



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

# **Estudio funcional de la enzima tripanotion sintetasa en la biología de *Trypanosoma cruzi* y la interfase patógeno-hospedador**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de  
Química Biológica

**Lic. Andrea Cecilia Mesías**

**Directora:** Dra. María Paola Zago

**Consejera:** Dra. Carolina Carrillo

**Lugar de trabajo:** Instituto de Patología Experimental, CONICET-Universidad Nacional de Salta

**Fecha de defensa:** 22 de marzo de 2019

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2019

# Estudio funcional de la enzima tripanotión sintetasa en la biología de *Trypanosoma cruzi* y la interfase patógeno-hospedador

## RESUMEN

*Trypanosoma cruzi* es el parásito causante de la Enfermedad de Chagas, la cual continúa siendo una problemática de salud pública desatendida que merece una atención prioritaria no solo en nuestro país, sino a nivel mundial. A lo largo de su ciclo de vida, este patógeno utiliza una elaborada red enzimática para superar las barreras oxidativas y establecer la infección en el contexto del vector y del hospedador mamífero. La enzima tripanotión sintetasa (TryS), es clave ya que cataliza la biosíntesis de tripanotión (T[SH]<sub>2</sub>), el principal tiol utilizado por el sistema antioxidante de los tripanosomátidos. En este trabajo, mediante un abordaje de sobre-expresión e inhibición farmacológica, analizamos el rol de la enzima TryS en la biología de *T. cruzi*, evaluando su efecto sobre la proliferación, la tolerancia al estrés oxidativo y la resistencia a drogas anti-parasitarias. De acuerdo a nuestros resultados, los epimastigotes sobre-expresantes (TryS<sup>hi</sup>) mostraron un menor tiempo de duplicación y mayor capacidad de metacicloénesis. Además, tanto epimastigotes como tripomastigotes TryS<sup>hi</sup> presentaron una mayor tolerancia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a las drogas tripanocidas utilizadas en la actualidad: benznidazol y nifurtimox. El tratamiento con inhibidores específicos de TryS, anuló estas ventajas de una manera dosis-dependiente. Por otro lado, el análisis de la interacción de los parásitos TryS<sup>hi</sup> con macrófagos murinos *in vitro*, sugiere que la sobre-expresión de TryS tendría un efecto pro-inflamatorio y pro-apoptótico, que podría favorecer su escape temprano de la célula infectada. A través de este enfoque, se puso de manifiesto no sólo el carácter esencial de TryS para *T. cruzi* en condiciones normales y de estrés oxidativo, sino también que su expresión le confiere una ventaja en la resistencia frente a los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad. Postulamos que el uso de un inhibidor de esta enzima, solo o combinado con los tratamientos disponibles, podría ser una nueva estrategia terapéutica para combatir la Enfermedad de Chagas.

**PALABRAS CLAVES:** *TRYPANOSOMA CRUZI*, SISTEMA ANTIOXIDANTE, TRIPANOTIÓN SINTETASA, ESTRÉS OXIDATIVO, DROGAS TRIPANOCIDAS, RELACIÓN PATÓGENO-HOSPEDADOR

## Functional analysis of trypanothione synthetase enzyme in *Trypanosoma cruzi* biology and the pathogen-host interplay

### ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* infection, continues to be a neglected illness, which demands urgent attention not only in our country but also at global level. During its life cycle, the parasite utilizes an elaborated antioxidant network to overcome the oxidant barriers and establish infection in vector and mammalian hosts. Trypanothione synthetase (TryS) is a determinant enzyme since it catalyzes the biosynthesis of trypanothione (T[SH]<sub>2</sub>), the principal thiol-redox metabolite in trypanosomatids. In this study, we utilized genetic over-expression and pharmacological inhibition approaches to examine the role of TryS in *T. cruzi* proliferation, tolerance to oxidative stress and resistance to anti-protozoal drugs. According to our results, TryS-overexpressing epimastigotes (TryS<sup>hi</sup>) recorded shorter doubling time and higher metacyclogenesis capacity. Besides, both epimastigotes and infective trypomastigotes of TryS<sup>hi</sup> exhibited increased tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and current trypanocidal drugs: benznidazole and nifurtimox. Further, the treatment with TryS-specific inhibitors abolished these observed advantages in a dose-dependent manner. We also analyzed the interaction *in vitro* between TryS<sup>hi</sup> parasites (*versus* control) and murine macrophages. Our results suggest that TryS-overexpression has a pro-inflammatory and pro-apoptotic effect that may favor the pathogen early escape from the infected cell. Through this approach, we conclude that TryS is essential for proliferation and survival of *T. cruzi* under both normal and oxidative stress conditions. Besides, TryS overexpression confers the parasite an advantage to develop resistance against drugs currently administered for the treatment of acute infection. For this reason, a specific-TryS inhibitor may be beneficial as a new therapeutic strategy for Chagas disease, as a single drug as well as combined with the available chemotherapeutic agents.

