anticuerpo contra la proteína recombinante.

La sobreexpresión de *Tc*CPR-C incrementó aproximadamente tres veces la actividad específica de la enzima (Figura R11). Los parásitos que sobreexpresan tanto *Tc*CPR-B (trabajo previo), como *Tc*CPR-C, no presentaron diferencias significativas en sus curvas de crecimiento comparados con la cepa salvaje.

Actividad específica de Citocromo c reductasa (nmol/min/mg)	
Cepa salvaje	**pTREX-*Tc*CPR-C**
116,5 ± 12,11	301,37 ± 64,93

Tabla R4. *Medición de actividad Citocromo c reductasa en extractos de parásitos que sobreexpresan TcCPR-C.* La transferencia de electrones al citocromo c en presencia de NADPH es una forma de medir actividad reductasa *in vitro*.

3.4. La sobreexpresión de *Tc*CPR-A resulta letal

A diferencia de los epimastigotes salvajes sin transformar, que resultaban inviables luego de 15 días de selección con antibióticos, los parásitos transformados con la construcción pTREX-*Tc*CPR-A sobrevivieron aproximadamente 30 días de selección. Eso permitió estudiar el fenotipo de las células transformadas con la construcción pTREX-*Tc*CPR-A. El momento elegido fue 20 días después de la transformación, para demostrar una correlación entre la sobreexpresión de esta enzima y los cambios fenotípicos observados en las células antes de la declinación del cultivo.

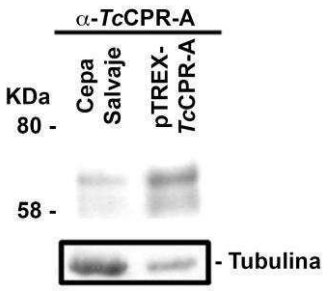


Figura R12. Western blot. Extractos proteicos de parásitos transfectados con *Tc*CPR-A se revelan con el antisuero contra la proteína recombinante.

En la figura R12 se observa un mayor nivel de expresión de la proteína *Tc*CPR-A en extractos de epimastigotes pTREX-*Tc*CPR-A, mediante la técnica de Western blot. Este resultado concuerda con un aumento de la actividad específica de la enzima en el cultivo de parásitos de aproximadamente tres veces (Tabla R6). Se puede concluir por lo tanto, que 20 días luego de la transformación con el vector pTREX-*Tc*CPR-A, existe al menos una población de parásitos que sobreexpresan la enzima.

Actividad específica de Citocromo c reductasa (nmol/min/mg)	
Cepa salvaje	**pTREX-*Tc*CPR-A**
217,20 ± 29,94	662,94 ± 37,50

Tabla R6. *Medición de actividad Citocromo c reductasa en extractos de parásitos que sobreexpresan TcCPR-A.*

Mediante citometría de flujo se determinó una disminución del 70% aproximadamente en la población G1 de los parásitos pTREX-*Tc*CPR-A. Esta disminución también se pudo apreciar en la fase S. Por el contrario, el porcentaje de la población G2 y las células con un contenido de ADN con más de cuatro C, aumentó de 17,2% y 1,8% respectivamente en la cepa salvaje (WT) a 51,7% y 17,5% en las células pTREX-*Tc*CPR-A (Figura R13).

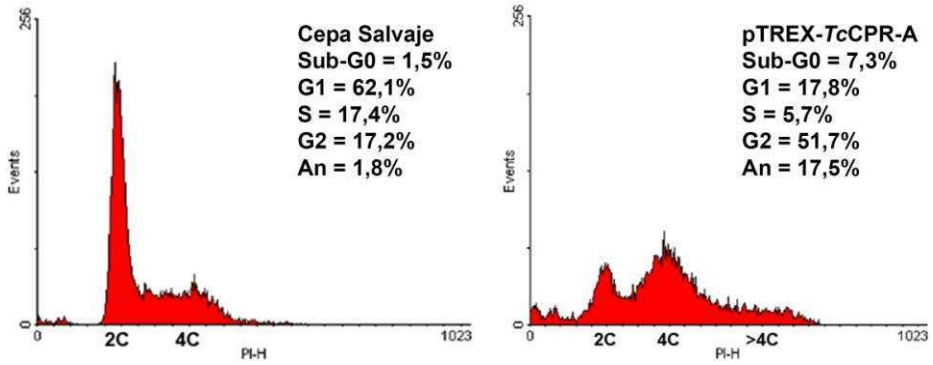


Figura R13. Análisis por citometría de flujo de parásitos salvajes (WT) y transformados (pTREX-*Tc*CPR-A) 20 días después de la transfección. Las ploidías de las poblaciones se indican en el gráfico. **An** = aneuploidía. En el inserto de cada gráfico figura el porcentaje de células en cada estadío del ciclo celular.

Aunque a los 20 días la selección de los parásitos transgénicos todavía es incompleta, los datos observados en este experimento sugieren que la sobreexpresión de *Tc*CPR-A lleva a un arresto en la citocinesis. El fenómeno observado se debe probablemente a la sobreexpresión de *Tc*CPR-A, en forma directa o indirecta, ya que los parásitos no transfectados utilizados como control se encontraban muertos en ese punto.

Resultan de particular interés las observaciones realizadas mediante las técnicas de microscopía electrónica (figura R14) de transmisión y microscopía de barrido (figura R15) pudiendo distinguirse morfologías anormales y alteraciones ultraestructurales en las células. Los parásitos que sobreexpresan *Tc*CPR-A presentaron una morfología redondeada, con más de un flagelo y núcleo. Más aún, en la membrana de estas células se evidencian claramente surcos o hendiduras y extensiones citoplasmáticas.

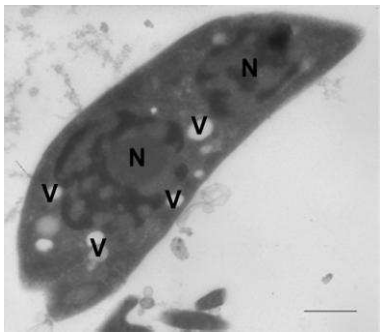


Figura R14. *Microscopía electrónica de transmisión de epimastigotes.* Luego de 20 días de ser transfectados con pTREX *Tc*CPR-A, los epimastigotes presentan dos núcleos (N) y varias vacuolas (V).

En la Figura R15 se observan notoriamente parásitos con forma redondeada y rugosos, similares a los advertidos en el control sin transformar, junto a parásitos con hendiduras en la membrana. El fenotipo rugoso puede atribuirse al tratamiento con el antibiótico utilizado para la selección. Ambos fenotipos pueden ser observados en la figura R15 F. Esta figura sugiere que parásitos que no incorporaron el plásmido en la electroporación mueren antes que los que presentan el fenotipo de hendiduras. Por lo tanto, este fenotipo puede atribuirse a la sobreexpresión de *Tc*CPR-A.

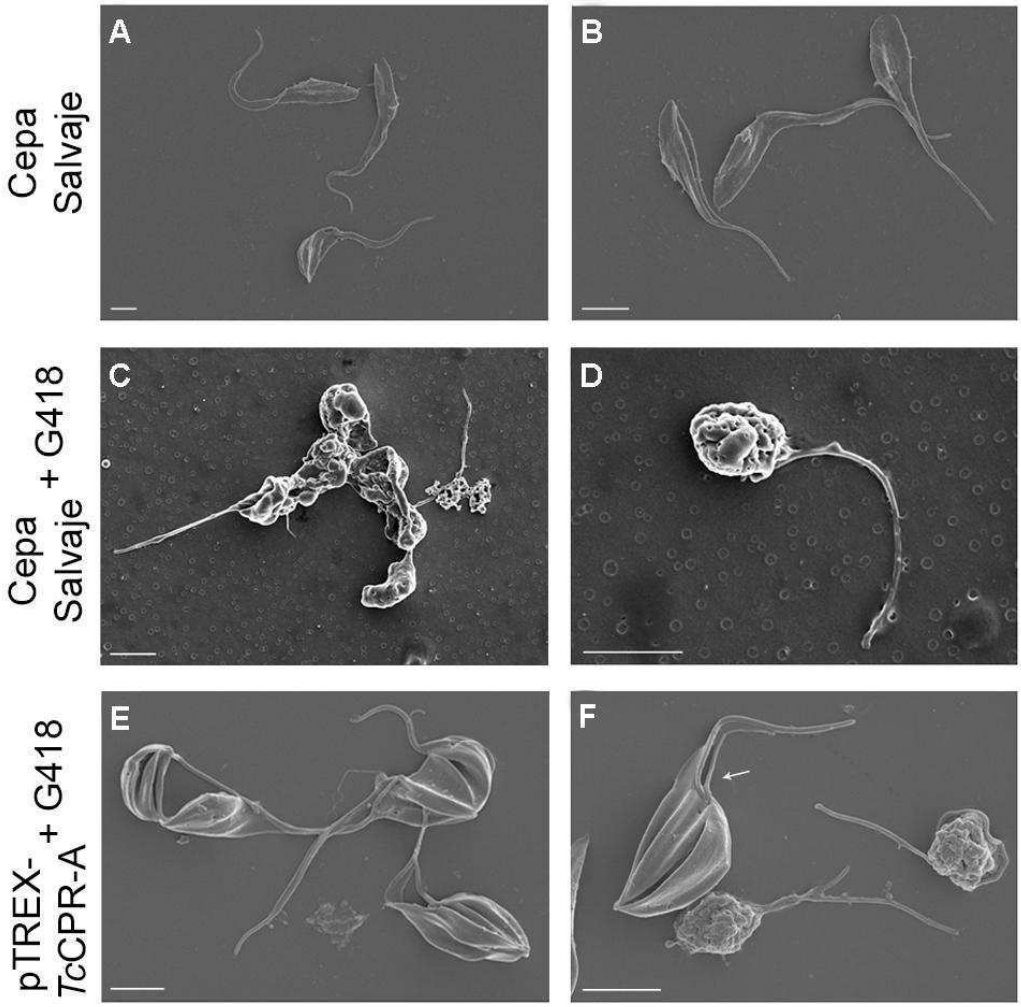


Figura R15. Microscopía electrónica de barrido para observar epimastigotes salvajes (A-B), salvajes tratados con antibiótico (C-D) durante 7 días, y epimastigotes pTREX-*Tc*CPR-A 20 días después de la transfección (E-F). En el Anexo se adjuntan imágenes correspondientes a los parásitos pTREX-*Tc*CPR-A con mayor resolución.

Mediante microscopía de fluorescencia, tiñendo con DAPI el ADN de los epimastigotes y el flagelo con el anticuerpo "anti-paraflagelar rod", se puede observar la presencia de parásitos con múltiples flagelos en los que no se logra distinguir el número de kinetoplastos (Figura R16).

Los datos obtenidos de estos experimentos indican que la sobreexpresión de *Tc*CPR-A provoca múltiples alteraciones en el fenotipo del parásito. No resulta evidente si estas alteraciones se deben directamente a funciones específicas de la actividad enzimática, o si se trata de consecuencias indirectas por desbalances metabólicos sufridos por el parásito. Un alto consumo de NADPH en el citosol,

podría desplegar efectos pleiotrópicos debidos principalmente a la ausencia de poder reductor.

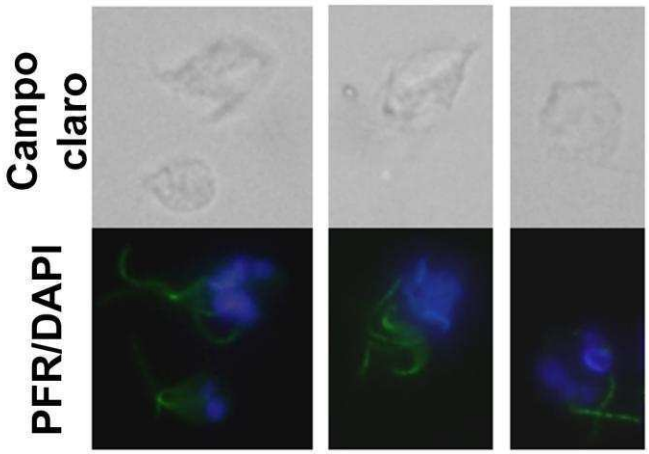


Figura R16. *Epimastigotes pTREX-TcCPR-A fijados con paraformaldehido 4% se examinaron al microscopio de campo claro.* El ADN se tiñó con DAPI y el flagelo con anticuerpo contra la proteína PFR revelado con el anticuerpo secundario conjugado a ALEXA Fluor 488 (verde).

En el trabajo previo realizado sobre *Tc*CPR-A [1], se ha demostrado la identidad de secuencia de esta enzima con la enzima NDOR1 de humanos y con la Tah18 de levaduras. Existe una gran divergencia de hipótesis respecto a la función que cumplen éstas dos proteínas. La proteína NDOR (NR1) se expresa en altos niveles en líneas celulares cancerosas [94]. Olteanu y cols. han propuesto la participación de NR1 en la síntesis de metionina [95]. Estudios realizados por Vernis y cols. en levaduras [96] sugieren la participación de la proteína TAH18, ortóloga de *Tc*CPR-A en procesos de muerte celular. Mediante experimentos de estrés y sobreexpresión en levaduras, se demostró que la proteína TAH18 era translocada a la mitocondria, iniciando un proceso de muerte celular que podría ser descripto como apoptótico. Este resultado es congruente con la imposibilidad de obtener parásitos que sobreexpresen establemente esta proteína. Posteriormente, Netz y cols. [97] plantearon un rol diferente para TAH18. Los autores propusieron la participación de esta reductasa en la biogénesis de grupos Fe-S de proteínas, a través de la proteína Dre2. En la Figura R17, se muestra esquemáticamente el modelo de acción propuesto por los autores.

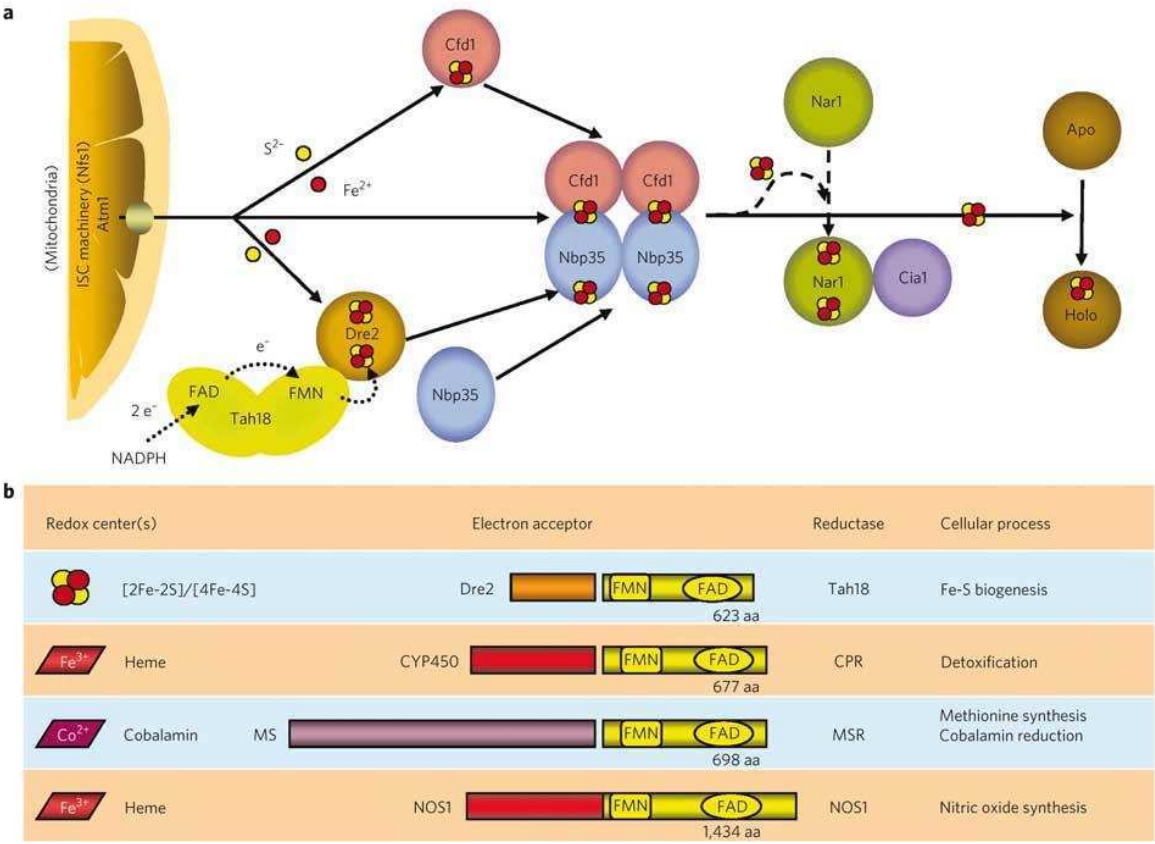


Figura R17. Modelo de acción propuesto por Netz y cols. para la reductasa TAH18 [97].

En el trabajo de Nishimura y colaboradores [98], los autores proponen un rol totalmente diferente a los planteados por los anteriores. El papel que adjudican a la proteína Tah18 es la síntesis de óxido nítrico (NO). Los autores han demostrado que a pesar de no encontrarse un gen ortólogo de la NOS (óxido nítrico sintasa), las levaduras que sobreexpresan TAH18, que carece del dominio oxigenasa de las NOS canónicas, son capaces de producir mayores niveles de NO. La ausencia de una guanilato ciclasa en el genoma de la levadura podría indicar que la función que cumple el NO en las levaduras no estaría vinculada con un proceso de transducción de señales (aunque no se descarta esta posibilidad), sino con un mecanismo de resistencia a estrés. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) interactúan irreversiblemente con los residuos de L-cisteína, mientras que la interacción del NO es reversible, de este modo protegiendo del daño a las proteínas. Más aún, proponen que este mecanismo de protección podría ser un interesante blanco terapéutico.

Si bien la función que desempeña esta proteína dentro del parásito resulta aún incierta dado la discrepancia entre los trabajos publicados hasta la fecha, todo sugiere una participación importante en la regulación de la respuesta al estrés.

3.5. *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C participan en la biosíntesis de esteroles en *T. cruzi*

Diversos trabajos han demostrado la existencia y participación de CYP y otras moléculas aceptoras de electrones en la biosíntesis de esteroles en tripanosomátidos y organismos relacionados [99]. No obstante, y tal como se mencionara anteriormente, en la gran mayoría de organismos existe una única CPR. Aceptando que el gen ortólogo de *Tc*CPR-A se trata de NDOR en humanos y Tah18 en levaduras, cabe preguntarse si *Tc*CPR-B y/o *Tc*CPR-C participan en procesos dependientes de CPR, y el porqué de esta aparente redundancia génica. Se decidió entonces estudiar un posible rol de las *Tc*CPRs en la biosíntesis de esteroles.

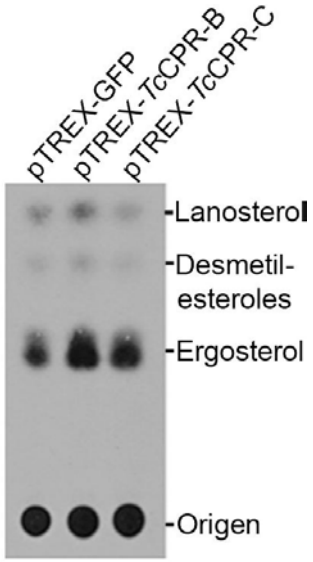


Figura R18. Cromatografía en capa delgada de los esteroles totales marcados con ^{3}H extraídos de epimastigotes pTREX-GFP, pTREX-*Tc*CPR-B y pTREX-*Tc*CPR-C, crecidos en ^{3}H-mevalonolactona.

Un mismo número de células de cultivos exponenciales de las líneas transgénicas de parásitos obtenidas pTREX-*Tc*CPR-B, pTREX-*Tc*CPR-C y pTREX-

GFP (este último utilizado como control) fueron incubadas con mevalonolactona tritiada ([^{3}H]-mevalonolactona) durante 0,5, 1 y 6 horas. La mevalonolactona es un precursor lipídico de la síntesis de esteroles por lo que transcurrido un tiempo, se esperaría encontrar esteroles marcados radioactivamente. Los lípidos neutros fueron extraídos y sometidos a cromatografía de capa delgada en gel de sílica. Sólo a las 6 h de incubación con [^{3}H]-mevalonolactona se pudo visualizar mediante autorradiografía los puntos correspondientes a ergosterol (junto a análogos estrechamente relacionados), desmetil-esteroles y lanosterol (Figura R18).

Las manchas correspondientes a estos lípidos fueron cuantificadas utilizando un contador de centelleo. Dado que la CPR aporta los electrones al CYP51, responsable de la demetilación del lanosterol, se puede esperar una disminución en la cantidad de lanosterol y un aumento en los niveles de ergosterol. Se decidió calcular el cociente de ergosterol sobre lanosterol (Erg/Lan), como una medida de esta actividad. Los parásitos pTREX-*Tc*CPR-B y pTREX-*Tc*CPR-C mostraron un incremento de 1.8 y 2.2 veces mayor en la biosíntesis de ergosterol, respectivamente, en relación al control pTREX-GFP (Figura R19). El aumento de ergosterol y el contenido de esteroles demetilados fue de aproximadamente 21% y 24%, respectivamente.

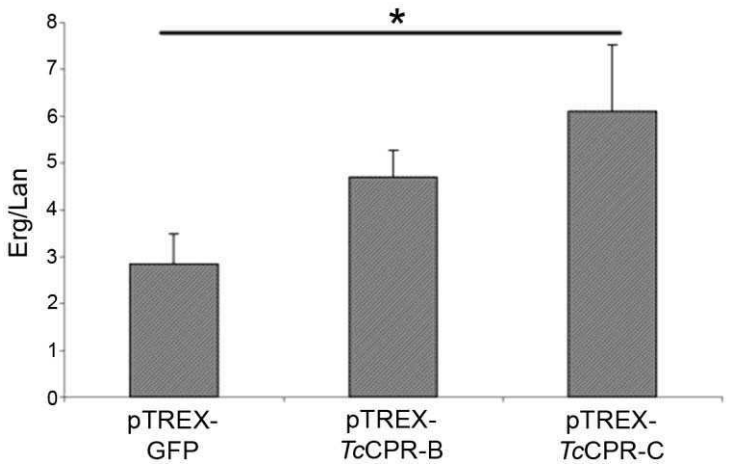


Figura R19. El incremento de la cantidad de ergosterol normalizado con lanosterol se compara en el gráfico para las tres cepas. Se muestran los valores promedio de tres determinaciones independientes ± DS. $P \leq 0.05$.

Se puede concluir entonces que la sobreexpresión de *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C en epimastigotes de *T. cruzi* provoca un aumento en la biosíntesis de ergosterol.

3.6. Análisis del estado redox

Habiéndose demostrado que la sobreexpresión de *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C provocan un aumento en la biosíntesis de ergosterol en los epimastigotes de *T. cruzi*, se decidió investigar en qué medida la sobreexpresión de estas proteínas afectaban el estado redox del parásito. Para ello, se evaluó el coeficiente $NADP^+$/NADPH en los parásitos pTREX-*Tc*CPR-B y pTREX- *Tc*CPR-C, comparados con el control pTREX-GFP. Los coeficientes obtenidos para el cociente $NADP^+$/NADPH, la suma de $NADP^+$ más NADPH, y las concentraciones individuales de nicotinamina adenina dinucleótido se observan en la tabla R7.

	$NADP^+$	NADPH	$NADP^+$+NADPH	$NADP^+$/NADPH
pTREX-GFP	0.566 ± 0.000	1.838 ± 0.200	2.404 ± 0.200	0.308 ± 0.033
pTREX-*Tc*CPR-B	0.689 ± 0.000	1.291 ± 0.122	1.980 ± 0.122	0.533 ± 0.050 (*)
pTREX-*Tc*CPR-C	1.487 ± 0.162	2.059 ± 0.000	3.547 ± 0.162	0.722 ± 0.079 (*)

Tabla R7. *Balance $NADP^+$/NADPH en parásitos pTREX-GFP, pTREX-TcCPR-B y pTREX-TcCPR-C.* Los nucleótidos de piridina están expresados como □mol/10^8 cells. Los valores obtenidos representan los promedios ± S.D. (n=3). (*) Diferencia significativa respecto a pTREX-GFP ($p<0.05$).

Se observa que los parásitos que sobreexpresan *Tc*CPR-C poseen un equilibrio redox en distinto estado de equilibrio, mostrando niveles hasta dos veces mayor en la proporción $NADP^+$/NADPH (Figura R20). Se observa también un aumento en los niveles totales de $NADP^+$, indicando probablemente una síntesis *de novo* del dinucléotido en los parásitos. Los parásitos que sobreexpresan *Tc*CPR-B mostraron también un aumento en los valores de $NADP^+$, respecto del control pTREX-GFP, y una ligera disminución en los valores de NADPH. Estos valores resultan esperables ya que un aumento en la actividad de las enzimas implica un aumento en el consumo de NADPH, debido a la mayor transferencia de electrones desde el NADPH hacia él o los posibles blancos de estas enzimas. Resulta interesante observar que a pesar de este elevado consumo, los parásitos parecen regular diferencialmente su homeostasis para *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C, dada la

variación de valores entre los transgénicos. Esta variación podría ser un indicio de una diferente cinética enzimática o bien de una localización compartamental distinta.

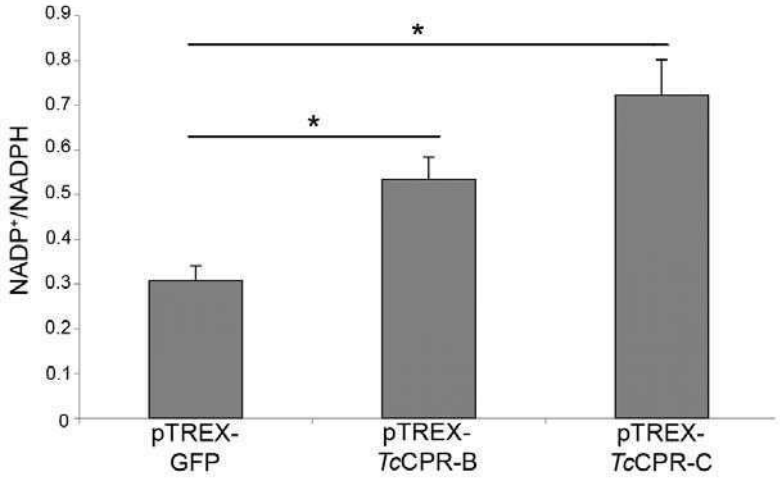


Figura R20. *Relación de concentración de nucleótidos de piridin fosfato en las tres cepas*

3.7. Los parásitos que sobreexpresan *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C poseen un mayor orden de membrana

Resulta lógico pensar que si los parásitos transgénicos poseen un mayor contenido de ergosterol total, éste pueda influir en la estructura de su membrana, y en la función biológica de la misma. Una de las primeras consecuencias que tiene sobre una membrana un aumento en el contenido de ergosterol será la fluidez de la misma. Existen trabajos biofísicos tendientes a demostrar que existe una mayor compactación de una membrana con alto contenido de ergosterol (o colesterol) frente a una con lanosterol [100]. Esta mayor compactación se traduce en una menor fluidez de membrana, con consecuencias en los procesos dependientes de membrana, tales como la endocitosis. A fin de evaluar ésta hipótesis, se utilizó la sonda fluorescente de membrana Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetilamina-naftaleno) [101,102]. Mediante esta sonda, se puede evaluar el estado de polarización de la membrana plasmática, lo que indica una medida relativa del orden de membrana.

Para ello, se calcula un valor de GP, de las siglas en inglés para "Polarización General".

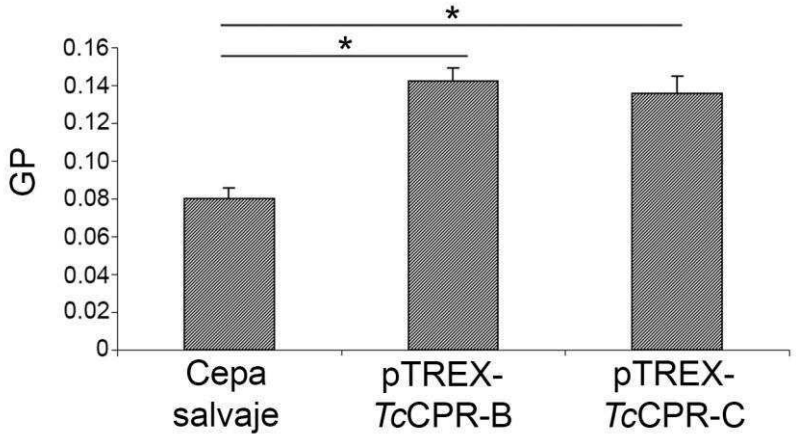


Figura R21. Epimastigotes que sobreexpresan *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C y su cepa control se marcaron con la sonda fluorescente Laurdan y se analizaron por espectrofotometría de fluorescencia. El valor GP (polarización generalizada) es una medida relativa del ordenamiento de la membrana (ver Materiales y Métodos).

Tal como era esperado, el incremento en los niveles de ergosterol debidos a la sobreexpresión de *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C, conducen a un aumento en el orden de membrana como se denota en el valor de GP para cada una de ellas (Figura R21). La viabilidad de las células luego de estos experimentos pudo ser comprobada por microscopía de contraste de fases.

Se decidió evaluar la endocitosis de fase fluida en los parásitos transgénicos mediante el uso de la sonda FITC-BSA según se describió en Materiales y Métodos y se analizó y cuantificó por citometría de flujo. Las células fueron incubadas a 28 °C durante 15 y 30 min o a 0 °C durante 15 minutos (control de unión, o "binding"). Este control permite detectar la sonda unida a la membrana, pero que no fue endocitada.

Los datos obtenidos fueron graficados en primer lugar por densidad poblacional, para luego analizar los datos correspondientes a la mayor densidad celular. Mediante el análisis de los gráficos obtenidos, resulta evidente que las células trasngénicas necesitan aproximadamente el doble de tiempo para tener un patrón de distribución de eventos similares a los de la población control (salvaje) (Figura R22).

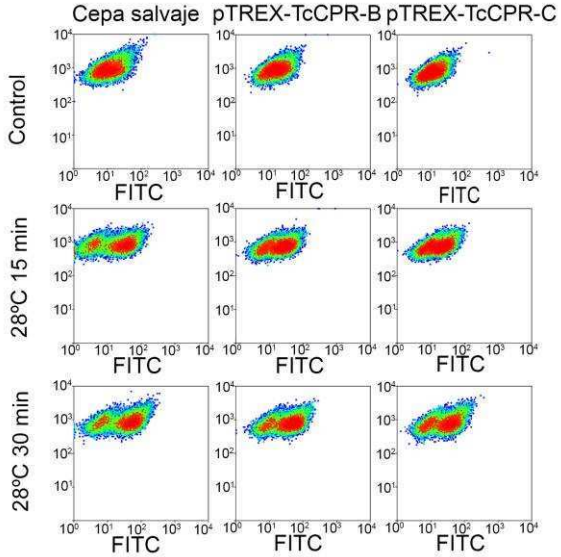


Figura R22. *Endocitosis de fase fluida.* La endocitosis de la sonda FITC-BSA fue analizada y cuantificada por citometría de flujo.

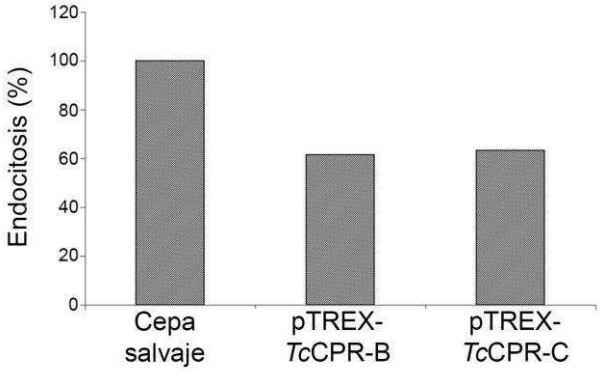


Figura R23. *Endocitosis en epimastigotes.* Análisis del porcentaje de endocitosis de las poblaciones comparadas con el control (se considera el área roja de la Figura R22). Se muestran los valores promedio ± DS. $p \leq 0.05$

Estos resultados se correlacionan con un valor inferior medio de fluorescencia (al restar el valor obtenido en el control de "binding") en las células que sobreexpresan las CPRs. Concordantemente con los resultados descriptos, se pudo calcular una inhibición aproximada del 40 % en la endocitosis de fase fluida para ambas líneas transgénicas

Los resultados obtenidos por este método se presentan en la Figura R23 analizados como un porcentaje de las células transfectadas respecto del control, considerando solo el área de mayor densidad celular.

3.8. Interacción de las reductasas con el CYP51

Se decidió estudiar si las CPRs de *T. cruzi* eran capaces de interactuar con el CYP51 *in vivo*. Mediante microscopía confocal utilizando los anticuerpos α-*Tc*CPRs, y el anticuerpo específico α-CYP51 de *T. cruzi*, se evalúo si estas proteínas poseen una misma localización en los parásitos. En la figura R24 se observan epimastigotes revelados con estos anticuerpos. El patrón y distribución de la proteína CYP51 en epimastigotes se encuentra preponderantemente alrededor del núcleo, por lo que podría asociarse al RE.

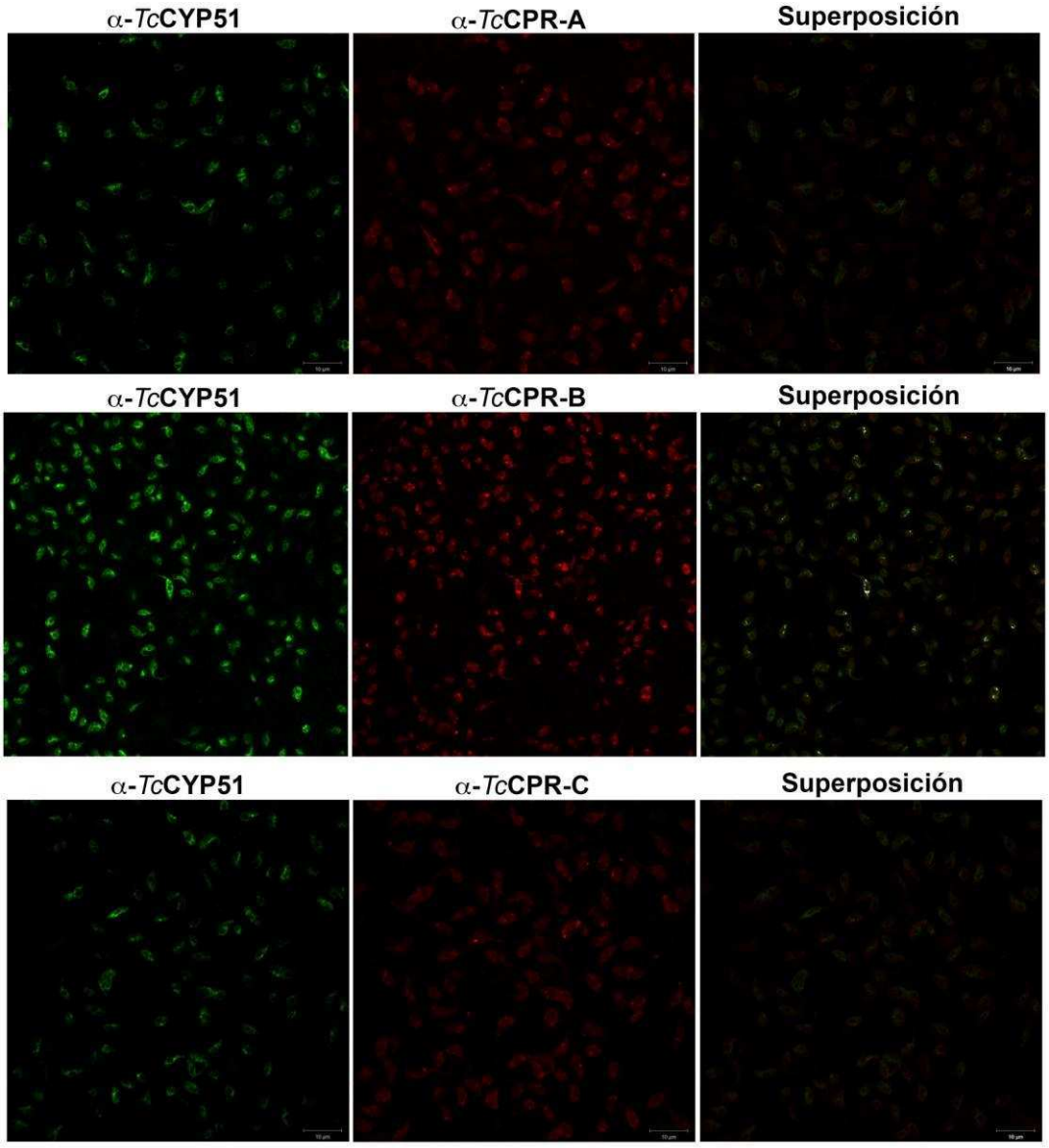


Figura R24. *Estudio de la co-localización de las TcCPRs con el CYP51 de T. cruzi mediante microscopía confocal.*

Debido a la actividad tripanocida de inhibidores de la síntesis de lípidos en amastigotes, en los que se piensa que el CYP51 es el blanco, resulta de particular interés identificar la proteína que interactúa cediendo sus electrones en este estadío. Se decidió estudiar si existe una co-localización de las *Tc*CPRs con el CYP51 en amastigotes intracelulares. En la figura R25 se observan células Vero infectadas con amastigotes, reveladas mediante inmunofluorescencia confocal con α-CYP51 α-*Tc*CPR-A. Se puede distinguir una co-localización parcial de estas proteínas, con un patrón de distribución puntillado, tales como vesículas. A partir de los resultados anteriores, esta interacción parece poco probable, no obstante no puede ser descartada. Si bien una de las posibilidades es que estas vesículas se trataran de inclusiones lipídicas, no fue posible co-localizarlas mediante tinción con el marcador de esteroles Rojo Nilo.

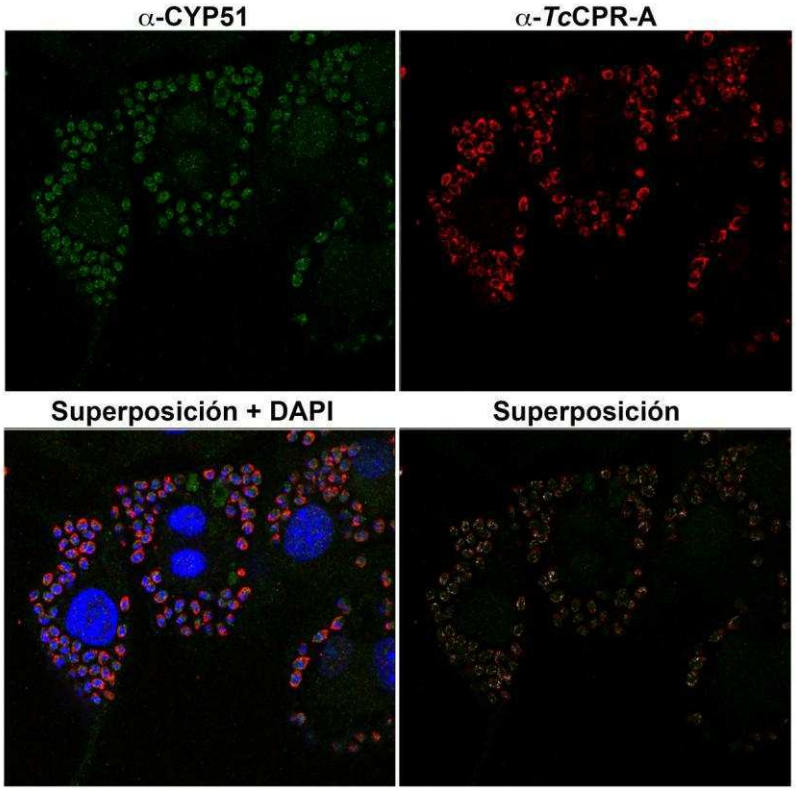


Figura R25. *Estudio de la co-localización de TcCPR-A con CYP51 en amastigotes de T. cruzi mediante microscopía confocal.*

En la figura R26 y R27 se observan células Vero superinfectadas con amastigotes, y reveladas con los anticuerpos α-CYP51 y con α-*Tc*CPR-B y α-*Tc*CPR-B respectivamente.

La señal de fluorescencia obtenida en este experimento utilizando los anticuerpos anti-*Tc*CPRs no fue los suficientemente intensa como para poder apreciar una localización precisa de estas proteínas.

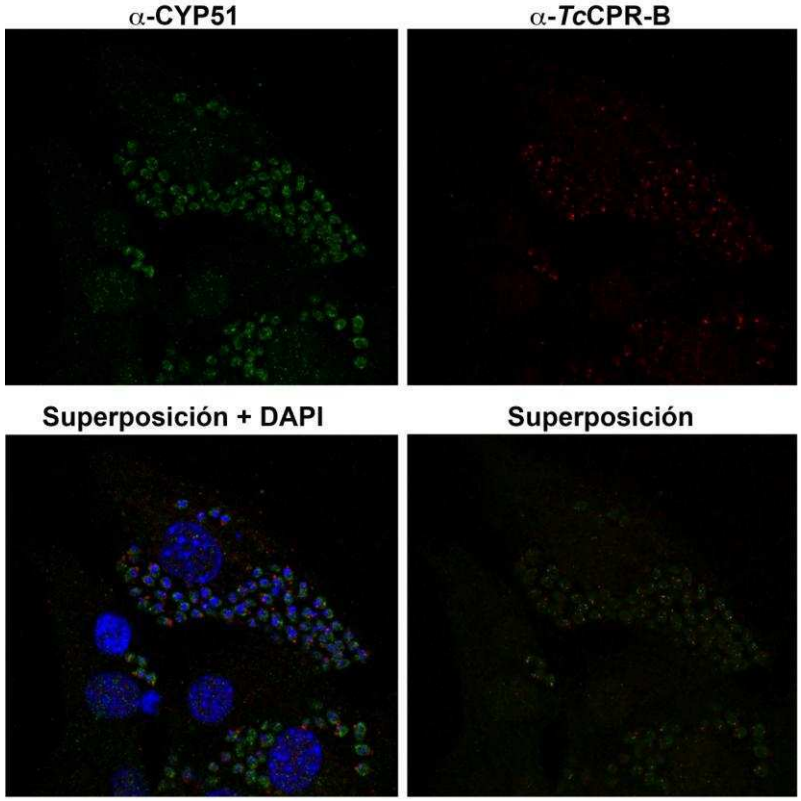


Figura R26. *Estudio de la co-localización de TcCPR-B con CYP51 en amastigotes de T. cruzi mediante microscopía confocal.*

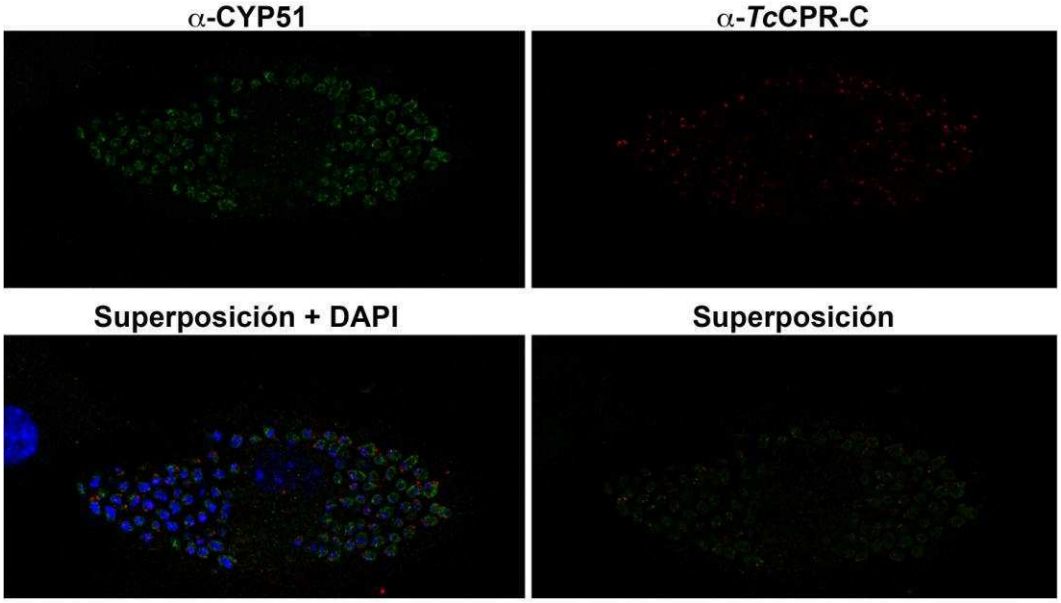


Figura R27. *Estudio de la co-localización de TcCPR-C con CYP51 en amastigotes de T. cruzi mediante microscopía confocal.*

Los resultados obtenidos en estos ensayos para las proteínas *Tc*CPR-A, -B y -C no son concluyentes. La distribución de *Tc*CPR-A en epimastigotes resultó nuevamente elusiva, observándose un patrón puntillado en el citoplasma. La proteína *Tc*CPR-B se localiza principalmente en la región posterior del parásito, al igual que se había observado anteriormente. Tal como se visualiza en la figura R24, algunos epimastigotes muestran una co-localización parcial de la proteína *Tc*CPR-B con el CYP51, en estructuras semejantes al reservosoma. La presencia de CYP51 en reservosomas de *T. cruzi* ha sido reportada anteriormente por Lepesheva y cols. [35]. Las imágenes obtenidas para *Tc*CPR-C no resultaron de calidad adecuada debido a la baja intensidad y señal para el fluoróforo utilizado. Estos mismos inconvenientes fueron encontrados en el experimento con amastigotes. Es posible que debido al transporte y manipulación de los anticuerpos utilizados, éstos hallan sufrido algún tipo de deterioro, lo que explicaría la perdida de especificidad e intensidad de los mismos.