**KEY WORDS:** *TRYPANOSOMA CRUZI*, ANTIOXIDANT NETWORK, TRYPANOTHIONE SYNTHETASE, OXIDATIVE STRESS, TRYPANOCIDAL DRUGS, PATHOGEN-HOST RELATION

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi gratitud a todas las personas que de alguna forma me acompañaron en la realización de este trabajo de Tesis:

- A mi Directora la Dra. María Paola Zago, por aceptarme en el IPE, por su paciencia y por brindarme todos los medios a su alcance para finalmente poder culminar este proyecto.
- Al Dr. Carlos Robello (Intitut Pasteur de Montevideo, Uruguay), Co-director de mi Beca Doctoral CONICET, por su participación en este proyecto y constante buena predisposición para asesorarme y abrirme las puertas de su Laboratorio. También a la Dra. María Dolores Piñeyro por su ayuda durante mi pasantía en el Instituto.
- A la Dra. Nisha Garg (UTMB-Medical Branch, EEUU.), por su valiosísima colaboración para la culminación de este trabajo. Por su asesoramiento, correcciones y formación en el proceso de publicación de estos resultados. Por enseñarme una forma diferente y dedicada de trabajar en ciencia.
- Al Dr. Diego Arias (IAL-CONICET, Santa Fe), por recibirme junto con su grupo de trabajo en el IAL, por aportar desde su gran *expertise* y ser un colaborador fundamental para la obtención de los resultados. A la Dra. Natalia Sasoni, por su su tiempo y ayuda durante mi estadía en el IAL.
- Al Dr. Marcelo Comini (Intitut Pasteur de Montevideo, Uruguay), el Dr. Conrad Kunick y el Dr. Oliver Orban (Technische Universität Braunschweig, Alemania), por cedernos gentilmente los inhibidores de TryS utilizados en este trabajo y colaborar activamente en la publicación de los resultados obtenidos.

- A la Dra. Carolina Carrillo (ICT Milstein-CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires), mi Consejera de estudios, por todo su apoyo, recomendaciones y acompañamiento a lo largo de estos años.
- Al Dr. Carlos Buscaglia (IIB-INTECH, Buenos Aires), por abrirme afectuosamente las puertas de su laboratorio en el IIB y haber sido una persona fundamental en mi formación como científica, junto con todo su grupo de trabajo. Al Dr. Gaspar Cánepa (NIAID-NIH, EEUU.), por su predisposición y ayuda incondicional, incluso a la distancia.
- A la Dra. Cecilia Perez Brandán (IPE-CONICET, Salta), gran amiga y consejera, de la ciencia y de la vida, por su apoyo absoluto en todo momento y sobre todo, en aquellos momentos cuando el trabajo experimental no resultaba como se esperaba. Sin su ayuda, hubiera sido muy difícil atravesar este proceso.
- A la Dra. Cecilia Parodi (IPE-CONICET, Salta), por brindarme generosamente su tiempo y confianza para culminar el presente escrito, pero fundamentalmente por ser un ejemplo de dedicación.
- A todos mis compañeros y compañeras, del IPE-CONICET, que hicieron que cada día sea un mejor día, incluso bajo circunstancias difíciles en el Instituto debido a la falta de presupuesto y cuando los resultados experimentales no eran alentadores. Gracias infinitas por su paciencia y alegría de cada jornada. Muy especialmente a la Vet. María Celia Mora por su amistad, a Federico Ramos, Alejandro y Renato Uncos, Gabriela Rojas, técnicos del Instituto, fundamentales en el día a día de nuestro trabajo. A Mercedes Basombrío por su amistad y predisposición, a todo el grupo de becarios y becarias, por las largas charlas de catarsis tan necesarias, a los investigadores que desde su camino recorrido me aconsejaron y

acompañaron en este proceso: al Dr. Leonardo Acuña, la Dra. Fernanda García Bustos, el Dr. Patricio Diosque.

- Al Dr. Sánchez por su ayuda esencial para la obtención del anticuerpo anti-TryS.
- A mis amigos y amigas de toda la vida y los que felizmente conocí en mi paso por Salta, por ocuparse con su amor de hacer más llevaderas las frustraciones, los nervios, y también compartir mis alegrías y victorias. Gracias por ser compañeros y compañeras de esta vida.
- A mi familia, por su gran apoyo desde la distancia.

Asimismo, deseo agradecer a todas las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo:

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la Beca Doctoral.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por el financiamiento otorgado a mi Directora (PICT 1423/2012).
- A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN-UBA) por admitirme en la carrera de Doctorado y hacer posibles las diferentes instancias de asesoramiento y evaluación de este trabajo.



Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en su mayor parte en el **Instituto de Patología Experimental, Universidad Nacional de Salta – CONICET, Ciudad de Salta, Argentina.**

Los experimentos realizados en ratones y células RAW 264.7 se llevaron a cabo en el **Departamento de Microbiología e Inmunología (*Department of Microbiology and Immunology*), University of Texas Medical Branch (UTMB), Galveston, Texas, Estados Unidos**, gracias a la valiosa colaboración de la Dra. Nisha Garg.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron en el **Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, Universidad Nacional del Litoral – CONICET, Santa Fe, Argentina**, con la tutela del Dr. Diego Arias (Investigador Adjunto de CONICET).