Se intentó demostrar si esta interacción era posible mediante ensayos de co-(inmuno)precipitación. Se evalúo utilizando dos estrategias: fijando covalentemente la proteína purificada CYP51 o bien el anticuerpo α-CYP51 a una resina agarosa activada (mediante grupos funcionales de ester N-hidroxisuccinimida). Las resinas fueron luego incubadas con extractos de *T. cruzi* para las formas amastigote, tripomastigote y epimastigote. Luego de los lavados, los eluidos fueron evaluados mediante Western blot, revelando con los anticuerpos α-*Tc*CPRs y α-CYP51. Los ensayos, realizados en repetidas oportunidades, cambiando las condiciones de incubación y eluido, no resultaron positivos.

Si bien la interacción de las proteínas *Tc*CPR con el CYP51 no pudo ser demostrado mediante estos ensayos, ésta no puede ser descartada. Es posible que la calidad de los anticuerpos utilizados en estos experimentos no haya sido óptima, o bien la sensibilidad del ensayo de precipitación no sea suficiente para revelar esta interacción. Se desconoce además si la interacción física entre la reductasa y el citocromo P450 es lo suficientemente fuerte como para poder ser co-purificadas.

CONCLUSIÓN

4. CONCLUSIÓN

El ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* involucra la transición a través de diversos estadíos y morfologías, y el pasaje por variados entornos, tanto intracelulares como extracelulares. A fin de poder llevar a cabo este complejo ciclo y adaptarse a súbitos cambios, resulta imperioso para el párasito sostener una alta tasa de recambio de estructuras subcelulares y un mecanismo de defensa capaz de hacer frente a diversos tipos de estrés.

Las enzimas de la familia de citocromo P450 (CYP) son algunas de las enzimas más versátiles conocidas. Estas hemoproteínas realizan reacciones de óxido reducción (redox) e intervienen en una gran diversidad de rutas metabólicas, tanto biosintéticas como de detoxificación. Las múltiples reacciones catalizadas pueden ser tan variadas como oxigenaciones, demetilaciones, dealquilaciones y reducciones [103]. La citocromo P450 reductasa (CPR), flavoproteína que contiene los cofactores FAD y FMN, aporta a los CYP los electrones provenientes del NADPH, necesarios para reducir al oxígeno molecular y realizar sus actividades, mediante una cadena de transferencia de electrones [104]. Estudios previos han demostrado que las CPR actuarían como factor limitante en las reacciones mediadas por CYPs [105]. En animales se conoce una sola CPR responsable de la interacción con una diversidad de CYP [106], mientras que solo en plantas [107] y en *Dictyostelium discoideum* [108] se describió la presencia de múltiples isoformas.

El daño molecular causado por una gran diversidad de compuestos derivados del metabolismo o por xenobióticos puede llevar a la necrosis o apoptosis de las células. Para lograr subsistir, la célula debe enfrentar este daño. La detoxificación de estas moléculas reactivas es llevada a cabo por un proceso de biotransformación. Las enzimas del citocromo P450 son las principales responsables del metabolismo oxidativo de xenobióticos y fueron propuestas como mecanismo de resistencia a drogas en diversos organismos [109,110,111,112].

Otras de las funciones atribuidas a los CYP son las reacciones de biosíntesis de esteroles. Éstas conducen a la formación de colesterol en animales, y ergosterol y ácidos grasos en plantas, *fungi*, *protozoa*, y protistas [113]. Los esteroles son

componentes estructurales esenciales de las membranas plasmáticas y, sirven, asímismo como precursores que funcionan a nivel nanomolar regulando el ciclo celular y el desarrollo [114]. En *fungi*, el bloqueo de la producción de ergosterol resulta letal, afectando la citoquinesis, deteniendo el crecimiento celular, y eventualmente conduciendo al colapso de la membrana celular [115]. Diversos aspectos del metabolismo redox de *T. cruzi* difieren suficientemente del mamífero hospedador para ser considerados blancos terapéuticos en el desarrollo de nuevas drogas. Trabajos previos han demostrado la presencia de citocromos P450 en tripanosomátidos [62,116,117]. Generalmente, la biosíntesis del ergosterol ocurre en el retículo endoplasmático; sin embargo existe evidencia que sostiene que en kinetoplástidos la síntesis de esteroles podría también ocurrir en mitocondria u otras organelas. Más aún, la biosíntesis de lípidos en parásitos ha sido propuesta como blanco terapéutico en tratamientos quimioterapéuticos [79]. En particular, inhibidores específicos del CYP51 (lanosterol 14α-demetilasa) de *T. cruzi*, un citocromo P450 involucrado en el metabolismo del ergosterol, han demostrado poseer un potente efecto anti-tripanosomátido [118].

Previamente se ha logrado identificar tres genes que presentan una alta identidad de secuencia con las CPR, llamados *Tc*CPR-A, -B y -C [1]. La caracterización bioquímica de las mismas demostró que eran capaces de participar *in vitro* en procesos dependientes de CPR. La sobreexpresión de *Tc*CPR-B en epimastigotes otorgó un aumento en la resistencia a las drogas tripanocidas benznidazol y nifurtimox. Teniendo en cuenta el rol fundamental que las CPR juegan en las vías metabólicas mediadas por CYP antes mencionadas y la peculiaridad de la presencia de múltiples isoformas en el parásito, se decidió profundizar en la caracterización de estas enzimas.

En el presente trabajo se propone que, a diferencia del hospedador mamífero, al menos dos de las *Tc*CPRs, -B y -C podrían participar en biosíntesis de esteroles. *Tc*CPR-C, al igual que las CPR de otros organimos, presenta una localización subcelular en RE. Por el contrario, *Tc*CPR-B se localiza en reservosomas. Si bien este resultado no era del todo esperable, trabajos recientes en los que se estudió la proteómica de esta organela han demostrado la existencia de otras enzimas del metabolismo de lípidos [33]. Más aún, en el trabajo de Lepesheva y col. [35] se ha demostrado una gran acumulación de CYP51 en reservosomas, y proponen que el

metabolismo de esteroles en tripanosomátidos podría tener una distribución en varias organelas, pudiendo encontrarse esteroles estructurales en múltiples membranas [91,92,119].

Mediante el ensayo de complementación en *S. cerevisiae*, utilizando levaduras deficientes en CPR, se ha demostrado que *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C son capaces de complementar parcialmente el crecimiento tanto en medio líquido como sólido, y presentan una menor sensibilidad al ketoconazol. Si bien ocurre de forma parcial, la reversión del fenotipo de estas levaduras transgénicas sugiere que *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C pueden efectivamente mediar reacciones dependientes de CPR *in vivo*.

En *D. discoideum* se observó que, al igual que *T. cruzi*, existen tres genes que codifican para diflavin oxidoreductasas, llamados redA, redB y redC [108]. Resulta particularmente interesante la disrupción de redA, cuya secuencia aminoacídica presenta una alta identidad con *Tc*CPR-C, ya que provoca un arresto en el desarrollo de estos organismos y una acumulación de una sustancia amarilla no identificada. Los autores han propuesto un rol para esta CPR en el metabolismo de factores que controlan el proceso de diferenciación celular.

Por el contrario, en los ensayos de complementación la proteína *Tc*CPR-A no fue capaz de revertir el fenotipo. Las levaduras que sobreexpresan esta proteína son menos eficientes en su crecimiento, e incluso más sensibles al ketoconazol. Este resultado sugiere que *Tc*CPR-A podría ser tóxica para las células. La sobreexpresión de *Tc*CPR-A en epimastigotes de *T. cruzi* conduce a malformaciones y estructuras aberrantes, resultando letal para la supervivencia de los mismos. Por el contrario, tanto las sobreexpresión de *Tc*CPR-B como *Tc*CPR-C provoca una disminución en el contenido de lanosterol y un aumento en el contenido de ergosterol. Este aumento tiene consecuencias directas en la fluidez de las membranas y en la endocitosis de los epimastigotes. Estas alteraciones en las membranas pueden afectar la incorporación de drogas, sugiriendo una relación con los resultados de resistencia a drogas obtenidos en el trabajo anterior.

Si bien la función biológica de *Tc*CPR-A resulta aún desconocida, considerando los roles propuestos para NDOR1 y TAH18, los resultados obtenidos resultan congruentes. Esta reductasa podría estar mediando procesos apoptóticos, generando óxido nítrico o bien sintetizando grupos Fe-S. Se requerirá un mayor

desarrollo experimental para dilucidar la función que cumple esta enzima, no sólo en el parásito, sino en todos los organismos.

Se sabe que las CPRs son capaces de participar en mecanismos de detoxificación sin la necesidad de los CYPs [120]. La CPR por sí misma sería capaz de generar especies reactivas del oxígeno difusibles (DROS) capaces de depletar los peróxidos. No obstante, debido al potencial riesgo que conllevaría la generación de DROS la CPR se expresa en baja densidad en las células. No resultaría descabellado pensar que *Tc*CPR-A pueda ejercer esta función en el citoplasma.

En resultados aún no publicados, obtenidos en nuestro laboratorio, se observó que no existen diferencias significativas en la sobrevida de epimastigotes de *T. cruzi* que sobreexpresan *Tc*CPR-C incubados con nifurtimox o benznidazol. Dado que se buscaba vincular a esta reductasa en procesos de detoxificación, este hallazgo resultó en un principio desalentador. Del ensayo de resistencia a drogas utilizando parásitos que sobreexpresan *Tc*CPR-B [1], surgían dos posibles hipótesis:

- la reductasa participa directa o indirectamente en un mecanismo de detoxificación de drogas,

y/o,

- el fenómeno de resistencia se da porque al haber un mayor contenido de ergosterol en las membranas del parásito, la droga es endocitada con menor eficiencia y consecuentemente otorgando resistencia.

En el estudio de la topología y estructura de las reductasas *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C (Tesis de licenciatura de Dalmiro Blanco Obregón) se observó que los dominios transmembrana de estas proteínas determinan la localización de las proteínas enteras. Al fusionar estos dominios a la proteína GFP se observó la fluorescencia en sitios concordantes a los de las proteínas enteras: reservosomas y retículo endoplasmático. Más aún, el estudio bioinformático de la carga de los aminoácidos que flanquean estos dominios sugiere una orientación inversa para ambas proteínas. Durante el proceso de traducción de la proteína, y basándose en la teoría de inserción de proteínas de un único paso transmembrana en el RE [121,122], el dominio transmembrana sería anclado a la membrana del RE, dejando hacia el lumen a *Tc*CPR-B, y hacia el citosol a *Tc*CPR-C. Mediante un proceso de retención en el RE, *Tc*CPR-C permanecería en el RE, mientras que *Tc*CPR-B abandonaría el

mismo mediante vesículas que se fusionarían al reservosoma, orientada hacia el lumen donde debe ejercer su función.

La señal de orientación de *Tc*CPR-C es particularmente fuerte (carga positiva fuerte río abajo del dominio transmembrana). Por el contrario, el dominio transmembrana de *Tc*CPR-B se encuentra flanqueado por cargas positivas un poco mas débil. Esto permitiría una orientación dual de *Tc*CPR-B en baja proporción.

En el presente trabajo, quedó demostrado que tanto los parásitos que sobreexpresan *Tc*CPR-B como *Tc*CPR-C poseen un aumento en el contenido de ergosterol, siendo este último el de mayor diferencia respecto al control. Teniendo en cuenta la localización de estas proteínas, y vinculado a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio hasta el momento podría sugerirse la siguiente hipótesis:

En condiciones normales, *Tc*CPR-C se localiza en retículo endoplasmático anclado a la membrana hacia el citosol, donde interactúa con enzimas que participan en la biosíntesis del ergosterol. Por el contrario, *Tc*CPR-B se localiza en reservosomas, anclado hacia el lumen de los mismos, en los que, junto a proteasas y otras proteínas, es capaz de degradar moléculas que siguen la vía endocítica y llegan a esta organela. *Tc*CPR-A participaría en procesos de respuesta a estrés en el citoplasma (Figura C1).

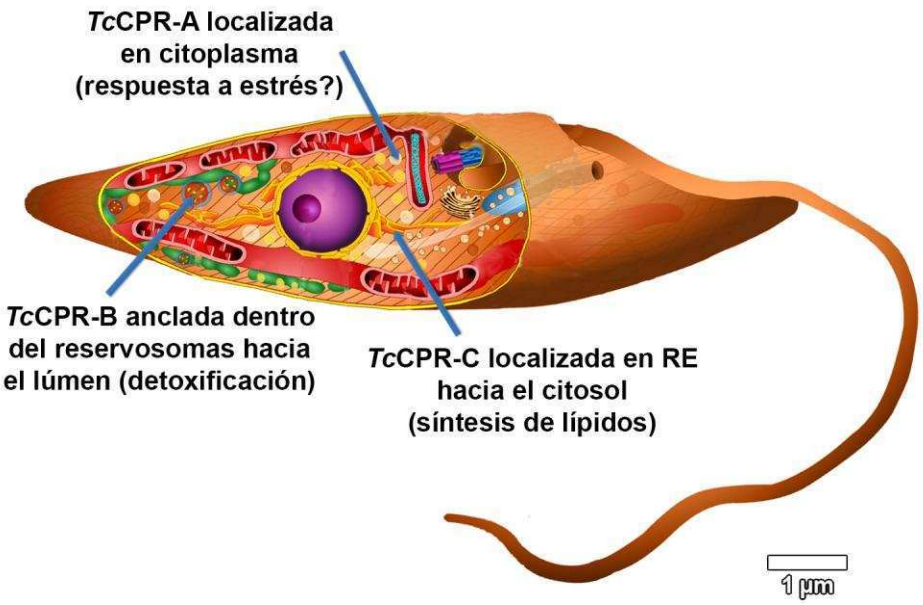


Figura C1. *Modelo propuesto para la localización y función de las CPRs en epimastigotes.*

El efecto de la sobreexpresión puede conducir a una localización incorrecta de las proteínas. Niveles muy elevados de *Tc*CPR-B en el parásito debido a su sobreexpresión, llevarían a una situación anormal, en la que esta proteína se ubicaría también en el retículo endoplasmático, incluso en una orientación inversa, y debido a la similitud estructural con *Tc*CPR-C, le permitiría interactuar con la vía de síntesis de lípidos. Esta hipótesis podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo.

Perspectivas de trabajo

Se deberá profundizar el estudio de la localización de las *Tc*CPRs en todos los estadíos del parásito. Para ello, se han generado parásitos, que están siendo aún seleccionados, en los que las *Tc*CPRs han sido fusionadas a la proteína verde fluorescente GFP. Estas líneas celulares permitirán observar el patrón de localización *in vivo* de las proteínas en los distintos estadíos del parásito.

Se deberá profundizar el estudio sobre la posible interacción de las reductasas con el CYP51 a fin de poder confirmar si la síntesis de ergosterol, además de ocurrir en el RE, ocurre también en reservosomas.

Debido a la ausencia de un sistema de ARN de interferencia en *T. cruzi*, este modelo de estudio no permite evaluar el efecto de la disminución de la expresión de las proteínas en los parásitos. Por el contrario, en *Trypanosoma brucei* sí es posible realizar estudios con ARN de interferencia. Este ensayo permitiría validar los resultados obtenidos en los experimentos de sobreexpresión. La continuación de este trabajo debería contemplar el análisis de estos parásitos, disminuyendo la expresión de las CPRs y evaluando el fenotipo de las mismos, su contenido lipídico y la sensibilidad a drogas.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Análisis *in sílico*

5.1.1. Bases de Datos

GeneDB: http://www.genedb.org/Homepage/Tcruzi

TriTryps: http://tritrypdb.org/tritrypdb/

5.1.2. Programas

Wu-Blast2: http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast/

BioEdit: http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html

ProtParam: http://web.expasy.org/protparam/

ClustalW: http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

Phylogeny Clustal W2: http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/

TreeVector: http://supfam.cs.bris.ac.uk/TreeVector/

BoxShade: http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

NCBI Batch Web CD: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi

5.2. Cultivo de Bacterias

5.2.1. Cepas de Escherichia coli

Escherichia coli DH5αF´: F'/endA1 hdR17(r_k^- m_k^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal^r) relA1 Δ(lacZYAargF) (m80lacZΔM15).

Escherichia coli BL21/pLys: F^- *ompT* hdS_B (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysS, (Cam^R).

Escherichia coli BL21/CodonPlus (DE3)-RIL: F^- *ompT* $hsdS_B$ (r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r *galλ*(DE3) *end*A Hte [*arg*U *ile*Y *leu*W) (Cam^R).

Escherichia coli BL21(DE3) Rosetta2: F´ *ompT hdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysSRARE2 (Cam^R).

5.2.2. Medios de Cultivo Bacteriano

LB y LB Agar: Bacto-triptona 1% p/v; Extracto de levaduras 0,5% p/v; NaCl 1% p/v. Para LB-Agar, se añade 1.2%p/v de Agar-agar.

5.2.3. Antibióticos

Ampicilina: Preparación de stock a partir de droga sólida a una concentración de 100 mg/ml en H_2O. Concentración final utilizada en cultivo fue de 100 µg/ml.

Cloranfenicol: Preparación de stock a partir de droga sólida a una concentración de 35 mg/ml en etanol absoluto. Concentración final en cultivo igual a 140 µg/ml.

5.2.4. Otras Soluciones

IPTG: Preparación de stock a partir de droga sólida a una concentración de 0,1M en H_2O. Concentración final utilizada en cultivo en placa fue de 0,3 mM. Para la inducción de cultivos de bacterias recombinantes se utilizaron concentraciones finales de IPTG de 0,1 mM-0,5 mM.

X-Gal: Preparación de stock a partir de droga sólida a una concentración de 50 mg/ml en Dimetilformamida. Concentración final utilizada en cultivo en placa fue de 25 µg/ml.

5.3. Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

5.3.1. Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotes y tripomasitoges de *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener.

5.3.2. Medios de cultivo tripanosomas y células

LIT: (para epimastigotes) Infusión de hígado 0,5% p/v; Triptosa 0,5% p/v; NaCl 68 mM; KCl 5,3 mM, Na_2HPO_4 22 mM, Glucosa 2% p/v; Hemina 0,02 mg/ml; Suero Fetal Bovino 10% v/v, Estreptomicina 100 µg/ml y Penicilina 100 U/ml.

MEM: (para cultivo de células VERO e infecciones con tripomastigotes). Medio comercial adquirido en Gibco suplementado con L-glutamina 2 mM, Penicilina 100 U/ml, Estreptomicina 100 µg/ml, Suero Fetal Bovino inactivado 5-10%.

Células Vero: Línea celular establecida a partir de células de riñon de mono *Chlorocebus sabaeus.* Estas células se cultivaron en medio MEMa 37 °C, CO_2 5%.

5.4. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

5.4.1. Cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*

W303-1B: (MATα; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112;ura3-1; trp1-1).

WRΔ: (MATα; ade2-1; his3-11-15; leu2-3,-112; ura3-1). WRΔ deriva de la cepa W303-1B por disrupción del gen NCP1 mediante el marcador de selección TRP1.

La cepa WRΔ obtenida y descripta por Truan et al. [82], fue amablemente enviada por el doctor Gilles Truan (Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France), en placas de Petri sobre medio YPAD. A fin de corroborar su genotipo, se las plaqueó en medios definidos, suplementadas con mezclas de aminoácidos definida (drop outs) para cada una de sus auxotrofias. Luego, se las plaqueó utilizando una fuente de carbono respirable como el glicerol al 2%, pudiendo comprobarse la integridad de sus mitocondrias. Las levaduras fueron conservadas en placa de Petri SD a 4ºC, y en tubos Eppendorfs con glicerol 20% a -70ºC.

5.4.2. Medios de cultivos de levaduras

YPAD: peptona 2% p/v; extracto de levaduras 1% p/v; glucosa 2% p/v; adenina 0,01%.

YPAD-agar: YPAD + agar 2% p/v.

SC (medio mínimo): 0,17% p/v de base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos; sulfato de amonio 0,5% p/v; ácido succínico 1 % p/v; NaOH 0,6% p/v; suplementado con el drop-out correspondiente y la fuente de carbono necesaria (glucosa o galactosa + rafinosa).

SD: SC + Glucosa 2%.

SGR: SC + Galactosa 2% + rafinosa 1%.

5.5. Vectores

5.5.1. Vectores para Bacterias

pGEM-T easy (Promega): Clonado de productos de PCR.

pET 22b(+) (Novagen): Expresión de proteínas recombinantes fusionadas a una cola de His6X C-terminal, en cultivo bacteriano (*Escherichia coli* BL21).

5.5.2. Vectores para Parásitos

pTREX-A: Sobre-expresión de proteínas en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Vector capaz de integrarse en el genoma del organismo transfectado.

pTEX: Expresión de niveles moderados de proteínas foráneas en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Vector episomal.

5.5.3. Vector para Levaduras

pYES2: Vector de expresión en levaduras pYES2 (Invitrogen), cuyo promotor Gal1 es reprimido por glucosa, e inducido por galactosa. La secuencia codificante para URA3 del vector pYES2 permite a las levaduras auxótrofas para uracilo crecer en

ausencia del mismo cuando son transformadas con éste. La cepa W303-1B pudo ser transformada fácilmente mediante la técnica de electroporación. Sin embargo, para la cepa WRΔ éste método no funcionó correctamente, debiendo optarse por la transformación con acetato de litio, cuya eficiencia de transformación es mayor. De algún modo, la ausencia de la reductasa parecería afectar la eficiencia de transformación mediante electroporación. Posiblemente las deficiencias apreciadas en estas levaduras mutantes (menor tamaño, crecimiento enrracimado, menor contenido de ergosterol) puedan afectar ese método. Las levaduras transformadas fueron seleccionadas plaqueando el producto de transformación en placas de Petri SD-U (es decir un medio definido con glucosa y sin uracilo). Las colonias obtenidas fueron amplificadas en medio líquido y conservadas en tubos eppendorfs con 20% glicerol a -70ºC para su posterior uso.

5.6. Ácidos Nucleicos: Metodologías

5.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación de fragmentos de interés de ADN fueron realizadas utilizando mezclas de reacción estándar conteniendo: buffer de reacción (según indicaciones del fabricante) 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.8-1 µM de cada cebador, 1-1.25 U de *Taq* Polimerasa y 100 ng de ADN total extraído de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, en un volumen final de 25 µl. El ciclado de la reacción también se realizó en condiciones estándar:

94 °C – 4 min

94 °C – 1 min
60-65 °C – 1 min
72 °C – 90 seg
} 35 ciclos

72 °C – 4 min

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x (Tris 40 mM, Ac. Acético 20 mM, EDTA 1 mM). Para la visualización de los mismos, se colocó en el gel Bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se observó mediante el uso de un transiluminador de luz UV.

5.6.2. Clonado

5.6.2.1. Preparación de plásmidos por Miniprep

La obtención de ADN plasmídico a partir de cultivo bacteriano se realizó siguiendo el protocolo a continuación:

1. Se inocularon 3 ml de medio de cultivo bacteriano (LB) y se incubaron overnight a 37°C con agitación a 200 r.p.m.
2. Se recolectaron las bacterias por centrifugación a 3500 xg durante 10 min a 4°C.
3. Se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 100 µl de Solución I de Miniprep.
4. Se añadieron 200 µl de Solución II de Miniprep fresca y se mezcló por inversión de manera cuidadosa.
5. Se añadieron 150 µl de Solución III de Miniprep y nuevamente se mezcló por inversión. Se incubó la solución durante 3-5 minutos en hielo.
6. Se centrifugó la solución obtenida durante 10 minutos a 12000 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante.
7. Se añadieron 50 µg/ml de RNAse A y se incubó la mezcla durante 2 hs a 37°C.
8. Posteriormente se realizó una extracción con 1 volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1), seguida de una extracción con 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1).
9. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN plasmídico mediante el agregado de 1 volumen de alcohol isopropílico y centrifugación a 12000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.
10. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ADN obtenido con etanol 70% por centrifugación a 4°C durante 10 minutos.

11. El pellet obtenido se secó para eliminar los restos de etanol y se resuspendió en ddH_2O.
12. Se verificó la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó mediante la lectura de absorbancia a λ 260 nm.

5.6.2.2. Clonado en pGEM-T easy

Los fragmentos de ADN obtenidos por la técnica de PCR se clonaron en el vector pGEM-T easy (Promega, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de ligación se hicieron durante 4 hs a 25°C u "overnight" a 4°C. Posteriormente, 5 µl de esta mezcla se utilizaron para la transformación de bacterias *E. coli* DH5αF´, por la técnica de Shock Térmico.

5.6.2.3. Subclonados

El subclonado en otros vectores de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR y clonados en primera instancia en pGEM-T easy se realizó siguiendo los siguientes pasos generales:

Digestión del vector recombinante con endonucleasas de restricción. La digestión del vector pGEM-T easy recombinante que posee el fragmento de ADN de interés permite la liberación de este inserto. Para ello, el vector recombinante purificado por la técnica de Miniprep, explicada en el apartado Preparación de plásmidos por Miniprep, así como el vector de destino seleccionado se sometieron a la acción de endonucleasas de restricción específicas, de acuerdo a los sitios de restricción disponibles y deseados para una posterior ligación. La digestión se realizó en el buffer correspondiente y a la temperatura indicada para cada enzima particular por el fabricante, por entre 4-18 hs, dependiendo de la cantidad de ADN a digerir. Aproximadamente, se utilizaron entre 3 y 5 U de cada enzima de restricción por cada µg de ADN. Los fragmentos de interés se purificaron a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, WI, USA).

Ligación del inserto de interés al vector de destino. La ligación de los fragmentos de ADN deseados se realizó utilizando la enzima ADN ligasa del fagoT4. Para ello, 50 µg de vector digerido y purificado se mezclaron con el inserto

también digerido y purificado en relaciones molares entre 10:1 y 3:1 (inserto:vector). Los volúmenes de reacción fueron de entre 10 y 20 µl utilizando 1 U de enzima ADN ligasa T4 para ligar extremos romos (New England Biolabs, MA, USA) y 0,1 U para extremos cohesivos. Las incubaciones se realizaron a 16 °C durante toda la noche o a temperatura ambiente por 2 hs. Una vez finalizado el proceso de ligación se procedió a la transformación de bacterias competentes por la técnica de shock térmico.

5.6.3. Transformaciones

5.6.3.1. Bacterias

5.6.3.1.1. Transformación de Bacterias Competentes por Shock Térmico

La transformación de bacterias competentes con los vectores recombinantes obtenidos por las técnicas previamente descriptas se realizó por la técnica de shock térmico. Para ello, 50 µl de bacterias competentes obtenidas mediante el protocolo descripto en Preparación de bacterias competentes se pre-incubaron en baño de hielo con 5 µl de ADN en el caso de las ligaciones a pGEM-T easy, o con el total de la mezcla de ligación en el caso del clonado en otro vector, durante 20 minutos. Posteriormente, las bacterias fueron sometidas a un shock térmico a 42°C durante 90 segundos en baño seco, tras lo cual se agregó 1 ml de medio LB y se incubaron durante 1 h en estufa a 37°C. Posteriormente, una alícuota del cultivo obtenido se centrifugó brevemente y el pellet bacteriano obtenido se resuspendió en 100 µl de medio, los cuales fueron transferidos a una placa de petri con medio LB, los antibióticos y otros reactivos correspondientes (de acuerdo al vector y la cepa bacteriana utilizada) y esparcidos con espátula de drigalsky o perlas de vidrio hasta su completa absorción. La placa se incubó overnight en estufa a 37°C y luego se analizaron las colonias obtenidas en busca del vector recombinante deseado.

5.6.3.1.2. Preparación de bacterias termocompetentes

Las bacterias competentes de *E. coli* de la cepa DH5α se obtuvieron de acuerdo con el siguiente protocolo, el cual permite obtener bacterias competentes de alta eficiencia de transformación:

1. A partir de una placa fresca, se inocularon a 25 ml de medio SOB en un erlenmeyer de 250 ml a partir de una colonia aislada y se incubó el medio con agitación a 37 °C durante 8 horas.
2. Se utilizaron 10 ml, 4 ml y 2 ml del cultivo anterior para inocular tres erlenmeyers de 1l, conteniendo 250 ml de SOB fresco. Estos cultivos se incubaron a 18-22 °C con agitación suave durante 18 horas.
3. Se determinó la DO_{600} de los tres cultivos hasta que uno de ellos alcance un valor de 0,55.
4. Ese cultivo se transfirió a un baño de hielo durante 10 min.
5. Se recolectaron las células por centrifugación a 2.000 x g 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 80 ml de Buffer Inoue frío.
6. Las células se recuperaron por centrifugación a 2.000 x g 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 20 ml de Buffer Inoue frío.
7. Luego se añadió 1,5 ml de DMSO (dimetil sulfóxido), mezclando por inversión e incubando en hielo 10 min.
8. Finalmente, las células se alicuotaron en tubos plásticos de 1,5 ml estériles en volúmenes de 50 µl, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta el momento de usar.

La preparación de bacterias termocompetentes de las cepas derivadas de BL21 se realizó según el protocolo de Hanaham [83] con algunas modificaciones:

1. Utilizando una placa fresca, se inocularon 5 ml de LB a partir de una colonia aislada y se incubaron con agitación a 37 °C durante toda la noche.
2. Un ml de este cultivo se inoculó en 100 ml de LB en erlenmeyer de 500 o 1000 ml, el cual se incubó con agitación a 37 °C hasta una DO_{600} de 0,5 y luego se colocó en baño de hielo por 10 min.
3. El cultivo bacteriano se centrifugó a 3000 x g por 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió cuidadosamente en 40 ml de solución TBFI fría, incubándose en hielo durante 5 min.
4. Luego se centrifugó a 3000 x g por 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió cuidadosamente en baño de hielo en 4 ml de TBFII preenfriado. La suspensión bacteriana se incubó en hielo por 15 min.

5. Finalmente las células se alicuotaron en tubos plásticos de 1,5 ml estériles en volúmenes de 50 µl, congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenándose a -70 °C hasta el momento de usar.

5.6.3.2. Levaduras

5.6.3.2.1. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* por electroporación

Para la preparación de células electrocompetentes de Saccharomyces cerevisiae:

1. Inocular 20 ml de YPD en tubos Falcon de 50 ml y cultivar a 28 °C con agitación ON.
2. Centrifugar en los tubos Falcon de 50 ml en centrifuga clínica los 20 ml de cultivo.
3. Lavar el pellet 3 veces con 20 ml de agua fría.
4. Lavar 2 veces con 10 ml de glicerol 10% frío.
5. Transferir a un tubo eppendorf y resuspender en 0.5 ml de glicerol 10% frío.
6. Mantener en frío hasta el momento de utilizar.

Electroporación:

1. Colocar 50 µl de células electrocompetentes en un tubo eppendorf y agregar 1 µg del plásmido, mezclando bien.
2. Incubar 5 min en hielo.
3. Colocar en las cubetas de electroporación.
4. Electroporar a 2.5 volts, 25 µF y 250 ohms.
5. Agregar inmediatamente 1 ml de YPD a la cubeta y transferir a un tubo.
6. Recuperar 1 hora a 28 °C.
7. Plaquear 50 y 250 µl de la transformación en placas de medio SD-U.
8. Incubar en estufa a 28 °C

5.6.3.2.2. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* por AcLi

Buffer LA: 0,1 M Acetato de Litio en buffer TE.

Buffer TE: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA

Preparación de las células competentes

1. Inocular 2 ml de YPD con la cepa a transformar y cultivar ON con agitación a 28 °C.
2. Inocular 50 ml de medio YPD con los 2 ml de cultivo ON e incubar hasta que el cultivo llegue a una OD_{600}= 1 (aprox. 4-5 horas).
3. Centrifugar las células a temperatura ambiente (2000 x g x 20 min).
4. Resuspender las células en 50 ml de buffer TE y centrifugar nuevamente.
5. Resuspender las células en 2,5 ml de buffer LA e incubar con agitación por 1 hora (28 °C).

Transformación

1. Colocar 0,3 ml de las células en un tubo eppendorff y agregar:
   a) el ADN para transformar (aprox. 5-10 µg del plásmido y en no más de 20 µl de agua) y
   b) 0,7 ml de PEG 50% p/v (4000 o 3350, no usar PEG 8000), mezclar suavemente.
2. Incubar 1 hora a 28 °C sin agitación.
3. Realizar un shock térmico de 5 min. a 42 °C.
4. Centrifugar las células (2000 x g, 5 min) y eliminar el exceso de PEG.
5. Resuspender en 100 µl de buffer TE y plaquear en medio mínimo SD + los componentes necesarios para cubrir las auxotrofías.

5.6.3.3. Parásitos

5.6.3.3.1. Transformación de epimastigotes de *T. cruzi*

La transformación de epimastigotes de *T. cruzi*, a fin de obtener parásitos transgénicos se realizó por la técnica de electroporación. Para ello, a partir de cultivos saturados de epimastigotes en medio LIT o medio BHT, se realizaron diluciones en medio fresco donde la concentración de parásitos inicial es de 1.10^6 epimastigotes/ml. Estos cultivos se incubaron en estufa a 28°C hasta alcanzar una densidad de 1.10^7 parásitos/ml. Por cada transformación, 10 ml de este cultivo se centrifugaron a 1000 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente, y el pellet de

parásitos obtenidos se lavó con 5 ml PBS 1x estéril frío, 2 veces. Los parásitos se recolectaron nuevamente por centrifugación y se resuspendieron en 350 µl de buffer de electroporación de epimastigotes pre-enfriado, se transfirieron a una cubeta de electroporación y se incubaron en baño de hielo con 50 µg del ADN a transformar (resuspendido en 40 µl de buffer TE) durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la electroporación de los parásitos, para lo cual se les dió un pulso eléctrico a 400 mV y 500 µF. Estos parásitos se transfirieron a tubos falcon de 50 ml conteniendo 10 ml de medio LIT o LIT modificado fresco y se incubaron en estufa a 28°C durante 24 hs. Pasado este tiempo, se añadieron 50µg/ml del antibiótico G418 y se realizó un seguimiento de los parásitos transfectados por visualización microscópica. La selección de los parásitos transgénicos se realizó por aumento progresivo de la concentración del antibiótico hasta 500 µg/ml, durante 4-5 semanas.

5.6.3.3.2. Protocolo de superinfección de células Vero

A fin de poder purificar tripomastigoes o realizar microscopías de células infectadas (crecidas sobre discos de vidrio con poli-L-lisina en placas de 24 pocillos), se superinfectaron células Vero plaqueadas 24 horas antes con un número de parásitos equivalente a 200 tripomastigotes por célula. Luego de 2 horas las células fueron lavadas 3 veces con PBS a fin de eliminar parásitos no adheridos. 48 horas más tarde se obtienen células superinfectadas que puede ser utilizadas para microscopía o para purificar amastigotes y tripomastigotes.

5.6.4. Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR fue realizada a través del servicio de secuenciación de la empresa Macrogen Inc. Los resultados provistos por esta compañía fueron analizados mediante los programas Vector NTI 8 y BioEdit.

5.6.5. Southern Blot

El análisis de la presencia y números de copias genómicas en *Trypanosoma cruzi*, así como el análisis de la incorporación del gen externo en las cepas

transgénicas generadas, fue realizado por la técnica de Southern blot, utilizando sondas específicas para cada caso, de acuerdo con el siguiente protocolo:

5.6.5.1. Extracción de ADN genómico de epimastigotes

Para la obtención de ADN genómico de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, se recolectaron por centrifugación a 1000 *g* por 10 minutos, parásitos provenientes de 30 ml de cultivo en medio LIT a una densidad de 5.10^7 epimastigotes/ml. El pellet de parásitos se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis para ADN y se mezcló suavemente para favorecer la lisis de los parásitos. Posteriormente, se realizaron 2 extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) a fin de eliminar las proteínas de la muestra y el ADN se precipitó por agregado de 1 volumen de isopropanol y centrifugación a 13000 r.p.m. durante 30 minutos, a partir de la fase acuosa recuperada. El pellet de ADN obtenido se lavó con etanol 70% frío y se secó a temperatura ambiente para eliminar los restos de etanol. Finalmente, se resuspendió en ddH_2O, se determinó su integridad por electroforesis y visualización en gel de agarosa 1%, y se cuantificó por A_{260}.

5.6.5.2. Digestión con Enzimas de Restricción

Para el análisis de Southern blot se seleccionaron al menos 4 enzimas de restricción que en conjunto permitan determinar la cantidad de copias del gen de interés en el genoma de *T. cruzi*. Para cada una de estas reacciones de digestión se utilizaron 10 µg de ADN genómico total, los cuales se incubaron por un mínimo de 18 hs en presencia de 5U/µg de ADN de la enzima de restricción seleccionada, en el buffer y a la temperatura indicada por el fabricante. La progresión de la reacción de digestión se controló mediante la electroforesis y visualización en gel de agarosa 1%. Una vez completa la digestión del material genómico, se procedió a su separación electroforética y posterior análisis.

5.6.5.3. Corrida Electroforética en Gel de Agarosa

La electroforesis del ADN genómico digerido se realizó en gel de agarosa 1% a 25V durante 18 hs. Para ello, la mezcla de digestión se mezcló con buffer de siembra de ADN, conteniendo glicerol y Azul de bromofenol, colorante que permite observar el frente de corrida. La correcta separación fue visualizada por tinción con Bromuro de Etidio y utilización de un transiluminador UV.

5.6.5.4. Transferencia

Una vez finalizada la corrida electroforética, se incubó el gel en una solución de HCl 0,25 N durante 20 minutos o hasta observar el viraje del colorante azul de bromofenol a amarillo. Posteriormente, el gel se incubó durante 15 minutos en solución NaOH 0,4 N, se lavó en ddH_2O y se procedió a la transferencia de los fragmentos de ADN a una membrana de GeneScreen Hybridization Transfer por capilaridad, en buffer SSC10x, por 16-18 hs.

5.6.5.5. Sonda

La sonda seleccionada para la detección del gen *Tc*CPR-C corresponde a un fragmento del gen. Este fragmento se obtuvo por digestión enzimática del fragmento de PCR clonado en el vector pGEM-T easy. La marcación radioactiva de la sonda se realizó mediante el kit Random Primer Extension Labeling System (Perkin Elmer, MA, USA), utilizando 50 ng de ADN y [^{32}P]-dCTP como nucleótido radioactivo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez finalizada la reacción de marcación, la sonda fue purificada utilizando MicroSpin (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.6.5.6. Hibridación y Revelado

La membrana obtenida fue pre-hibiridada mediante su incubación en 20 ml de buffer Church a 65°C durante 4 hs en horno de hibidación con rotación constante. Finalizado este ciclo, se incubó la membrana en 10 ml de buffer Church conteniendo la sonda correspondiente marcada, a 65°C durante 16-18 hs. Para eliminar la sonda

pegada inespecíficamente a la membrana, se realizó un lavado con 15 ml de buffer SSC 2x-SDS 0.1% durante 15 minutos, seguido de un lavado con SSC 1x-SDS-0.1% y uno con SSC 0.1%-SDS-0.1%, en iguales condiciones al primer lavado. Finalizados los lavados, la señal radioactiva se detectó mediante la exposición de una pantalla amplificadora radiosensible a la membrana y se registró de la señal emitida mediante Phosphoimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech, NJ, USA)

5.6.6. Northern Blot

5.6.6.1. Extracción de RNA total

La extracción de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* se realizó a partir de 10 ml de un cultivo de parásitos en medio LIT a una densidad 5.10^7 parásitos/ml. Los parásitos para la extracción se recolectaron por centrifugación a 1000 *g* durante 10 minutos y se resuspendieron en 1 ml de TRIZol (Invitrogen), mezclando suavemente para favorecer la lisis y no comprometer la integridad del material. A esta solución se le añadieron 200 µl de cloroformo, se mezcló por vortex, se incubó 5 minutos en baño de hielo y posteriormente se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Una vez separadas las fases, se recuperó la fase acuosa, a la cual se le añadió un volumen de isoporpanol, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 30 minutos. Finalizada la incubación, se precipitó el material por centrifugación a 12000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. El pellet de ARN obtenido se lavó con etanol 70% frío, se secó para eliminar residuos del alcohol y se resuspendió en ddH_2O. Estos procedimientos se realizaron utilizando materiales y reactivos libres de RNasas, a fin de mantener la integridad del material, la cual se verificó por electroforesis y visualización en gel de agarosa 1%. El ARN obtenido se cuantificó por A_{260}.

5.6.6.2. Corrida electroforética en gel de agarosa con formaldehido

La separación de 5 µg de ARN total obtenido se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1.2% - formaldehido 0,6 M en buffer MOPS 1x, utilizando MOPS 1x-formaldehído 0,2 M como buffer de corrida. Las muestras obtenidas se mezclaron con buffer de siembra para ARN fresco y la corrida electroforética se realizó 80-100

V durante 4-6 hs. La correcta separación fue visualizada por tinción con Bromuro de Etidio y utilización de un transiluminador UV y registrada fotográficamente.

5.6.6.3. Transferencia

Finalizada la corrida, se eliminó parte del formaldehido del gel mediante el enjuague del mismo en 5 volúmenes de ddH_2O, con 3 cambios de agua. La transferencia del material ribonucleico sobre la membrana de GeneScreen Hybridization Transfer se realizó por capilaridad en buffer SSC10x, por 16-18 hs. Una vez finalizada la transferencia se fijó el material a la membrana mediante su exposición a luz ultravioleta, a través de un pulso de radiación de 120000 μJ, usando un UV Stratalinker 1800 de Stratagene.

5.6.6.4. Sonda

La sonda para la detección del ARNm se obtuvo y marcó de igual manera a la descripta en el apartado Sonda de la sección Southern blot.

5.6.6.5. Hibridación y Revelado

Los pasos de hibridación, lavado y exposición de las membranas obtenidas se realizaron de la igual manera a la descripta en el apartado Hibridación y Revelado de la sección Southern Blot.

5.7. Proteínas

5.7.1. Extractos proteicos

5.7.1.1. Bacterias

Los extractos proteicos de cultivos bacterianos se obtuvieron a partir de la centrifugación de cultivos bacterianos a 6000 g durante 10 minutos a 4 °C. Los pellets obtenidos se resuspendieron en buffer de lisis I o, alternativamente, buffer de lisis II, en relación 1.5 ml de buffer/1 mg de masa húmeda. Las bacterias fueron

sometidas a 6 ciclos de 30 segundos de sonicación. La cuantificación proteica se realizó mediante el método Bradford.

5.7.2. Expresión de Proteínas Recombinantes en bacterias

Para la expresión de proteínas recombinantes, el gen de interés fue subclonado en el vector de expresión bacteriano pET22b$^+$ en marco con una cola de 6 histidinas en la zona C terminal de la proteína. Los vectores obtenidos fueron transformados en *E.coli* de la cepa BL21 Rosetta2 o Codon Plus.

5.7.2.1. Inducción de cultivos bacterianos.

A partir de una colonia aislada de la cepa capaz de expresar la proteína de interés, se inoculó un cultivo LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, el cual se incubó durante 18 hs a 37°C con agitación. A partir de este cultivo, se inoculó mediante una dilución 1/20 aproximadamente, medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, el cual se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. Una vez alcanzada esta densidad, se agregó IPTG en una concentración final entre 0,1 y 0,5 mM y se incubaron los cultivos a 30°C durante 4 hs para la obtención de proteínas solubles o a 37°C durante 2 hs para la obtención de proteínas en cuerpos de inclusión.

Una vez finalizadas las inducciones, se recuperaron las bacterias mediante el protocolo explicado en el apartado Bacterias de la sección Extractos proteicos.

La eficiencia en la expresión de las proteínas recombinantes se analizó mediante el análisis de los extractos proteicos por SDS-PAGE y Western blot, utilizando anticuerpos dirigidos contra la cola de histidinas o la proteína de interés (ver apartados Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE y Western Blot).

A modo de control del proceso de inducción, se utilizaron cultivos de bacterias transformadas con el vector de expresión conteniendo el inserto pero sin el agregado del inductor IPTG.

5.7.2.2. Purificación de proteínas recombinantes

Cromatografía de afinidad en columna Ni^{+}-Agarosa. La purificación de las proteínas recombinantes en condiciones nativas se llevó a cabo por medio de columnas de Ni-NTA agarosa (Qiagen) haciendo uso el motivo de seis histidinas presentes en las proteínas recombinantes. Para ello, el extracto total bacteriano se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C a fin de eliminar restos celulares. El sobrenadante obtenido se diluyó 1:3 con buffer de purificación, de modo de disminuir la concentración de EDTA en la muestra y favorecer el pegado de la proteína recombinante a la resina. Posteriormente, se equilibró una alícuota de resina de Ni-NTA con 10 volúmenes de buffer nativo y luego se incubó con el sobrenadante de la lisis celular durante 16 horas a 4 ºC en agitación. Una vez finalizado este período, se procedió al armado de la columna de purificación. Se colectó el percolado durante este proceso y se realizó un lavado inicial con 10 volúmenes buffer de purificación. Las proteínas unidas de manera inespecífica a la matriz se eliminaron mediante sucesivos lavados con 5 volúmenes de buffer de purificación con imidazol 20 mM. Finalmente se eluyeron las proteínas mediante el pasaje a través de la columna del mismo buffer conteniendo imidazol 250 mM. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a 4 ºC. El proceso de purificación se monitoreó por Bradford y la pureza de las proteínas obtenidas se analizó mediante geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie Brilliant Blue.