Parte del trabajo de clonado molecular fue realizado en la **Unidad de Biología Molecular, del Institut Pasteur de Montevideo, ciudad de Montevideo, Uruguay**, gracias a la generosa colaboración del Dr. Carlos Robello.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	1
1. ANTECEDENTES.....	4
1.1. Enfermedad de Chagas.....	5
1.2. Transmisión.....	7
1.3. Diagnóstico .....	9
1.4. Deudas pendientes en el tratamiento y la profilaxis.....	10
1.5. Agente etiológico.....	12
1.6. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> y fuentes de estrés oxidativo.....	13
1.7. Sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i> .....	19
1.8. La enzima TryS .....	24
1.9. Procesos dependientes del entorno redox.....	26
1.10. La enzima TryS como blanco para drogas .....	30
2. OBJETIVOS .....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1. Técnicas moleculares y bioquímicas.....	35
3.1.1. Técnicas analíticas de ácidos nucleicos.....	35
3.1.2. Técnicas analíticas de proteínas e inmunológicas .....	41
3.1.3. Técnicas bioquímicas .....	48
3.2. Manipulación de bacterias.....	49
3.3. Manipulación de parásitos.....	52
3.4. Cultivo y ensayos con líneas celulares .....	56
3.5. Ensayos con animales de laboratorio.....	58
3.6. Análisis bioinformáticos .....	58
3.7. Análisis estadístico.....	59
4. RESULTADOS .....	60



4.1. Desarrollo del sistema de trabajo .....	61
4.1.1. Análisis bioinformático de la enzima TryS de <i>T. cruzi</i> .....	61
4.1.2. Generación de anticuerpos anti-TryS.....	67
4.1.3. Generación y control de parásitos sobre-expresantes de TryS .....	71
4.2. Mayores niveles de expresión de TryS favorecen la proliferación de epimastigotes y la metacicloogénesis.....	78
4.3. La sobre-expresión de TryS confiere resistencia al estrés oxidativo.....	85
4.4. Altos niveles de expresión de TryS se asocian con una mayor tolerancia a benznidazol y nifurtimox .....	90
4.5. Los parásitos sobre-expresantes de TryS presentan una menor infectividad y capacidad de replicación en macrófagos <i>in vitro</i> .....	92
4.6. Los parásitos sobre-expresantes de TryS emergen tempranamente de la célula infectada.....	96
4.7. Los parásitos TryS <sup>hi</sup> resultan también menos replicativos en un modelo <i>in vivo</i> .....	97
4.8. Tripomastigotes con una mayor expresión de TryS activan una respuesta apoptótica en macrófagos murinos.....	99
4.9. Tripomastigotes sobre-expresantes de TryS activan una respuesta inmune diferencial en macrófagos murinos.....	105
5. DISCUSIÓN.....	108
5.1. La enzima TryS es esencial para el metabolismo de <i>T. cruzi</i> .....	110
5.2. Efecto del sistema TryS/T[SH] <sub>2</sub> en la proliferación y metacicloogénesis.....	112
5.3. Participación de la enzima TryS en la resistencia a estrés oxidativo .....	114
5.4. La actividad de TryS confiere resistencia a las drogas de tratamiento actuales benznidazol y nifurtimox .....	116
5.5. La participación de TryS en la interacción patógeno-hospedador.....	117
5.5.1. Efecto de la infección con parásitos sobre-expresantes de TryS sobre la apoptosis de los macrófagos.....	119
5.5.2. Macrófagos infectados con parásitos TryS <sup>hi</sup> presentaron un perfil diferencial de citoquinas .....	120
5.6. TryS como elemento clave de una red con influencia sobre otras vías metabólicas.....	124

6. CONCLUSIONES FINALES .....	126
7. PERSPECTIVAS .....	129
8. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	132
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
ANEXO A.....	162
ANEXO B.....	165
ANEXO C .....	166