5.7.3. Purificación de cuerpos de inclusión

Se tomaron 5 g de bacterias BL21/Lys inducidas y resuspendieron en 10 ml de buffer de lisis. Luego se lisaron por sonicación y se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 xg. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en solución de lisis con $MgCl_2$ 10 mM más ADNasa 0,02 mg/ml y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Se centrifugó 10 minutos a 12000 x g., se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en solución de lisis más 0,2 mg/ml de lisozima y se incubó durante 15 minutos a T° ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 12000 x g, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en solución de lisis más 2 mg/ml de deoxicolato de sodio y se incubó durante 10 minutos a T° ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 12000 g, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en solución

de lisis con 0,5% de Triton X-100 y se incubó durante 10 minutos a T° ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 12000 x g, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 3 veces con agua destilada. Finalmente, los cuerpos de inclusión se resuspendieron en PBS.

5.7.4. Generación de Anticuerpos Específicos

Anticuerpos específicos contra *Tc*CPR-A, *Tc*CPR-B y *Tc*CPR-C fueron obtenidos mediante la inmunización de ratones hembra de la cepa Balb/c. Para ellos, las proteínas recombinantes se obtuvieron en grandes cantidades a partir de cuerpos de inclusión y se sembraron en un gel SDS-PAGE de calles anchas. Una vez finalizada la separación electroforética, el gel se tiñó con una solución de KCl 0,1 M y, observando a trasluz el gel, se seccionó la banda de interés, la cual se cortó con un bisturí en pequeños fragmentos, se liofilizó y se pulverizó con un mortero. El polvo obtenido se resuspendió en PBS 1x y se emulsionó con adyuvante de Freund incompleto. Esta solución de inyectó en los ratones siguiendo un protocolo de inmunización de 3 dosis de 100 µg, cada 15 días. A las 8 semanas, se obtuvo la sangre de los ratones por sangrado ocular a blanco y se recolectó la fracción sérica por centrifugación a 2000 r.p.m. durante 5 minutos, descartando el coágulo formado. El suero se alicuotó y se guardó a -20°C.

5.7.4. Cuantificación de Proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford. A 10 µl de muestra se le agregaron 190 µl de reactivo de Bradford y midió la absorbancia a 620 nm en placas de poliestireno de 96 pocillos. Para la construcción de una curva de calibración se utilizaron patrones de seroalbúmina bovina (BSA) y sobre la base de la misma se determinó la concentración proteica de las muestras.

5.7.5. Western Blot

5.7.5.1. Extracción de proteínas y cuantificación

Para la obtención de extractos proteicos para Western blot, se siguieron los protocolos explicados en el apartado Extractos proteícos de la sección Proteína: Metodologías y se cuantificaron por el método de Bradford.

5.7.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

El análisis electroforético de proteínas fue realizado en condiciones desnaturalizantes de acuerdo a la técnica descripta por Laemmli. Para ello, se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS de entre 8 y 10%. Previamente al sembrado de las muestras, estas se mezclaron con buffer de siembra para proteínas con SDS y DTT, y se calentaron en baño seco durante 10 minutos a 99°C. La corrida electroforética se realizó a 35 mA por gel durante el tiempo requerido, controlando la corrida mediante la observación del marcador de PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). Para extractos totales o impuros de proteínas se sembraron 30-35 µg de proteínas, mientras que para proteínas purificadas, se sembraron 3-5µg.

Una vez finalizada la separación electroforética, se procedió a la electrotransferencia del mismo para continuar con el análisis de Western blot, o a la tinción con Coomassie Brilliant Blue. En este último caso, la tinción de los geles se realizó sumergiendo el gel en una solución de Coomassie Brilliant Blue durante 30 minutos con agitación suave. Luego se destiñó el gel con Solución Decolorante mediante sucesivos cambios cada 15 minutos hasta obtener la intensidad de las bandas deseada.

5.7.5.3. Electrotransferencia de proteínas

Para la electrotransferencia, se utilizó alternativamente membrana de PVDF Amersham Hybond-P (GE Healthcare) o nitrocelulosa Amersham Hybond ECL (GE Healthcare), las cuales se pre-trataron siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez finalizada la corrida electroforética, se montó el sistema de electrotransferencia semi-seca, utilizando papeles de transferencia Whatman 3MM

embebidos en buffer Tris-glicina 1x-metanol 20%, utilizando el dispositivo FastBlot (Biometra). La transferencia se realizó a 8 mA/cm^2, durante 45 minutos.

5.7.5.4. Inmunodetección

Una vez transferidas las membranas, éstas se incubaron en solución de bloqueo durante 16 hs. Una vez finalizado este proceso, se enjuagó brevemente la membrana en TBS 1x-Tween 0.05% y se incubó durante 60 minutos con una dilución adecuada del anticuerpo primario. Tras esta incubación, se lavó la membrana en TBS 1x-Tween 0,05% durante 5 minutos, con 3 cambios de solución de lavado y finalmente de incubó con la dilución correspondiente del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase HRP). Finalizada esta incubación, se repitieron los lavados con TBS 1X-Tween 0,05%. El revelado de las membranas fue realizado utilizando el kit de quimioluminiscencia Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer), y la posterior sensibilización de placas AGFA CP-BU New Medical X-Ray Film.

5.8. Metodologías realizadas con levaduras

5.8.1. Curvas de crecimiento en medio líquido

El método utilizado consistió en inocular un tubo falcon de 15 ml conteniendo 3 ml de medio SD-U y hacer crecer en agitación a 28ºC durante la noche (“overnight” = “O.N.”). Los cultivos fueron centrifugados a 1000g y lavados 3 veces con PBS estéril. A partir de éstos se inocularon 10^6 células/ml en un tubo falcon de 50 ml con 10 ml de medio SD-U para de expresión negativa (represión) o SGR-U para la expresión positiva (inducción). Para la inducción de la expresión, las levaduras crecidas “O.N.” en SD-U fueron centrifugadas 5’ a 1000 x g, lavadas con PBS 1X estéril tres veces, resuspendidas en 10 ml de SGR-U e incubadas “O.N.” con agitación a 28ºC. A partir de estos cultivos se repitió el protocolo anterior, y se inocularon 10^6 células/ml en 10 ml de medio SGR-U fresco, y de éste modo evitar un posible retraso en la expresión de las proteínas debido a la presencia de glucosa residual en el crecimiento.

5.8.2. Curva de crecimiento en medio sólido

La técnica utilizada fue similar a la de medio líquido, pero en éste caso se inocularon diluciones seriadas al $^{1}/_{10}$, a partir de 10^{8} células/ml. Se colocaron gotas de 10 µl con las diluciones indicadas, en placas de Petri con medio SD-U agar, o SGR-U agar y se incubaron a 28 ºC.

5.8.3. Sensibilidad al ketoconazole

Para realizar este experimento, se hicieron crecer las levaduras en medio líquido del mismo modo que los experimentos anteriores. De estos cultivos crecidos se tomaron $10^{\wedge 7}$ células y se inocularon en SGR-U agar (0,75%) fundido, pero mantenido a baja temperatura (inferior a 40 grados), lo que permitía mantener las células en suspensión el tiempo suficiente como para plaquearlo sobre una placa de Petri con medio SGR-U agar (2%), y dejar solidificar a temperatura ambiente, y posteriormente incubar en estufa a 28 ºC. Se comprobó que las levaduras eran capaces de crecer luego de ser sometidas a este tratamiento, por lo que se procedió con el experimento.

Para el ensayo de halo de inhibición, se procedió de igual modo, pero una vez solidificado el agar blando, se colocaron discos de papel whatmann de 5 mm de diámetro, a los que se les había agregado 10 µl de una solución de ketoconazole diluído en DMSO, a distintas concentraciones. Antes de depositar el disco sobre la placa, se dejo evaporar el DMSO, acercando el disco a un mechero encendido por unos segundos, lo suficientemente cerca como para observar que el mismo se seca, pero no tanto como para que se caliente y se deteriore el ketoconazole. Los discos fueron colocados sobre el medio-agar blando con levaduras evaluando distintas concentraciones de la droga para ver el efecto que tenían sobre el crecimiento, y se seleccionó la concentración que resultara óptima para la visualización de la misma. La elección de una concentración de 5 µg de ketoconazole resultó adecuada, ya que concentraciones mayores no permitían medir un halo para las levaduras WRΔ, dado a que éste superaría el tamaño de la placa de Petri.

Los halos de inhibición fueron calculados midiendo el radio del halo desde el centro del disco Whatmann.

5.8.4. Análisis del contenido lipídico de las levaduras

Se partió de cultivos de levaduras en medio SGR de 48 hs. Los cultivos fueron centrifugados 10' a 1000 x g y los pellets resuspendidos y lavados 3 veces con con agua fría. Los cultivos fueron resuspendidos en agua en una concentración de 10^9 células/ml, alicuotados de a 1 ml en tubos eppendorf de 1,5 ml. Los tubos fueron centrifugados y se descartó el sobrenadante. Los pellets obtenidos conteniendo 10^9 células totales fueron liofilizados y conservados -70 ºC para su posterior uso.

5.8.5. Extracción de lípidos

Importante: todos los materiales utilizados para la extracción deben ser de vidrio. No se deben utilizar solventes viejos, particularmente el cloroformo.

1. Los pellets liofilizados fueron transferidos a tubos de vidrio y tratados con 2 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1) por 24 hs a temperatura ambiente.
2. Las moléculas polares fueron eliminadas lavando la fase orgánica con 3 ml de agua milliQ, vortexeando, centrifugando a 1500 rpm por 10 min, y removiendo cuidadosamente la fase acuosa y el material blanco que se forma, dejando en el tubo la capa de cloroformo donde se encuentran los esteroles. Este proceso debe repetirse 3 veces.
3. Los solventes orgánicos se evaporan bajo flujo de N_2.
4. Se resuspende el pellet en 2 ml de cloroformo-metanol (9:1).
5. Repetir 3 veces el paso 2.
6. Se resuspende el pellet en 2 ml de acetonitrilo.
7. Repetir 3 veces el paso 2.
8. Utilizando una pipeta Pasteur, se transfiere la capa de acetonitrilo a un tubo limpio, cuidando de no arrastrar agua o parte del material blanco.
9. Se seca el acetonitrilo bajo flujo de N_2.
10. Los esteroles secos se disuelven en 30 µl de hexano utilizando una jeringa de vidrio y vortex.

11. Los esteroles son derivatizados agregando 70 µl de N,N-bis(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoracetamida (BSFTA) (Pierce), vortexeando nuevamente, transfiriendolo a botellas pequeñas de GC-MS, e incubado al menos 2 h a 37 ºC.

5.8.6. Cromatografía gaseosa y espectrometría de masa

Horno: Temperatura del horno: 200 ºC. Tiempo inicial : 1 min. Temperatura máxima 325 ºC.

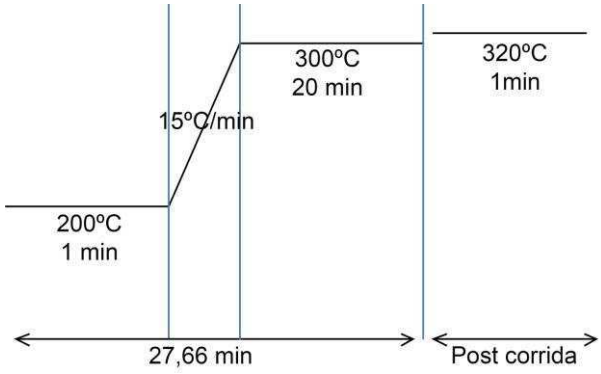
Injector: Para GC/MS: Solvente A: Acetona. Solvente B: Hexano. Volumen de inyección: 3 µl. Número de bombeos: 6.Número de prelavados: 6. Número de post lavados con solvente A: 6. Número de post lavados con solvente B: 6.

Entrada: Modo: Split. Temperatura: 250 ºC. Presión: 16,1 psi. Split ratio: 10.0. Corriente total: 13 ml/min. Tipo de gas: Helio.

Columna: Largo: 30 m. Diámetro 250 µm. Presión" 16,1 psi. Flujo durante la corrida: 1 ml/min. Flujo post corrida: 2,63 ml/min. Velocidad: 39 cm/seg. Modo: flujo constante.

Detector: Temperatura: 230 ºC.

Programa realizado:



5.9. Metodologías realizadas con parásitos

5.9.1. Oligonucleótidos utilizados para el clonado de *Tc*CPR-A y *Tc*CPR-C en el vector pTREX [84].

***Tc*CPR-A**

Fw(HindIII): ACTAAGCTTATGCATGAGGGGGCTGAA

Rv(XhoI): ACTCTCGAGCGCCGACCACGAGTCCAC

***Tc*CPR-C**

Fw(XbaI): TCTAGAATGCTTTTCTACCTAATTGG

Rv(XhoI): CTCGAGCTAGGATGCAGACCAAAC

5.9.2. Extractos proteicos de parásitos

Para la obtención de extractos proteicos totales de *Trypanosoma cruzi*, se recolectaron los parásitos provenientes de un cultivo en medio LIT en fase exponencial (4 días post-repique) mediante centrifugación a 1000 *g* durante 5 minutos. El pellet de parásitos obtenido se lavó con PBS 1x y se resuspendió en 100 µl de buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y 10 mM de 3-aminobenzamida. Los parásitos se mezclaron suavemente y se congelaron a -20°C durante 24 hs. Posteriormente se sometieron a 2 ciclos de 5 segundos de sonicación y se cuantificó la concentración proteica por el método de Bradford. Este procedimiento se aplicó para las 3 formas del parásito.

5.9.3. Localización subcelular mediante inmufluorescencia indirecta

Para determinar la localización subcelular de las proteínas, se utilizaron anticuerpos específicos contra estas proteínas, obtenidos de acuerdo a lo explicado en el apartado “Generación de anticuerpos específicos”. La realización de la inmunodetección se realizó siguiendo el protocolo explicado en el apartado “Inmunofluorescencia indirecta”. Brevemente, tras la fijación de los parásitos, estos se adhirieron a un portaobjetos, tras lo cual se permeabilizaron y se incubaron en

solución de bloqueo. La inmunodetección de *Tc*CPRs se realizó utilizando una dilución adecuada en PBS 1x-Tween 0,05% (v/v)-BSA 1% (p/v) del anticuerpo policlonal contra *Tc*CPRs obtenidos en ratón.

5.9.4. Determinación de las concentraciones de $NADP^+$ y NADPH

Los nicotinamida adenina dinucleótido difosfato ($NADP^+$) y su forma oxidada (NADPH) fueron extraídas según describe Leonardo y col [85]. El ensayo enzimático fue realizado utilizando 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) como aceptor final de electrones. Los procedimientos para este experimento fueron descriptos por Gibson y cols. [86]. Brevemente, una mezcla de MTT, PES (5-ethylphenazinium ethyl sulphate), glucosa 6-P y glucosa 6-P deshidrogenasa fue utilizada para determinar la concentración de $NADP^+$ y NADPH a 30ºC. La reducción del MTT (monitoreada espectrofotométricamente a 570 nm) fue directamente proporcional a la concentración de coenzima.

5.9.5. Análisis de esteroles en *T. cruzi*

El análisis de esteroles fue realizado según Hankins y cols [87]. Aproximadamente 10^7 epimastigotes en 1 ml de medio de cultivo LIT fueron incubados durante 0,5; 1 y 6 horas con 10 μCi de [^{3}H] mevalonolactona, o bien DMSO (control). El pellet fue lavado y extraído con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, v/v) [88]. Los lípidos resultantes fueron separados mediante cromatografía de capa delgada en silica gel (TLC) utilizando tolueno/dietil-eter (9:1, v/v) como solvente de corrida. Los spots correspondientes a los lípidos radioactivos fueron visualizados mediante autoradiografía, utilizando EN^{3}HANCE (Perkin Elmer, Shelto, CT, USA), y luego raspados para conteo en contador de centelleo. Los estándar para esteroles fueron revelados con vapor de iodo (Sigma Co., St Louis, MO, USA) a fin de poder identificar los spots radioactivos

5.9.6. Determinación del orden de membrana

Solución Krebs: (composición en gramos por litro de agua destilada) NaCl 5,5; KCl 0,35; $MgSO_4$-$7H_2O$ 0,29; $CaCl_2$ 0,28; KH_2PO_4 0,16; $NaHCO_3$ 2,1; dextrosa 4,0.

10^8 epimastigotes fueron cosechados y lavados en solución Krebs, y resuspendidos en 300 µl de la misma solución. Las células fueron luego marcadas con la sonda fluorescente 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (Laurdan) durante 15 min a 28ºC, en una concentración final de 0,2 µM. El ensayo de polarización fue realizado en un espectrofotómetro de fluorescencia (modelo Perkin Elmer LS55) a 28 ºC. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 350 nm y se registró la emisión a 430 nm y 480 nm. El valor para la polarización general (GP) fue calculado como la medida relativa del orden de membrana:

$$GP = (I_{430} - I_{480})/(I_{430} + I_{480})$$

El valor de GP asume teóricamente valores que alcanzan +1 (siendo el mayor orden) y -1 (siendo el menor orden de membrana).

5.9.7. Incorporación de FITC-BSA

10^8 epimastigotes fueron cosechados y lavados dos veces con LIT libre de suero (sfLIT). Las células fueron incubadas a 28 ºC por 10 min en sfLIT. Se agregaron 20 µg de FITC-BSA (Molecular Probes, Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y se incubó las células otros 20 min a 28ºC. La reacción fue detenida agregando sfLIT frío, se lavaron una vez a 4 ºC y fijadas con paraformaldehído 4% en PBS por 30 min. La fluorescencia fue cuantificada mediante citómetro de flujo (BD FACS Aria™ Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). El valor medio de fluorescencia fue obtenido a partir de los gráficos de densidad para las poblaciones de células analizadas, a los que se substrajo el correspondiente control de unión inespecífica.

5.9.8. Análisis del ciclo celular

La determinación del contenido de ADN fue realizada mediante citometría de flujo, mediante el método descripto por Nicoletti y col. [89], basado en la tinción del

ADN con ioduro de propidio (PI, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), colorante fluorescente que se intercala en el ADN. La intensidad de fluorescencia es proporcional al contenido de ADN en la célula. 10^8 epimastigotes fueron cosechados y lavados. El pellet de parásitos obtenido se lavó con 1 ml de PBS 1x-EDTA 0,2 mM y se resuspendió en 200 µl de esta misma solución. Los epimastigotes resuspendidos se mezclaron con 5 ml de etanol 70% frío, y se incubaron durante 25 minutos a -20°C, tras lo cual se recolectaron por centrifugación a 3800 g, durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 200 µl de una solución de ioduro de propidio 69 µM en citrato de sodio 34 mM. La fluorescencia fue cuantificada mediante citómetro de flujo (BD FACS Aria™ Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Al menos 10^4 células fueron analizadas por cada muestra utilizando el mismo seteo del equipo.

5.9.9. Microscopía electrónica

5.9.9.1. Microscopía electrónica de transmisión

10^8 epimastigotes fueron cosechados y lavados dos veces con PBS. Los parásitos fueron fijados con una solución de glutaraldehído 2,5% en PBS, 4% formaldehído, pH 7,3 durante 1 hora, y embebidos en resina epoxi, seccionados y teñidos según los métodos estándar para microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss M EM 10C operado a 80 kV.

5.9.9.2. Microscopía electrónica de barrido

Las células fueron fijadas del mismo modo, adheridas a portaobjetos con poli-L-lisina, deshidratadas con etanol, secadas y recubiertas con oro. Los parásitos fueron observados utilizando un microscopio electrónico de barrido Zeiss Supra 40 operado a 3 kV.

5.10. Medición enzimática

La medición de la actividad reductasa fue medido por espectrofotometría, según el protocolo de Kuwahara et al. [55]. La reacción fue realizada utilizando 500 μl de buffer de medición (2X) (ver materiales), 10 μl del dador de electrones (NADPH) 1mM para una concentración final de 100 μM y como aceptor de electrones el citocromo c en una concentración final de 100 μM. El espectro de absorción fue monitoreado a 550 nm utilizando un espectrofotómetro DU 640B Spectrophotometer. El coeficiente de extinción molar utilizado para el cálculo de la concentración de citocromo c es de 21 cm^{-1} mM^{-1}.

Actividad específica = (Δ Abs / ε) / [π], dónde Δ Abs = pendiente de la curva, ε = 21 cm^{-1} mM^{-1} y [π] = concentración en la cubeta.

5.11. Co-inmunoprecipitación

El ensayo de co-inmunoprecipitación se realizó utilizando la resina de agarosa activada Pierce ® NHS-Activated Agarose Dry Resin de Thermo Scientific, de acuerdo a las instrucciones del manual.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Portal P, Fernandez Villamil S, Alonso GD, De Vas MG, Flawia MM, et al. (2008) Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi* suggested role on drug resistance. Molecular and Biochemical Parasitology 160: 42-51.
2. De Vas MG, Portal P, Alonso GD, Schlesinger M, Flawia MM, et al. (2011) The NADPH-cytochrome P450 reductase family in *Trypanosoma cruzi* is involved in the sterol biosynthesis pathway. International Journal for Parasitology 41: 99-108.
3. OMS (2007) Reporte sobre la enfermedad de Chagas. wwwwhoint/tdr.
4. Morel CM, Lazdins J (2003) Chagas disease. Nature reviews Microbiology 1: 14-15.
5. Cardoso AV, Lescano SA, Amato Neto V, Gakiya E, Santos SV (2006) Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 48: 287-289.
6. Yoshida N (2008) *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. Parasitology International 57: 105-109.
7. Guhl F (2007) Chagas disease in Andean countries. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 102 Suppl 1: 29-38.
8. Schmunis GA (2007) Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 102 Suppl 1: 75-85.
9. Docampo R, Moreno SN (1984) Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. Reviews of infectious diseases 6: 223-238.
10. Docampo R, Moreno SN (1986) Free radical metabolism of antiparasitic agents. Federation proceedings 45: 2471-2476.
11. Morello A, Aldunate J, Letelier ME, Repetto Y (1988) Biochemical bases of the action of anti-chagasic drugs. Archivos de biología y medicina experimentales 21: 93-99.
12. Stoppani AO (1999) The chemotherapy of Chagas disease. Medicina 59 Suppl 2: 147-165.
13. Urbina JA (1999) Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. Journal of Molecular Medicine 77: 332-338.
14. Goijman SG, Frasch AC, Stoppani AO (1984) Introduction of changes in the DNA of *Trypanosoma cruzi* by trypanocidal agents. Revista Argentina de Microbiología 16: 75-86.
15. Prata A (1999) Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 81-88.
16. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, et al. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science 309: 409-415.
17. Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M (2001) Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. International journal for parasitology 31: 1218-1226.
18. Tibayrenc M (2003) Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. Kinetoplastid biology and disease 2: 12.
19. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, et al. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 12: 240-253.

20. Cortez C, Martins RM, Alves RM, Silva RC, Bilches LC, et al. (2012) Differential infectivity by the oral route of *Trypanosoma cruzi* lineages derived from Y strain. PLoS neglected tropical diseases 6: e1804.
21. Xavier SC, Roque AL, Lima Vdos S, Monteiro KJ, Otaviano JC, et al. (2012) Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. PLoS neglected tropical diseases 6: e1647.
22. De Souza W (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Current pharmaceutical design 8: 269-285.
23. Tyler KM, Engman DM (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. International Journal for Parasitology 31: 472-481.
24. Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W (2012) Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. PLoS neglected tropical diseases 6: e1749.
25. de Souza W (1999) A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 17-36.
26. De Souza W (2002) From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid biology and disease 1: 3.
27. Atwood JA, 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, et al. (2005) The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science 309: 473-476.
28. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, et al. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science 309: 416-422.
29. McKean PG (2003) Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. Current Opinion in Microbiology 6: 600-607.
30. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, et al. (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science 309: 404-409.
31. Elias MC, Faria M, Mortara RA, Motta MC, de Souza W, et al. (2002) Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. Eukaryotic cell 1: 944-953.
32. Santos CC, Sant'anna C, Terres A, Cunha-e-Silva NL, Scharfstein J, et al. (2005) Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. Journal of cell science 118: 901-915.
33. Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenco D, de Souza W, et al. (2009) Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. Proteomics 9: 1782-1794.
34. Cunha-e-Silva NL, Atella GC, Porto-Carreiro IA, Morgado-Diaz JA, Pereira MG, et al. (2002) Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. FEMS microbiology letters 214: 7-12.
35. Lepesheva GI, Hargrove TY, Anderson S, Kleshchenko Y, Furtak V, et al. (2010) Structural insights into inhibition of sterol 14alpha-demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Journal of Biological Chemistry 285: 25582-25590.
36. Sant'Anna C, de Souza W, Cunha-e-Silva N (2004) Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada 10: 637-646.
37. Cunha-e-Silva N, Sant'Anna C, Pereira MG, Porto-Carreiro I, Jeovanio AL, et al. (2006) Reservosomes: multipurpose organelles? Parasitology research 99: 325-327.
38. de Souza W, Sant'Anna C, Cunha-e-Silva NL (2009) Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. Progress in histochemistry and cytochemistry 44: 67-124.
39. Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N (2000) *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. European journal of cell biology 79: 858-869.

40. Djordjevic VB (2004) Free radicals in cell biology. International review of cytology 237: 57-89.
41. Mylonas C, Kouretas D (1999) Lipid peroxidation and tissue damage. In vivo 13: 295-309.
42. Davies MJ (2005) The oxidative environment and protein damage. Biochimica et biophysica acta 1703: 93-109.
43. Ullrich V, Kissner R (2006) Redox signaling: bioinorganic chemistry at its best. Journal of inorganic biochemistry 100: 2079-2086.
44. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E (2004) Oxidative stress and cell signalling. Current medicinal chemistry 11: 1163-1182.
45. Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B (2007) The oxidative hypothesis of senescence. Journal of postgraduate medicine 53: 207-213.
46. Krauth-Siegel RL, Comini MA (2008) Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. Biochimica et biophysica acta 1780: 1236-1248.
47. Jockers-Scherubl MC, Schirmer RH, Krauth-Siegel RL (1989) Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. European journal of biochemistry / FEBS 180: 267-272.
48. Krauth-Siegel RL, Inhoff O (2003) Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. Parasitology research 90 Suppl 2: S77-85.
49. Irigoin F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, Flohe L, et al. (2008) Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. Free radical biology & medicine 45: 733-742.
50. Temperton NJ, Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM (1998) Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. Molecular and biochemical parasitology 96: 167-176.
51. Iyanagi T (2007) Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. International review of cytology 260: 35-112.
52. Mansuy D (1998) The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. Comparative biochemistry and physiology Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology 121: 5-14.
53. Mason HS, North JC, Vanneste M (1965) Microsomal mixed-function oxidations: the metabolism of xenobiotics. Federation proceedings 24: 1172-1180.
54. Iyanagi T (2005) Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. Biochemical and biophysical research communications 338: 520-528.
55. Kuwahara T, White RA, Jr., Agosin M (1985) A cytosolic FAD-containing enzyme catalyzing cytochrome c reduction in *Trypanosoma cruzi*. I. Purification and some properties. Archives of biochemistry and biophysics 239: 18-28.
56. Backes WL, Kelley RW (2003) Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. Pharmacology & therapeutics 98: 221-233.
57. Murataliev MB, Feyereisen R, Walker FA (2004) Electron transfer by diflavin reductases. Biochimica et biophysica acta 1698: 1-26.
58. De Boiso JF, Stoppani AO (1971) Microsomal hemoproteins in *Trypanosoma cruzi*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine 136: 215-221.
59. De Boiso JF, Docampo R, Stoppani AO (1979) Cytochromes in epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Revista Argentina de microbiologia 11: 22-36.
60. Agosin M, Naquira C, Paulin J, Capdevila J (1976) Cytochrome P-450 and drug metabolism in *Trypanosoma cruzi*: effects of phenobarbital. Science 194: 195-197.

61. Berger BJ, Fairlamb AH (1993) Cytochrome P450 in trypanosomatids. Biochemical pharmacology 46: 149-157.
62. Lepesheva GI, Hargrove TY, Ott RD, Nes WD, Waterman MR (2006) Biodiversity of CYP51 in trypanosomes. Biochemical Society transactions 34: 1161-1164.
63. Lepesheva GI, Waterman MR (2007) Sterol 14alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. Biochimica et biophysica acta 1770: 467-477.
64. Lepesheva GI, Zaitseva NG, Nes WD, Zhou W, Arase M, et al. (2006) CYP51 from *Trypanosoma cruzi*: a phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14alpha-demethylase. The Journal of biological chemistry 281: 3577-3585.
65. Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, et al. (2003) Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. Molecular and biochemical parasitology 126: 129-142.
66. Urbina JA, Vivas J, Visbal G, Contreras LM (1995) Modification of the sterol composition of *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* epimastigotes by delta 24(25)-sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. Molecular and biochemical parasitology 73: 199-210.
67. Liendo A, Visbal G, Piras MM, Piras R, Urbina JA (1999) Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. Molecular and biochemical parasitology 104: 81-91.
68. de Souza W, Rodrigues JC (2009) Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases 2009: 642502.
69. Urbina JA (2009) Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 104 Suppl 1: 311-318.
70. Lepesheva GI, Ott RD, Hargrove TY, Kleshchenko YY, Schuster I, et al. (2007) Sterol 14alpha-demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. Chemistry & biology 14: 1283-1293.
71. Buckner FS, Urbina JA (2012) Recent Developments in Sterol 14-demethylase Inhibitors for Chagas Disease. International journal for parasitology, drugs and drug resistance 2: 236-242.
72. Veiga-Santos P, Barrias ES, Santos JF, de Barros Moreira TL, de Carvalho TM, et al. (2012) Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. International journal of antimicrobial agents 40: 61-71.
73. Lepesheva GI, Villalta F, Waterman MR (2011) Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14alpha-demethylase (CYP51). Advances in parasitology 75: 65-87.
74. Pinazo MJ, Espinosa G, Gallego M, Lopez-Chejade PL, Urbina JA, et al. (2010) Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. The American journal of tropical medicine and hygiene 82: 583-587.
75. Soustre I, Girard P, Karst F (1998) Biosynthesis and transport of sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Comptes rendus des séances de la Societé de biologie et de ses filiales 192: 977-990.
76. Parks LW, Casey WM (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. Annual review of microbiology 49: 95-116.
77. Tiedje C, Holland DG, Just U, Hofken T (2007) Proteins involved in sterol synthesis interact with Ste20 and regulate cell polarity. Journal of cell science 120: 3613-3624.
78. Cowen LE, Steinbach WJ (2008) Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. Eukaryotic cell 7: 747-764.
79. Urbina JA (1997) Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. Parasitology 114 Suppl: S91-99.

80. Paveto C, Pereira C, Espinosa J, Montagna AE, Farber M, et al. (1995) The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. The Journal of biological chemistry 270: 16576-16579.
81. Jachymova M, Martasek P, Panda S, Roman LJ, Panda M, et al. (2005) Recruitment of governing elements for electron transfer in the nitric oxide synthase family. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 15833-15838.
82. Truan G, Epinat JC, Rougeulle C, Cullin C, Pompon D (1994) Cloning and characterization of a yeast cytochrome b5-encoding gene which suppresses ketoconazole hypersensitivity in a NADPH-P-450 reductase-deficient strain. Gene 142: 123-127.
83. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of molecular biology 166: 557-580.
84. Vazquez MP, Levin MJ (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.
85. Leonardo MR, Dailly Y, Clark DP (1996) Role of NAD in regulating the adhE gene of *Escherichia coli*. Journal of bacteriology 178: 6013-6018.
86. Gibon Y, Larher F (1997) Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. Analytical biochemistry 251: 153-157.
87. Hankins EG, Gillespie JR, Aikenhead K, Buckner FS (2005) Upregulation of sterol C14-demethylase expression in *Trypanosoma cruzi* treated with sterol biosynthesis inhibitors. Molecular and biochemical parasitology 144: 68-75.
88. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian journal of biochemistry and physiology 37: 911-917.
89. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Journal of immunological methods 139: 271-279.
90. Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL (2005) Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. The Journal of Cntimicrobial chemotherapy 55: 780-784.
91. Rodrigues CO, Catisti R, Uyemura SA, Vercesi AE, Lira R, et al. (2001) The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different sensitivity to digitonin-permeabilization. Journal of Eukaryotic Microbiology 48: 588-594.
92. Quinones W, Urbina JA, Dubourdieu M, Luis Concepcion J (2004) The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: protein and lipid composition. Experimental Parasitology 106: 135-149.
93. Pratt S, Wansadhipathi-Kannangara NK, Bruce CR, Mina JG, Shams-Eldin H, et al. (2012) Sphingolipid synthesis and scavenging in the intracellular apicomplexan parasite, *Toxoplasma gondii*. Molecular and biochemical parasitology 187: 43-51.
94. Kwasnicka-Crawford DA, Vincent SR (2005) Role of a novel dual flavin reductase (NR1) and an associated histidine triad protein (DCS-1) in menadione-induced cytotoxicity. Biochemical and biophysical research communications 336: 565-571.
95. Olteanu H, Banerjee R (2001) Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. The Journal of biological chemistry 276: 35558-35563.
96. Vernis L, Facca C, Delagoutte E, Soler N, Chanet R, et al. (2009) A newly identified essential complex, Dre2-Tah18, controls mitochondria integrity and cell death after oxidative stress in yeast. PloS one 4: e4376.
97. Netz DJ, Stumpfig M, Dore C, Muhlenhoff U, Pierik AJ, et al. (2010) Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. Nature chemical biology 6: 758-765.

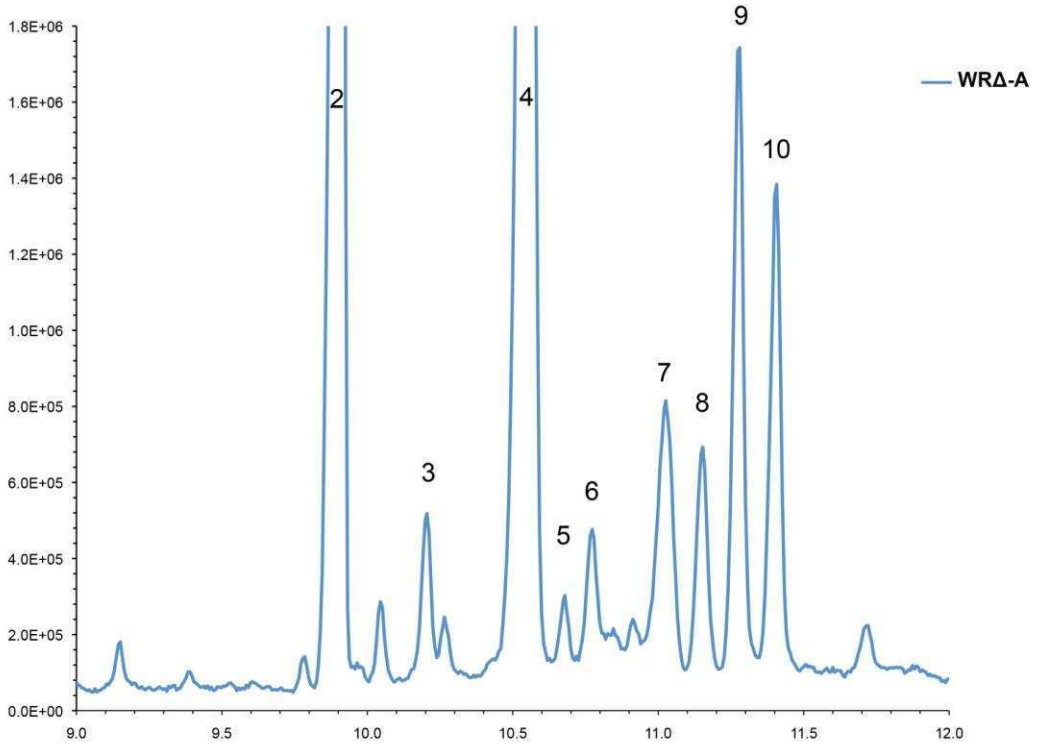
98. Nishimura A, Kawahara N, Takagi H (2013) The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. Biochemical and biophysical research communications 430: 137-143.
99. Mercer EI (1993) Inhibitors of sterol biosynthesis and their applications. Progress in lipid research 32: 357-416.
100. Cournia Z, Ullmann GM, Smith JC (2007) Differential effects of cholesterol, ergosterol and lanosterol on a dipalmitoyl phosphatidylcholine membrane: a molecular dynamics simulation study. The journal of physical chemistry B 111: 1786-1801.
101. Parasassi T, De Stasio G, d'Ubaldo A, Gratton E (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. Biophysical journal 57: 1179-1186.
102. Nyholm T, Nylund M, Soderholm A, Slotte JP (2003) Properties of palmitoyl phosphatidylcholine, sphingomyelin, and dihydrosphingomyelin bilayer membranes as reported by different fluorescent reporter molecules. Biophysical journal 84: 987-997.
103. Isin EM, Guengerich FP (2007) Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. Biochim Biophys Acta 1770: 314-329.
104. Bath (2001) Introduction to Drug Metabolism.
105. Cheng J, Wan DF, Gu JR, Gong Y, Yang SL, et al. (2006) Establishment of a yeast system that stably expresses human cytochrome P450 reductase: application for the study of drug metabolism of cytochrome P450s in vitro. Protein Expression and Purification 47: 467-476.
106. Louerat-Oriou B, Perret A, Pompon D (1998) Differential redox and electron-transfer properties of purified yeast, plant and human NADPH-cytochrome P-450 reductases highly modulate cytochrome P-450 activities. European Journal of Biochemistry 258: 1040-1049.
107. Koopmann E, Hahlbrock K (1997) Differentially regulated NADPH:cytochrome P450 oxidoreductases in parsley. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 94: 14954-14959.
108. Gonzalez-Kristeller DC, Farage L, Fiorini LC, Loomis WF, da Silva AM (2008) The P450 oxidoreductase, RedA, controls development beyond the mound stage in Dictyostelium discoideum. BMC developmental biology 8: 8.
109. Doehmer J, Goeptar AR, Vermeulen NP (1993) Cytochromes P450 and drug resistance. Cytotechnology 12: 357-366.
110. Munro AW, McLean KJ, Marshall KR, Warman AJ, Lewis G, et al. (2003) Cytochromes P450: novel drug targets in the war against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemical Society Transactions 31: 625-630.
111. Na-Bangchang K, Bray PG, Ward SA (2007) Study on the biochemical basis of mefloquine resistant *Plasmodium falciparum*. Experimental Parasitology 117: 141-148.
112. Zhu F, Feng JN, Zhang L, Liu N (2008) Characterization of two novel cytochrome P450 genes in insecticide-resistant house-flies. Insect Mol Biol 17: 27-37.
113. Nes WR, and McKean, M.R. , editor (1977) Biochemistry of steroids and other isopentenoids: Baltimore: University Park Press.
114. Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, et al. (2003) Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. Molecular and Biochemical Parasitology 126: 129-142.
115. Vanden Bossche H, Koymans L, Moereels H (1995) P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. Pharmacol Ther 67: 79-100.
116. Agosin M, Cherry A, Pedemonte J, White R (1984) Cytochrome P-450 in culture forms of *Trypanosoma cruzi*. Comparative Biochemistry and Physiology C 78: 127-132.
117. Berger BJ, Fairlamb AH (1993) Cytochrome P450 in trypanosomatids. Biochemical Pharmacology 46: 149-157.

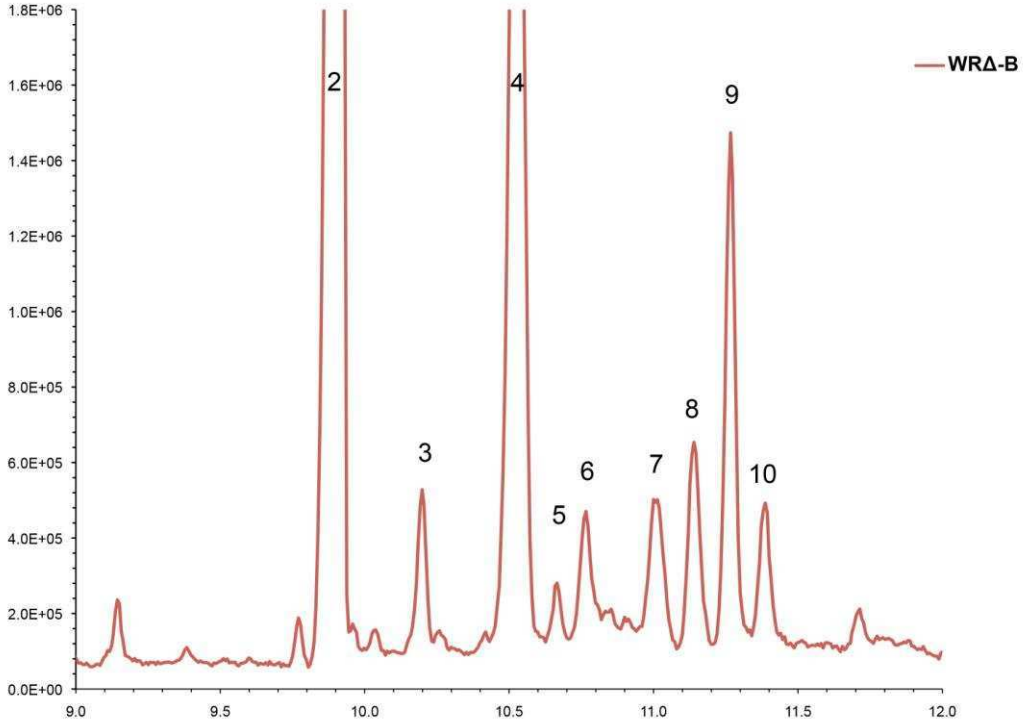
118. Lepesheva GI, Ott RD, Hargrove TY, Kleshchenko YY, Schuster I, et al. (2007) Sterol 14alpha-demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. Chemical Biology 14: 1283-1293.
119. Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL (2005) Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. Journal of Antimicrobial Chemotheraphy 55: 780-784.
120. Manoj KM, Gade SK, Mathew L (2010) Cytochrome P450 reductase: a harbinger of diffusible reduced oxygen species. PloS one 5: e13272.
121. Rapoport TA, Goder V, Heinrich SU, Matlack KE (2004) Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. Trends in cell biology 14: 568-575.
122. Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. Nature 450: 663-669.