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de los principales triatomíneos asociados a la transmisión de <i>T. cruzi</i> .....	8
Figura 2: Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	16
Figura 3: Fuentes de ROS y RNS a lo largo del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	18
Figura 4: Moléculas con función antioxidante presentes en los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> .....	20
Figura 5: Sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i> .....	25
Figura 6: Reacción enzimática catalizada por TryS.....	27
Figura 7: Características necesarias y deseables para un buen blanco de drogas.....	31
Figura 8: Estructura primaria de la enzima TryS de <i>T. cruzi</i> .....	63
Figura 9: Bolsillos accesibles a drogas de acuerdo a la estructura de <i>LmTryS</i> .....	65
Figura 10: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de TryS de diferentes especies de tripanosomátidos.....	66
Figura 11: Control de especificidad del anticuerpo policlonal anti-TryS N-Ter.....	69
Figura 12: Expresión y purificación de TryS recombinante a partir de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	71
Figura 13: Control de la integración del vector pTREX.TryS en el locus ribosomal de <i>T. cruzi</i> .....	74
Figura 14: Sobre-expresión de la enzima TryS en los parásitos transfectantes TryS <sup>hi</sup> .....	76
Figura 15: Caracterización bioquímica de la enzima TryS en poblaciones de parásitos TryS <sup>hi</sup> y pTREX.....	77
Figura 16: Efecto de la sobre-expresión de TryS sobre la proliferación de epimastigotes.....	79
Figura 17: Capacidad proliferativa de los epimastigotes TryS <sup>hi</sup> observada mediante citometría de flujo.....	81
Figura 18: Estructura química de los inhibidores de TryS KuOrb39 y KuOrb54 utilizados.....	82
Figura 19: Efecto de inhibidores de TryS sobre la replicación y viabilidad de <i>T. cruzi</i> .....	83
Figura 20: Efecto de la sobre-expresión de TryS sobre la metaciclogénesis.....	85
Figura 21: Participación de TryS en la resistencia frente a estrés oxidativo.....	87
Figura 22: Efecto de la mayor expresión de TryS en la tolerancia a cadmio.....	89
Figura 23: Efecto de TryS en la tolerancia de <i>T. cruzi</i> frente al NFX.....	91
Figura 24: Efecto de la sobre-expresión de TryS sobre la susceptibilidad de <i>T. cruzi</i> frente al benznidazol.....	93
Figura 25: Análisis de la infectividad y capacidad de replicación de parásitos TryS <sup>hi</sup> en macrófagos <i>in vitro</i> .....	95
Figura 26: Determinación del número de tripomastigotes liberados al medio de cultivo.....	96

Figura 27: Análisis de la carga parasitaria en el modelo de infección murina .....	98
Figura 28: Evaluación de marcadores de apoptosis en macrófagos expuestos a TryS <sup>hi</sup> .....	101
Figura 29: Determinación de la actividad de caspasa-3 en macrófagos expuestos a parásitos sobre- expresantes de TryS .....	103
Figura 30: Determinación de la condensación de la cromatina en células RAW 264.7 infectadas con TryS <sup>hi</sup> .....	104
Figura 31: Determinación de citoquinas secretadas por macrófagos infectados con parásitos TryS <sup>hi</sup> .	106
Figura 32: Efecto de IL-6 sobre las células T .....	123

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de T[SH] <sub>2</sub> y GSH como antioxidantes.....	23
Tabla 2: Diferencias en el sistema de TryS/T[SH] <sub>2</sub> entre diferentes tripanosomátidos .....	28
Tabla 3: Identificación de péptidos inmunogénicos de acuerdo al algoritmo <i>Kolaskar and Tongaonkar</i> 68	

## ABREVIATURAS

aa, aminoácidos

ADN, ácido desoxirribonucleico

ADNk, ADN del kinetoplasto

ARN, ácido ribonucleico

ARNm, ARN mensajero

BSA, albúmina sérica bovina

BZ, benznidazol

CDS, secuencia codificante (*Coding Sequence*)

cTXNPx, triparedoxina peroxidasa citoplasmática (también identificada en algunos trabajos como CPX)

dNTPs, mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP

DTU, unidad discreta de tipificación (*Discrete Typing Unit*)

EdC, Enfermedad de Chagas

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

ETC, cadena de transporte de electrones

GAPDH, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

Glc, glucosa

GSH, glutatión

GshA,  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa

Gsp, glutationilesperimidina

hKO, *hemi-Knock Out* (por eliminación de uno de los alelos de un gen)

HRP, peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*)

HV, homogenado intestinal de vinchuca (*T. infestans*)

IFI, inmunofluorescencia indirecta

IFN- $\gamma$ , interferón-gamma

IL, interleuquina

kb, kilopares de bases

kDa, kilodalton

KO, *Knock out* (por eliminación de dos alelos de un gen)

LAMP, amplificación isotérmica (*loop-mediated isothermal amplification*)

LB, medio Luria Bertani (ver M&M)

LIT, infusión de hígado-triptosa (*Liver Infusion Triptose*, ver M&M)

mAb, anticuerpo monoclonal

MCS, secuencia de clonado múltiple (*Múltiple Cloning Site*)

mTXNPx, triparedoxina peroxidasa mitocondrial (también identificada en algunos trabajos como MPX)

NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

*neo*, gen de resistencia neomicina fosfotransferasa

NFX, nifurtimox

PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida

pb, pares de bases

PBS, *buffer* fosfato salino (ver M&M)

PCD, muerte celular programada (*Programmed Cell Death*)

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

PPP, vía de las pentosas fosfato (*Pentose Phosphate Pathway*)

PTM, modificación post-traducciona (*Post-Translational Modification*)

qPCR, PCR cuantitativa o en tiempo real

RE, retículo endoplasmático

RNAi, RNA de interferencia

SBF, suero bovino fetal

SEM, error estándar de la media

Spd, espermidina

T[SH]<sub>2</sub>, tripanotión

TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral-alfa (*Tumor Necrosis Factor-alpha*)

TR, tripanotión reductasa

*Trityps*, denominación operacional que agrupa a *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*

TryS, tripanotión sintetasa

TryS<sub>rec</sub>, tripanotión sintetasa recombinante

TXN, triparredoxina

UMS, secuencia blanco de unión del factor de transcripción UMSBP (*Universal Minicircle Sequence*)

UMSBP, proteína de unión a UMS (*Universal Minicircle Sequence - Binding Protein*)

UTR, región no traducida (*Untranslated Region*), flanqueante a la secuencia codificante



# 1.ANTECEDENTES

### 1.1. Enfermedad de Chagas

Hace más de 100 años, en Minas Gerais, Brasil, el Dr. Carlos Chagas realizaba la primera descripción de la Tripanosomiasis Americana, hoy más conocida como Enfermedad de Chagas [1], la cual continúa siendo un problema en salud pública en la actualidad. Unos años más tarde, en Argentina, el Dr. Salvador Mazza completó la descripción del agente etiológico, del vector y redefinió a esta enfermedad como una patología endémica. Se trata de una enfermedad parasitaria producida por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que afecta a unas ~8 millones de personas principalmente en América Latina, causando ~10,000 muertes anuales [2]. Se estima que existen de 50,000 a 200,000 nuevos casos por año de esta enfermedad [3], aunque estas cifras podrían ser mayores considerando que muchas personas no acceden a un sistema de salud y diagnóstico certero.

La enfermedad de Chagas (EdC) es considerada una enfermedad ligada a la pobreza dentro del modelo de salud pública dominante. Sin embargo, desde las nuevas perspectivas en el campo de la epidemiología no existirían tales enfermedades de la pobreza, sino enfermedades generadas por un sistema social de desigualdad [4]. Desde este punto de vista no aparecen los pobres como responsables de una enfermedad, mientras se tienen en cuenta las condiciones sociales y económicas que impactan en la salud pública. En el caso de la EdC, se torna fundamental tener una visión integral que contemple los diversos factores que inciden sobre la enfermedad. El deterioro social, económico y ambiental, se traduce en un aumento de los riesgos sanitarios de las poblaciones rurales, de mayor vulnerabilidad frente a enfermedades reemergentes [5,6]. La acción antrópica sobre el medio ambiente también contribuye de forma significativa para la dispersión de la enfermedad. Es por eso que un correcto manejo de los recursos naturales, la vigilancia epidemiológica sostenida en el tiempo, la educación, un abordaje que contemple políticas habitacionales y acceso a una mejor calidad de vida por parte de las comunidades campesinas, podría representar una eficaz forma de control de la

## 1. Antecedentes

transmisión [5]. Resulta también importante la participación de todos los actores involucrados, el sector público, privado y la comunidad, en el desarrollo e implementación de políticas exitosas contra la EdC.

La EdC, originalmente contenida en América Latina, ha atravesado fronteras, constituyendo un problema de salud en países no endémicos principalmente debido al aumento de los procesos migratorios. Tanto es así que se han detectado casos en Asia, Oceanía, Europa [7] y actualmente se estima que cerca de 300,000 personas infectadas con *T. cruzi* viven en los Estados Unidos [8]. En el sur de este país, el ciclo natural de transmisión del parásito también estaría implicado, ya que se detectó una alta tasa de perros infectados [9,10], así como casos autóctonos de infección en humanos [11].

Desde el punto de vista clínico, se pueden distinguir dos fases en la EdC: la aguda y la crónica. La fase aguda, generalmente asintomática, se caracteriza por una alta parasitemia, y puede durar entre 6 y 8 semanas [12]. En algunos casos, se verifica una inflamación en el sitio de infección y/o la aparición de edemas conocidos como chagomas, linfadenopatías y fiebre. Durante la fase crónica se hace difícil la determinación directa de parásitos en sangre, recurriéndose a técnicas serológicas y moleculares para el diagnóstico. Cerca del 40% de los pacientes crónicos desarrollan formas sintomáticas, incluso 20-30 años post-infección. Un 30% de ellos desarrolla patologías cardíacas, como cardiomiopatía dilatada asociada con miocarditis, fibrosis y disfunción cardíaca [13]. Cerca del 10% de los individuos infectados desarrollan patologías en la inervación del tracto gastrointestinal que puede resultar en megacolon y/o megaesófago [14]. En algunos casos, ambos tipos de manifestaciones clínicas se encuentran presentes en el mismo individuo, constituyendo una forma crónica mixta. La prevalencia de las diferentes formas clínicas de la enfermedad varía dependiendo de la región geográfica y podría estar relacionada con las diferencias inmunogenéticas de las poblaciones humanas y con la variabilidad genética entre las cepas circulantes del parásito [15].

### 1.2. Transmisión

Existen diversas formas de transmisión de la EdC, la transmisión vectorial es la de mayor importancia epidemiológica, y se suman a esta, la transmisión vertical o congénita, la vía que involucra transfusión sanguínea o trasplante de órganos, así como también la transmisión oral mediante la ingesta de alimentos o bebidas contaminados con el parásito.