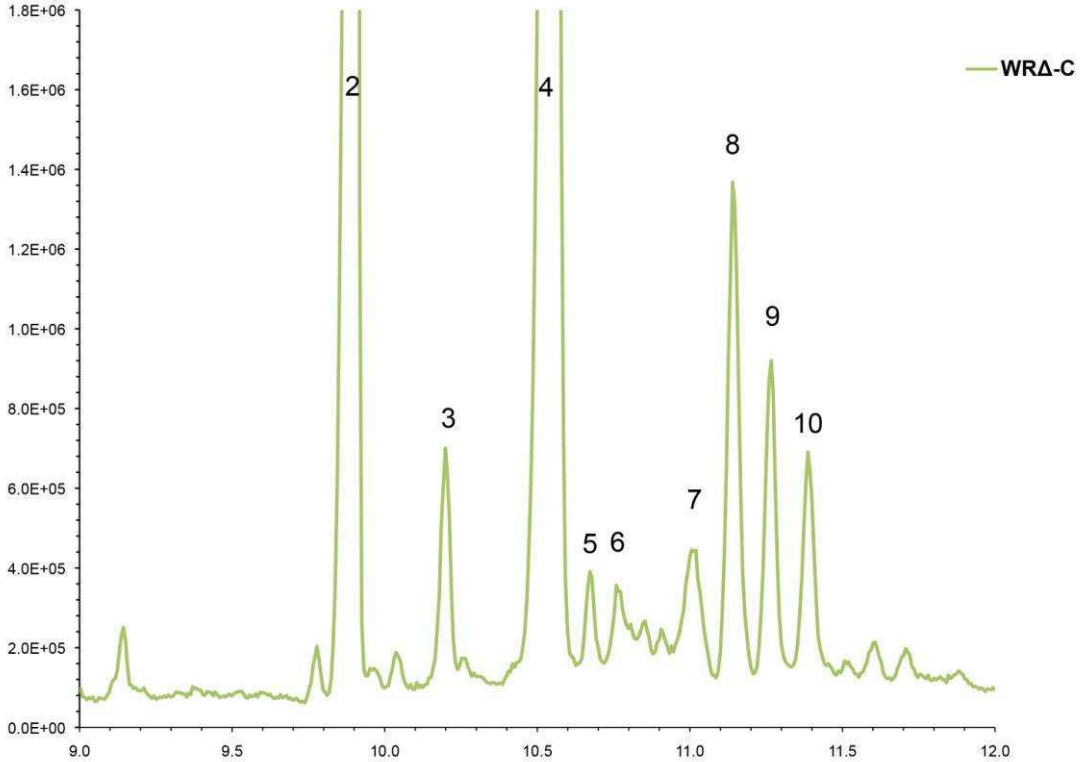
ANEXO

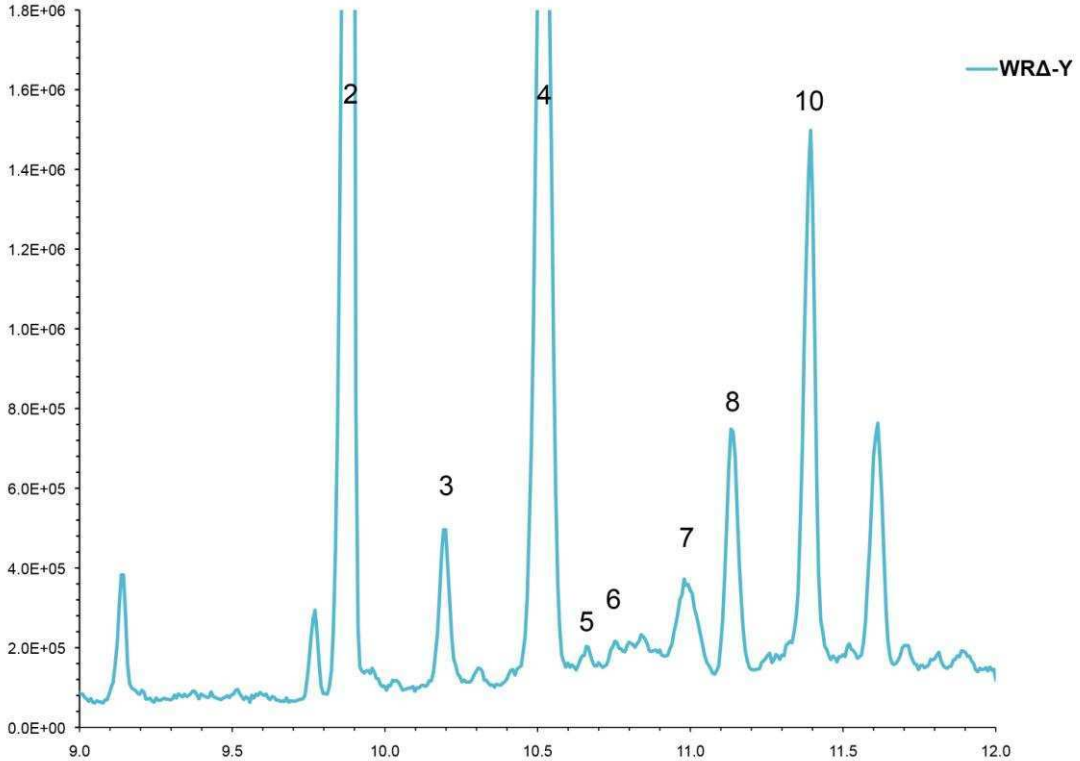
7. ANEXO

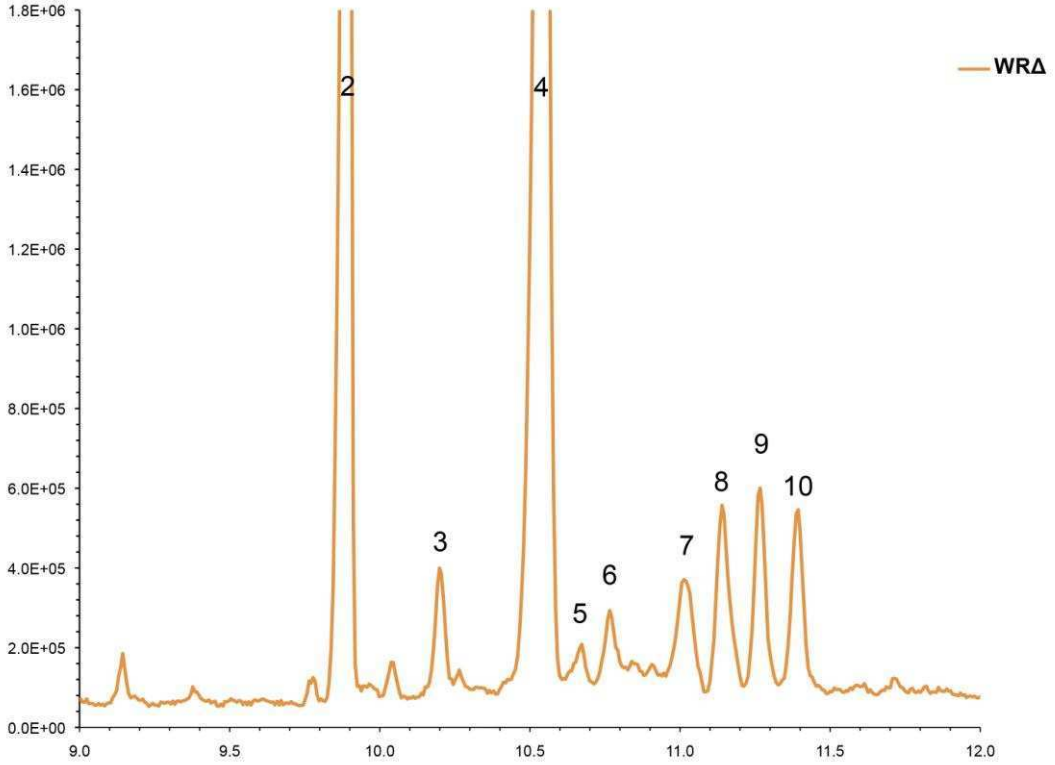
7.1. Cromatogramas

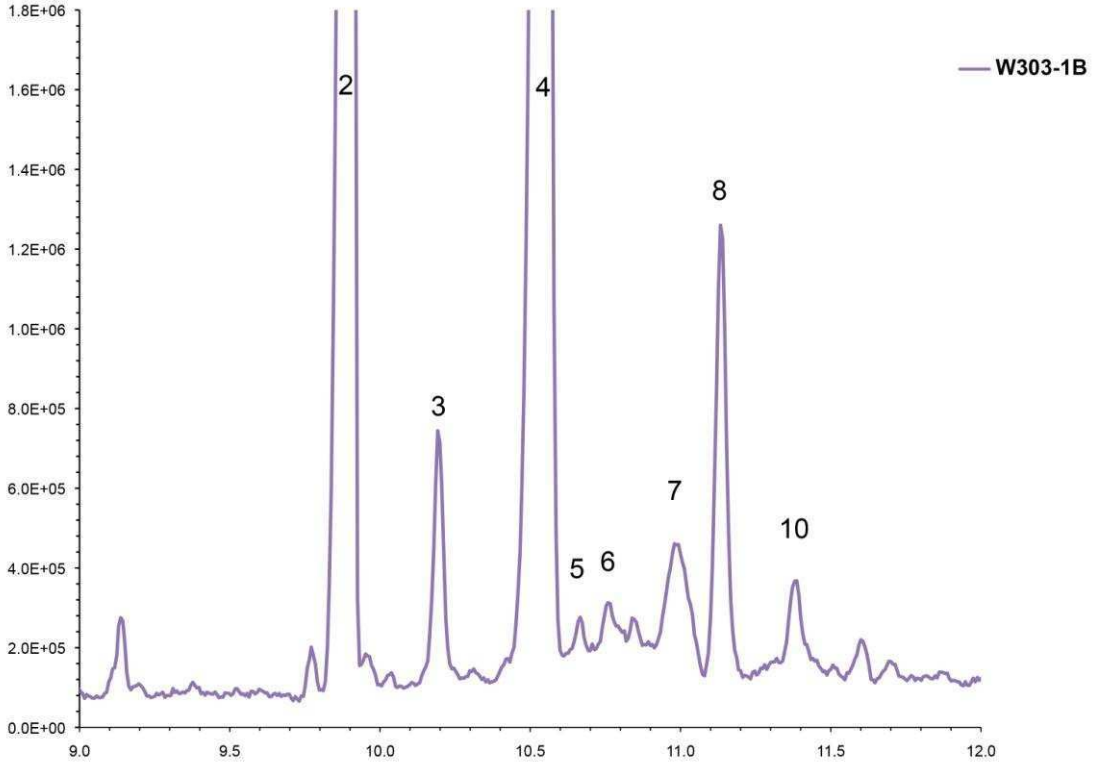




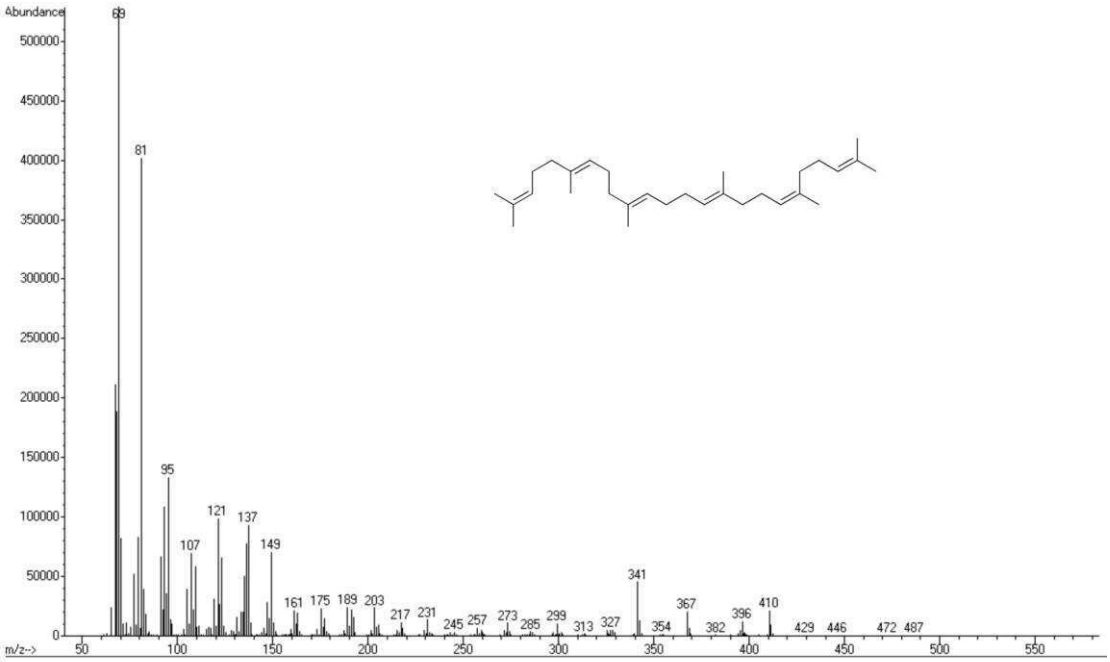

WRΔ-C
1.8E+06
1.6E+06
1.4E+06
1.2E+06
1.0E+06
8.0E+05
6.0E+05
4.0E+05
2.0E+05
0.0E+00
9.0
9.5
10.0
10.5
11.0
11.5
12.0
2
3
4
5
6
7
8
9
10


WRΔ-Y
1.8E+06
1.6E+06
1.4E+06
1.2E+06
1.0E+06
8.0E+05
6.0E+05
4.0E+05
2.0E+05
0.0E+00
9.0
9.5
10.0
10.5
11.0
11.5
12.0
2
3
4
5
6
7
8
10

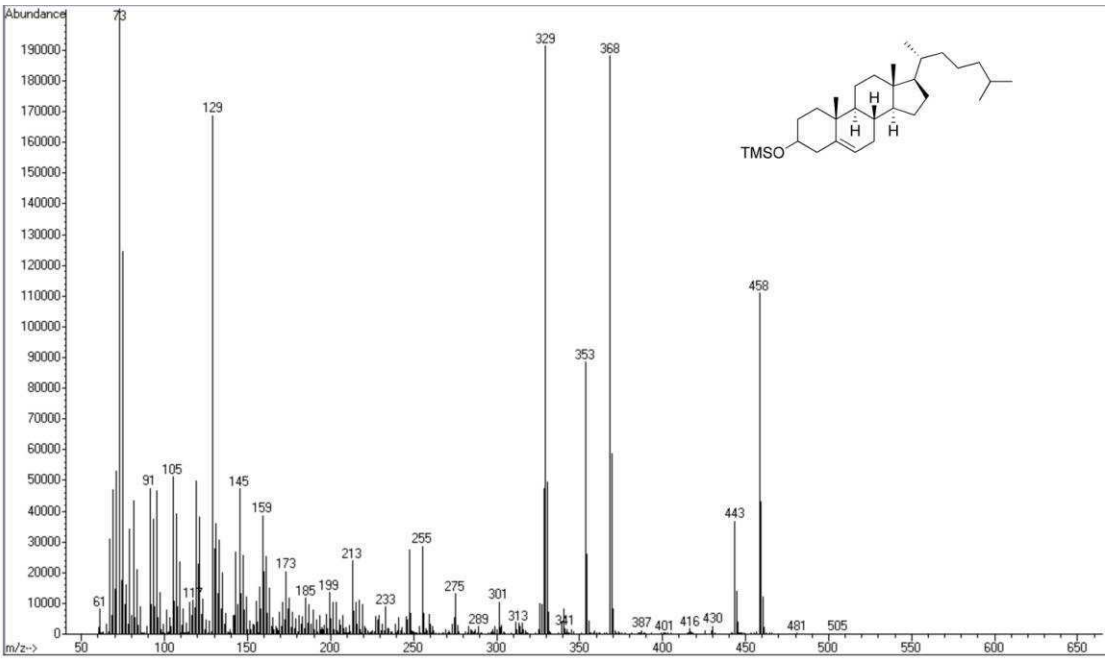

WRΔ
1.8E+06
1.6E+06
1.4E+06
1.2E+06
1.0E+06
8.0E+05
6.0E+05
4.0E+05
2.0E+05
0.0E+00
9.0
9.5
10.0
10.5
11.0
11.5
12.0
2
3
4
5
6
7
8
9
10


W303-1B
1.8E+06
1.6E+06
1.4E+06
1.2E+06
1.0E+06
8.0E+05
6.0E+05
4.0E+05
2.0E+05
0.0E+00
9.0
9.5
10.0
10.5
11.0
11.5
12.0
2
3
4
5
6
7
8
10

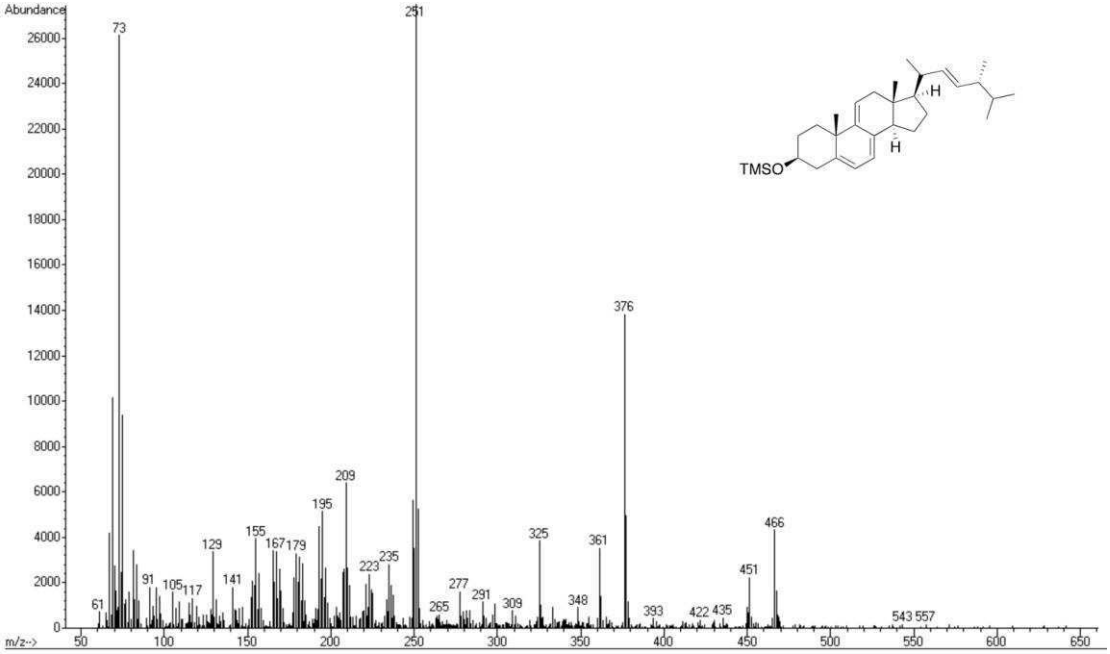
7.2. Espectrometría de masa



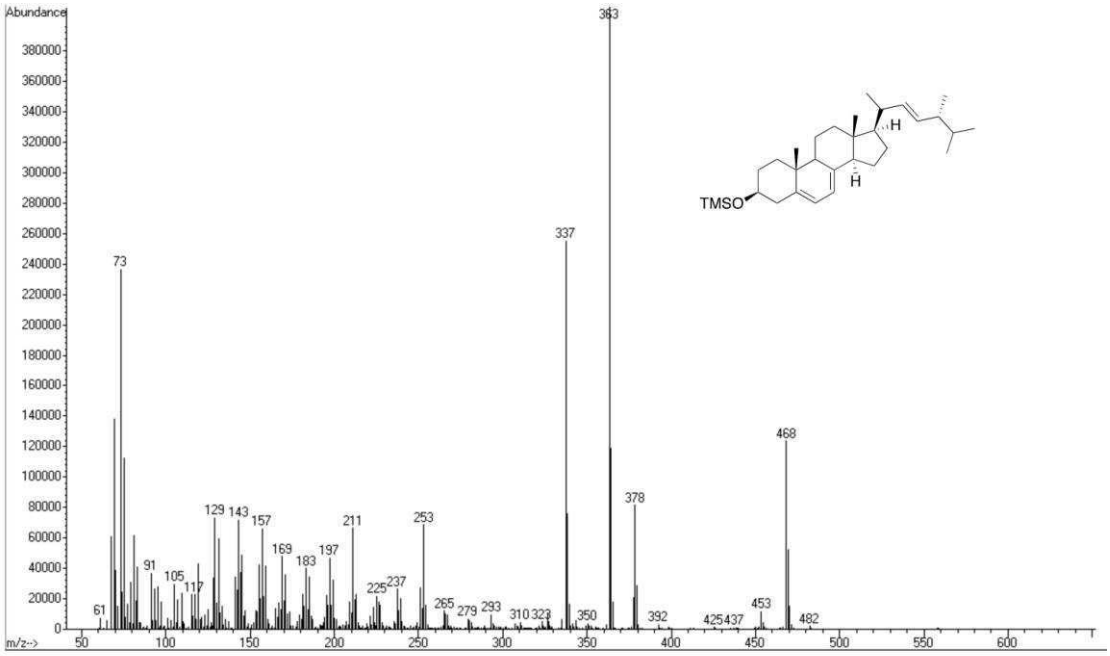
Peak #1: Electron impact mass spectrum (EIMS) of squalene.
RT = 7.8 – 7.9 min $[M]^{+\bullet}$ = 410 *m/z*



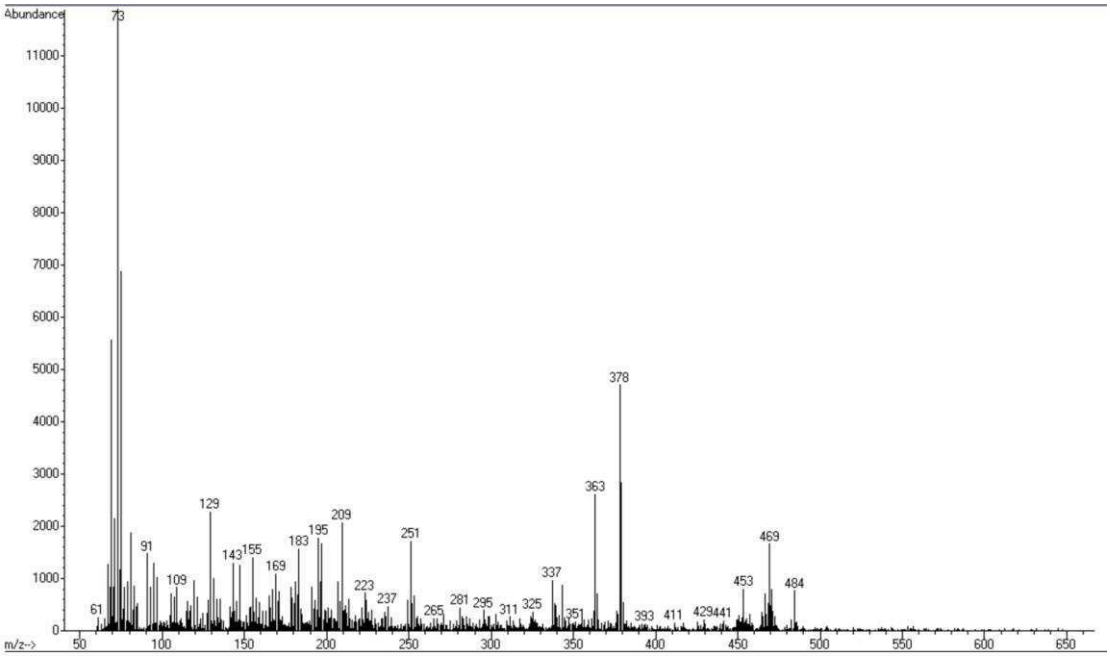
Peak #2: (EIMS) of cholesterol-TMS-ether.
RT = 9.8 – 9.9 min. $[M]^{+\bullet}$ = 458 *m/z*



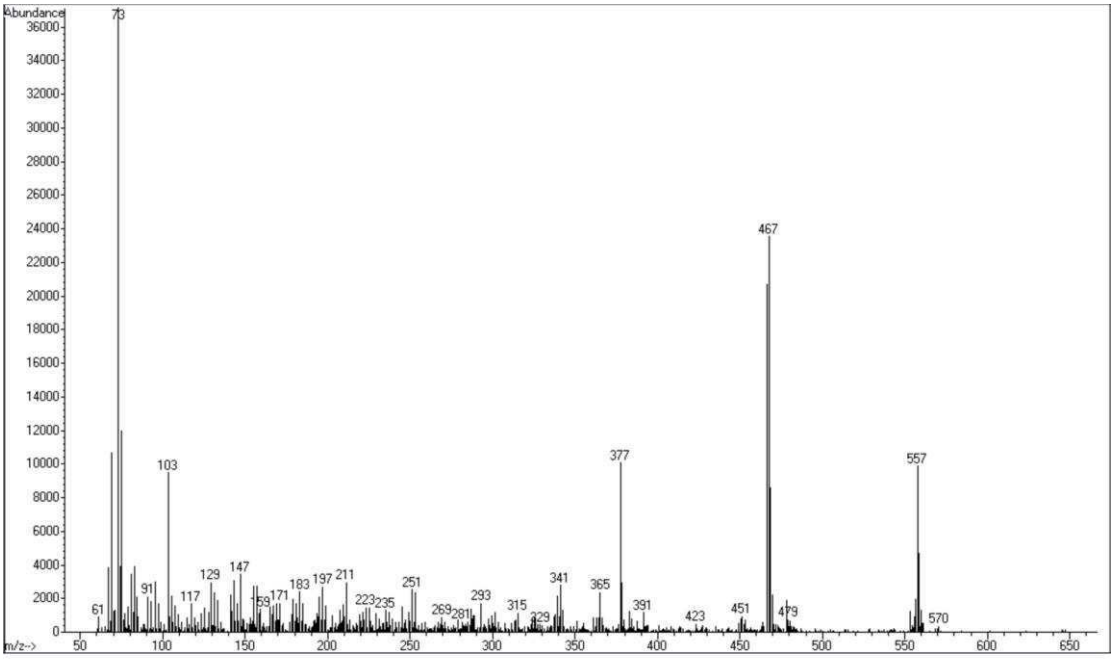
Peak #3: (EIMS) of ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-beta-ol TMS ether (dehydroergosterol-TMS ether). RT = 10.1 – 10.2 min. $[M]^{+\bullet}$ = 466 *m/z*