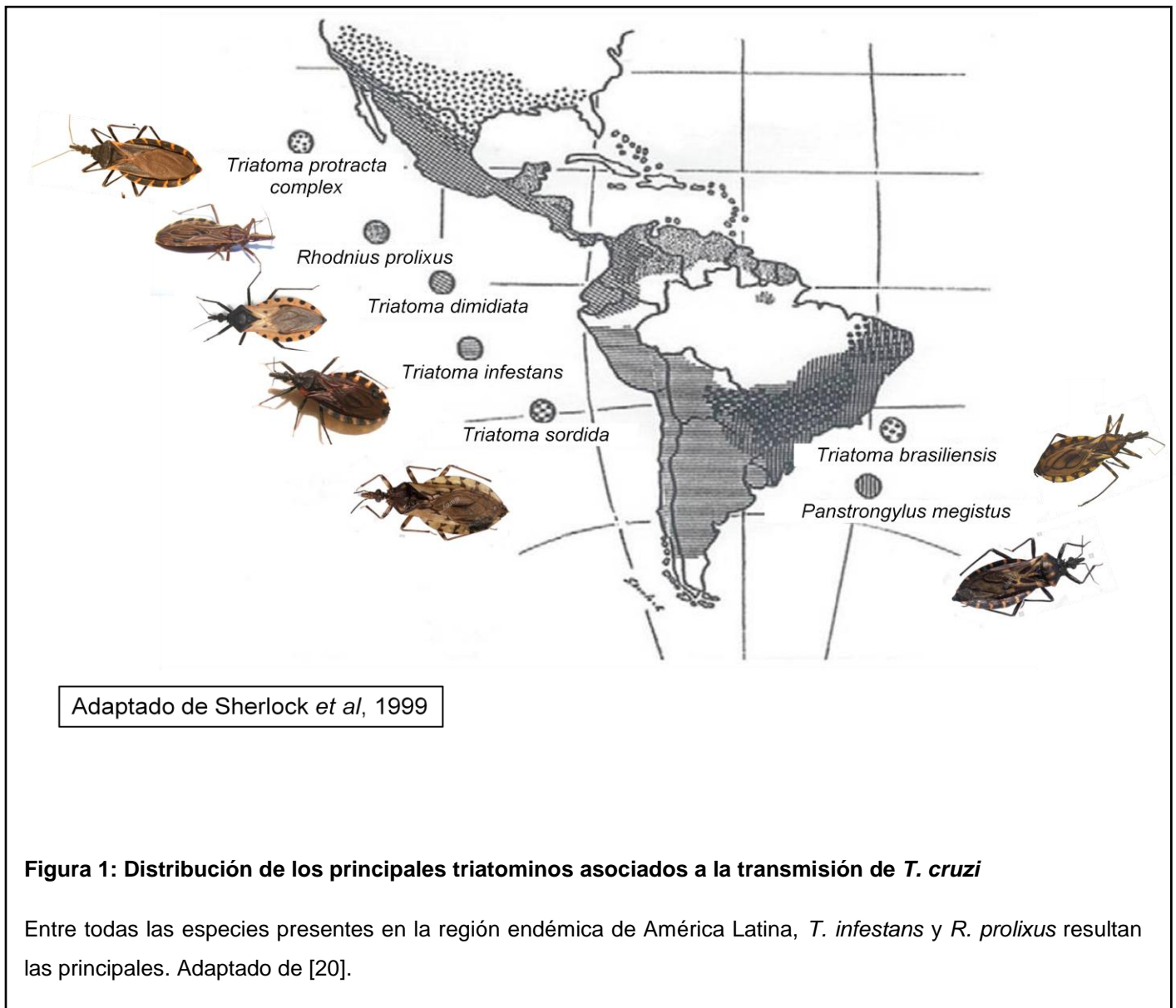
La transmisión vectorial de la enfermedad tiene lugar en un ambiente geográfico definido que abarca una región entre las latitudes 42°N a 40°S de América (desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile). Dentro de esta región, pueden describirse dos ciclos, el silvestre generalmente involucra vertebrados salvajes como hospedadores, mientras que el ciclo doméstico, involucra hemípteros adaptados a las viviendas como vectores, animales domésticos y al ser humano como hospedadores. La conexión entre ambos ciclos se realiza a través de roedores, murciélagos, comadrejas y hemípteros que migran hacia el ambiente urbano [16,17].

Existen en la naturaleza más de 100 especies de mamíferos que son reservorios de *T. cruzi* (marsupiales, murciélagos, roedores, logomorfos, carnívoros y primates). Por otro lado, más de 130 especies de triatominos, son reconocidos como potenciales vectores del parásito [18]. Entre las principales especies de insectos hematófagos responsables de la transmisión vectorial en América Latina, se encuentran *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, aunque muchas otras especies participan en la transmisión (Fig. 1), reflejando la complejidad del panorama epidemiológico y su difícil circunscripción.

La vía transfusional y por trasplante de órganos es la segunda causa más frecuente, representando el 10% de la tasa de prevalencia [19]. Los casos por este tipo de transmisión han descendido en los países del cono sur y algunos de América Central, gracias a las medidas de control de los donantes. Sin embargo, existen algunos países endémicos, y la mayoría de aquellos no

## 1. Antecedentes

endémicos con alta incidencia de migrantes seropositivos, que no introdujeron este tipo de medidas facilitando la globalización de la EdC [3]. Resulta prioritario concientizar sobre la importancia de establecer mundialmente estas medidas preventivas.



## 1. Antecedentes

La transmisión vía oral de *T. cruzi* representa una de las formas más frecuentes en Brasil, habiéndose reportado micro-epidemias de Chagas agudo asociadas al consumo de procesados de *assaí* (*Euterpe oleracea*) [21] y de jugo de caña de azúcar contaminados [22].

La transmisión congénita por su parte, es un problema de salud pública de creciente relevancia [23–25]. Las tasas de infección congénita varían entre un 1-21%, y se estima en un 6% en Argentina [26]. Desafortunadamente, el benznidazol, droga de elección para el tratamiento de la EdC, es una sustancia tóxica, capaz de producir efectos teratogénicos [27,28] y por lo tanto no puede ser administrada en mujeres embarazadas. La infección congénita de *T. cruzi* está asociada con partos prematuros, bajo peso del recién nacido e incluso la muerte del bebé [29–31].

### 1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la EdC es realizado mediante técnicas microscópicas, serológicas y principalmente moleculares. Un diagnóstico molecular temprano y certero, resulta fundamental para todas las situaciones de infección aguda en que el tratamiento tripanocida es eficaz. Estas serían (I) casos de transmisión congénita en neonatos, donde la presencia de anticuerpos maternos en la sangre del recién nacido puede resultar en falsos positivos por métodos serológicos, (II) casos de transmisión oral, (III) casos transfusionales o de pacientes receptores de órganos provenientes de donantes con EdC. Las técnicas moleculares (IV) permiten también el monitoreo de pacientes crónicos frente a una posible reactivación, ya sea debido a una inmunosupresión o co-infección con el virus VIH, así como también para la (V) evaluación de la respuesta frente al tratamiento [32]. Actualmente, el “gold estándar” para evaluar eficacia de tratamiento es obtener la negativización serológica, lo cual puede demandar años.

## 1. Antecedentes

Las técnicas de diagnóstico molecular se basan en PCR, a tiempo final y en tiempo real (qPCR), así como también en LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) [33], una técnica novedosa que involucra un complejo diseño de oligonucleótidos, y la Bst DNA polimerasa. Mediante esta técnica es posible amplificar grandes cantidades de ADN en una incubación de 30-60 minutos que puede ocurrir en un bloque térmico a 60-65°C, con lo cual la utilización de un termociclador resulta prescindible [34]. Cuenta además con la ventaja de que los reactivos utilizados son estables a temperatura ambiente, evitando la necesidad del mantenimiento de la cadena frío. Y el resultado de la reacción de LAMP puede verse a ojo desnudo mediante la turbidez o fluorescencia agregando agentes intercalantes. Esta técnica permite la detección de  $1 \times 10^{-1}$  equivalentes de parásito/ml, presentando una alta sensibilidad frente a casos de Chagas agudo, congénito o pacientes con reactivación y una menor sensibilidad en pacientes crónicos, similar a lo que sucede con la técnica de qPCR [35]. Recientemente, la técnica de LAMP se introdujo en el diseño de nuevos kits diagnósticos que se encuentran en evaluación y prontamente podrían representar una gran ventaja, principalmente en centros de salud y diagnóstico donde no cuentan con termocicladores y/o equipamiento para realizar ya sea una PCR convencional o qPCR.

Por otro lado, la identificación de biomarcadores clínicos, genéticos y/o celulares como indicadores pronósticos de la evolución de la patología, es fundamental para poder orientar la práctica médica. También sería de importancia crucial la caracterización de biomarcadores que permitan determinar la eficacia del tratamiento.

### 1.4. Deudas pendientes en el tratamiento y la profilaxis

A pesar de que existen dos drogas disponibles desde principios de la década de 1970 para el tratamiento de la EdC [36], el benznidazol (BZ) y el nifurtimox (NFX) en menor medida, estos fármacos

## 1. Antecedentes

presentan una limitada eficacia para el tratamiento de pacientes adultos de la fase crónica [37], perteneciendo estos pacientes a la forma clínica más comúnmente encontrada. Lo que es más, estas drogas se asocian con múltiples efectos adversos incluyendo, náuseas, vómitos, reacciones dermatológicas, agranulocitosis, polineuropatía y no se recomienda su administración en pacientes neurológicos o psiquiátricos, personas con algún grado de insuficiencia renal o embarazadas, tal como se mencionó en párrafos anteriores [38–40]. Debido a la severidad de estos efectos resulta difícil la adhesión al tratamiento, generándose una situación propicia para la aparición de eventos de resistencia a drogas [40].