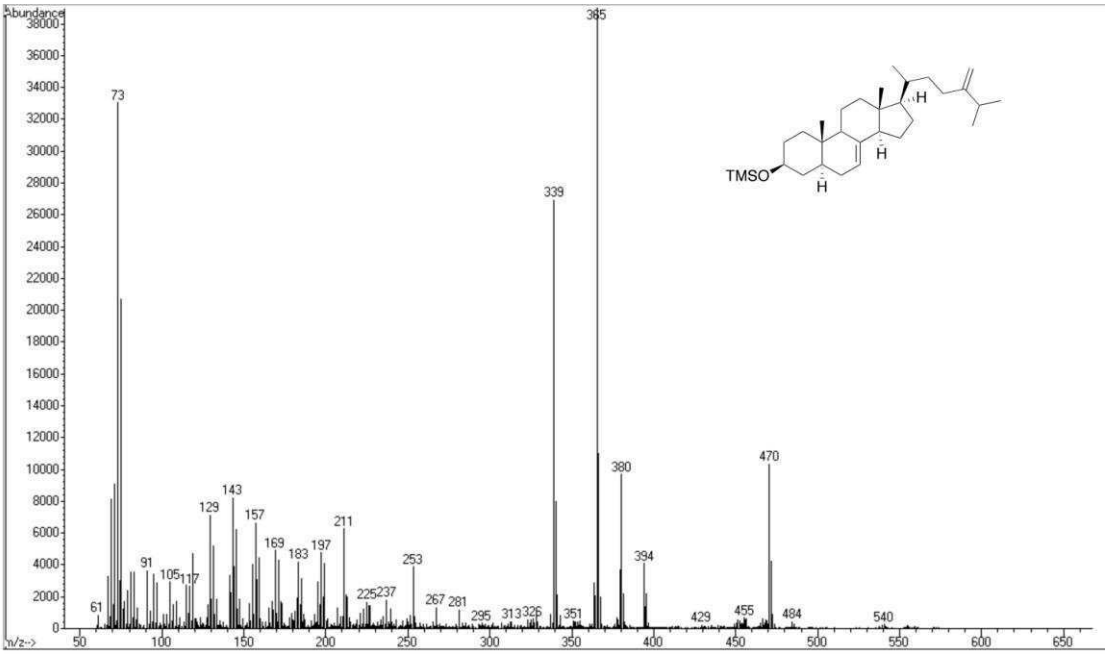
Peak #4: (EIMS) of ergosterol-TMS-ether. RT = 10.46 – 10.59 min. $[M]^{+\bullet}$ = 468 *m/z*



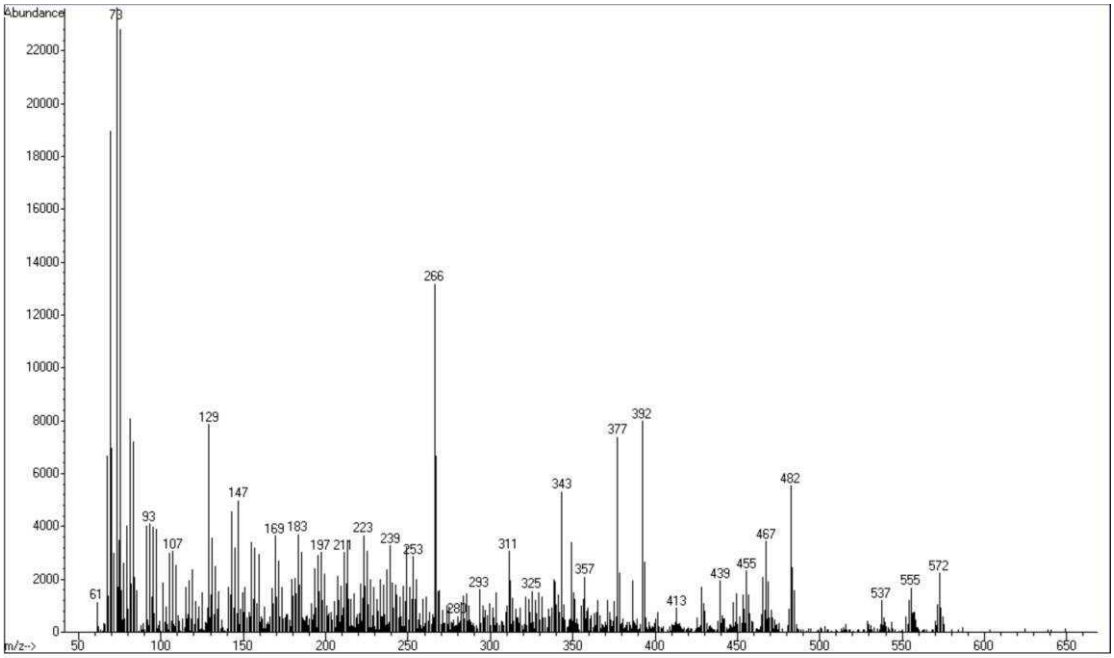
Peak #5: (EIMS) 4-methyl fecosterol or 14-methyl fecosterol.
RT = 10.63 – 10.71min. $[M]^{+\bullet}$ = 484 *m/z*



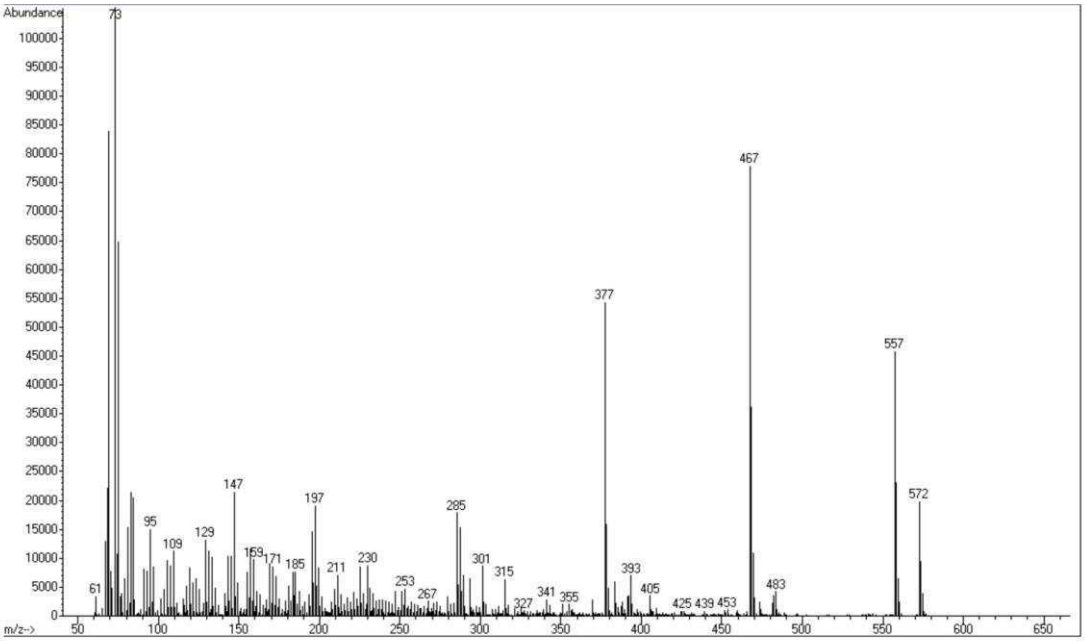
Peak #6: (EIMS) of 14-α-methylergosta-8,24(28)-diene-3β-6α-diol-TMS ether
RT = 10.7 – 10.77 min. $[M]^{+\bullet}$ = 570 *m/z*



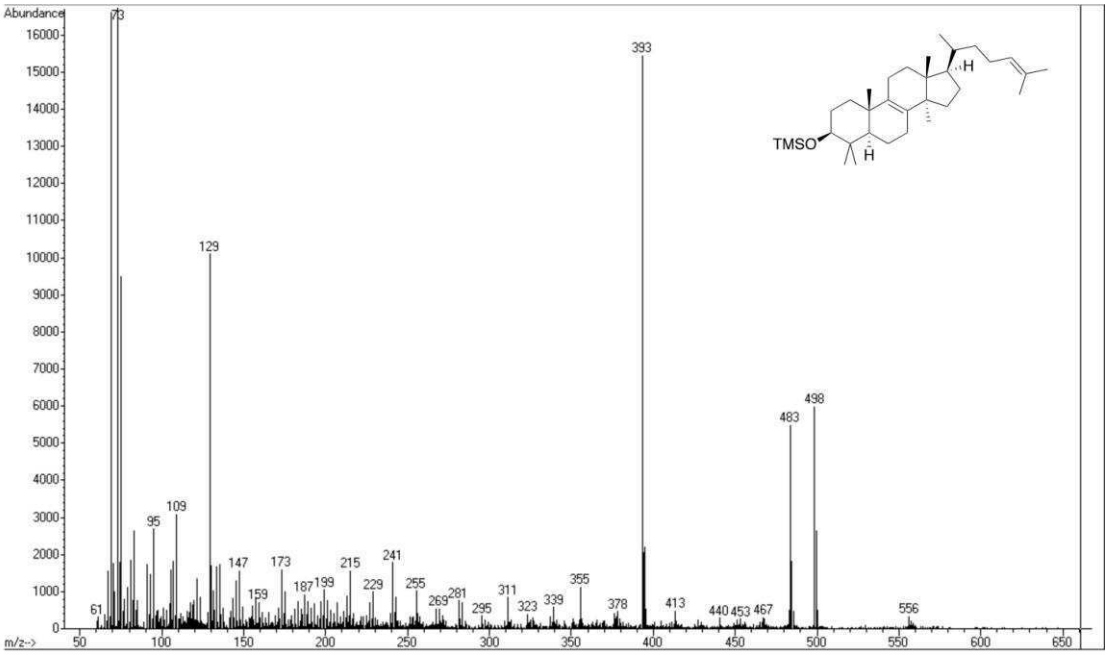
Peak #7: (EIMS) of episterol TMS ether. RT = 10.9 – 11.05 min.
$[M]^{+\bullet}$ = 470 *m/z*



Peak #8: (EIMS) of C4-dimethyl or C4-hydroxy intermediate
RT = 11.12 – 11.17 min. $[M]^{+\bullet}$ = 572 *m/z*



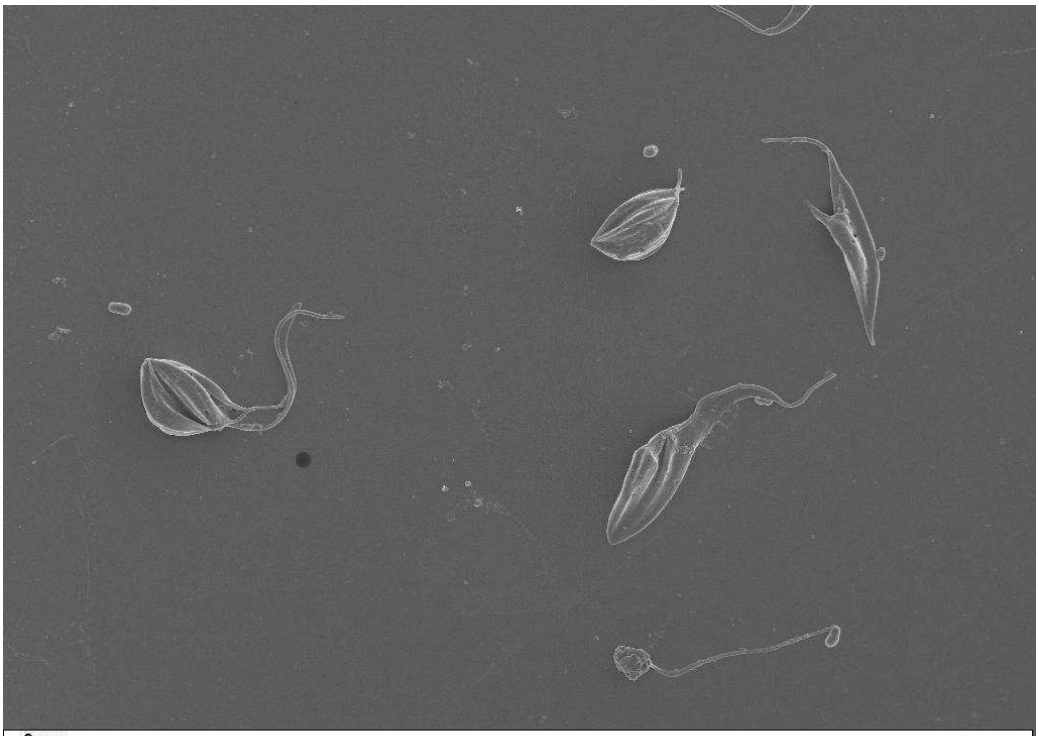
Peak #9: (EIMS) of C4-dimethyl, C4-hydroxy intermed.? Or 14-alphamethylergosta-3,6 diol ether
RT = 11.21– 11.37 min. $[M]^{+\bullet}$ = 572 *m/z*

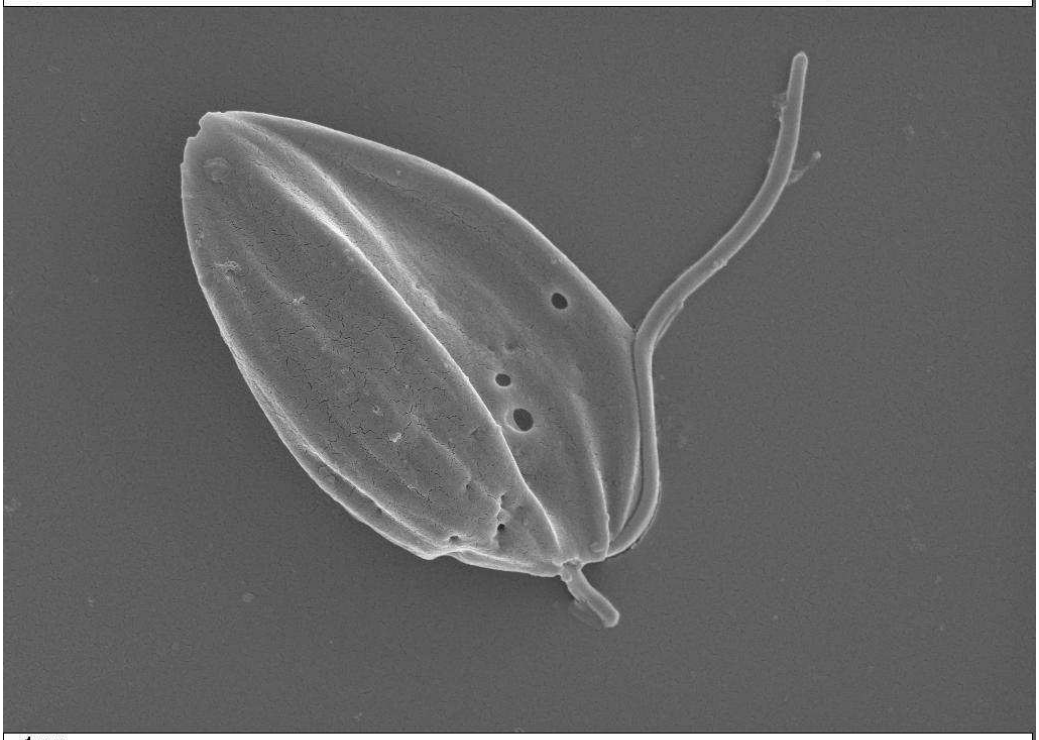


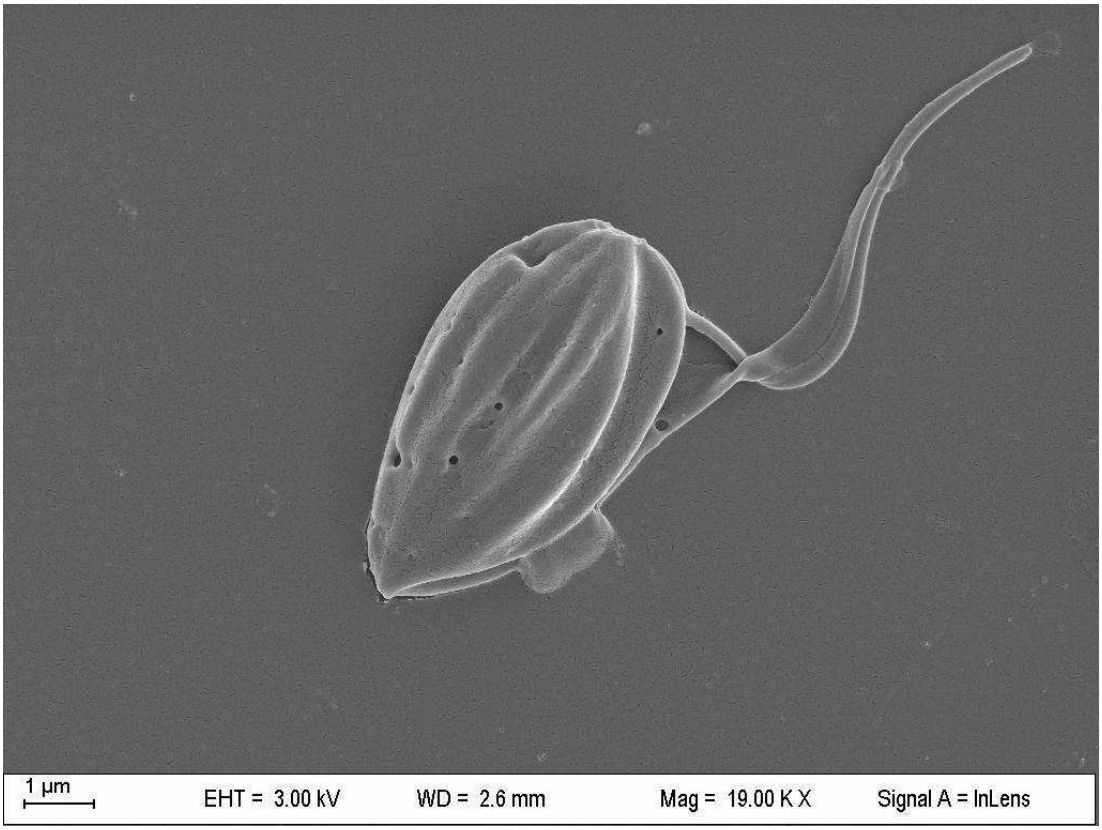
Peak #10: (EIMS) of lanosterol-TMS-ether.
RT = 11.3 – 11.4 min. $[M]^{+\bullet}$ = 498 *m/z*

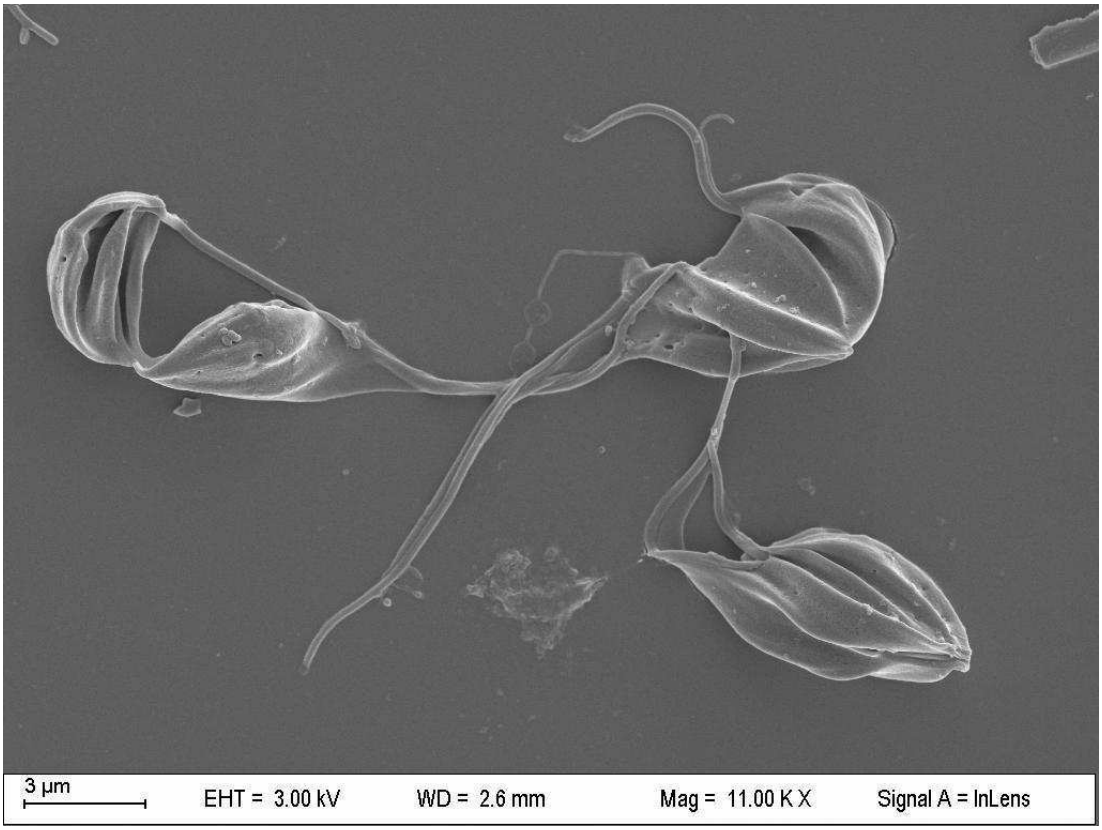
7.3. Microscopías de barrido

7.3.1. Parásitos pTREX-*Tc*CPR-A






1 µm
EHT = 3.00 kV
WD = 2.6 mm
Mag = 19.00 K X
Signal A = InLens


3 µm
EHT = 3.00 kV
WD = 2.6 mm
Mag = 11.00 K X
Signal A = InLens