En lo que respecta al modo de acción, BZ y NFX son capaces de generar un efecto principalmente oxidativo e inespecífico sobre las macromoléculas del parásito. Una vez que estos fármacos son activados por la enzima nitroreductasa I (NTR-I), generan un descenso significativo en el contenido de tioles, como T[SH]<sub>2</sub> y glutatión (GSH), en el parásito, debido a su conjugación con metabolitos derivados de la droga. Por lo tanto, la disminución de estos dos antioxidantes se traduce en una incapacidad de compensar el incremento de los radicales libres originados por estos agentes, de los derivados del proceso de ciclado redox del oxígeno y de los metabolitos electrofílicos, generando así daño oxidativo sobre las biomoléculas de *T. cruzi* [41–43].

Frente a las serias deficiencias de la terapéutica actual, y la aparición de fenómenos de resistencia [44–46], resulta fundamental la identificación y caracterización de nuevos blancos que permitan el desarrollo de drogas superadoras para el tratamiento de la EdC. La base para el diseño de fármacos eficaces y seguros, es enfocarse en la inhibición de vías metabólicas esenciales y únicas para el parásito, ausentes en el hospedador. En este sentido, el sistema antioxidante del parásito, y en particular las enzimas asociadas al metabolismo del T[SH]<sub>2</sub>, se postulan como candidatas para el desarrollo de nuevos fármacos [47–50].



Al día de la fecha no existe una vacuna inmunoproliférica o terapéutica aprobada pero es el objetivo de varios grupos, obtener un inmunógeno candidato que permita el tratamiento o la prevención efectiva de la enfermedad. Las estrategias abarcan el empleo de abordajes heterólogos basados tanto en proteínas recombinantes en combinación con organismos vivos atenuados como transportadores de antígenos, hasta vacunas de ADN y adyuvantes de última generación (Revisado en [51]).

### 1.5. Agente etiológico

*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* pertenece al orden *Kinetoplastida* que abarca organismos flagelares con un kinetoplasto, una organela con características similares a la mitocondria. A su vez *T. cruzi* se incluye dentro de la sección *Stercoraria*, junto con otros organismos del orden *Trypanosoma* cuya transmisión vectorial tiene lugar a través de las heces del vector. El subgénero *Schizotrypanum* por su parte, es utilizado para identificar organismos con un estadio replicativo intracelular implicado en su ciclo de vida.

Las diferentes cepas de *T. cruzi* se clasifican a su vez dentro de seis unidades discretas de tipificación (DTUs, sigla de *Discrete Typing Units*), TcI a TcVI. Esta estructura poblacional es principalmente una consecuencia de una propagación clonal con raros eventos de intercambio genético [52]. Los diferentes DTUs se identifican de acuerdo con marcadores moleculares específicos y se asocian con una particular distribución geográfica. Asimismo, pueden tener un tropismo preferencial hacia ciertos vectores y reservorios, así como también hacia tejidos particulares dentro del hospedador infectado [53–55]. Esta variabilidad genética debe ser considerada en el desarrollo de técnicas diagnósticas para su aplicación a escala global.

Entre las DTUs, TcI presenta una distribución amplia siendo la principal DTU presente en Colombia y Venezuela y los Estados Unidos. Aislados correspondientes a TcII, TcV y TcVI fueron identificados en sangre periférica de pacientes seropositivos en países de América del Sur [56,57]. En Argentina, TcV resultó ser la principal DTU hallada en muestras de pacientes, sintomáticos y asintomáticos, mientras que TcI fue la más frecuente detectada en sangre, explantos de tejido cardíaco y chagomas de pacientes inmunosuprimidos [58]. Sin embargo, no hay evidencias experimentales suficientes que permitan comprobar una asociación certera entre distintas DTUs y la cardiomiopatía chagásica.

### 1.6. Ciclo de vida de *T. cruzi* y fuentes de estrés oxidativo

A los fines del presente trabajo es necesario enmarcar el ciclo de vida de *T. cruzi* en relación a las diferentes fuentes de estrés oxidativo que lo atraviesan. El ciclo de vida de este parásito transcurre entre el hospedador invertebrado y el vertebrado, abarcando cuatro estadios morfológicos principales: epimastigote, tripomastigote metacíclico, amastigote y tripomastigote sanguíneo, además de las formas consideradas intermedias. El insecto vector adquiere el patógeno al alimentarse con la sangre de un hospedador vertebrado infectado. Luego de la ingesta, los tripomastigotes sanguíneos presentes en esta fuente se diferencian a la forma replicativa y no infectiva de epimastigote (Fig. 2). Una vez que los epimastigotes alcanzan la porción posterior del tubo digestivo del insecto, comienzan una división binaria activa y dependiendo de la disponibilidad de nutrientes algunos comenzarán el proceso de metaciclogénesis en la porción final del tubo digestivo del insecto (Fig. 2). Durante este pasaje por el tubo intestinal del vector, los parásitos están expuestos a cantidades significativas de oxidantes que son producidos mediante la descomposición de la hemoglobina ingerida, principal proteína presente en la sangre, y la activación del sistema inmune, humoral y celular, del triatomino [59,60] (Fig. 3).

## 1. Antecedentes

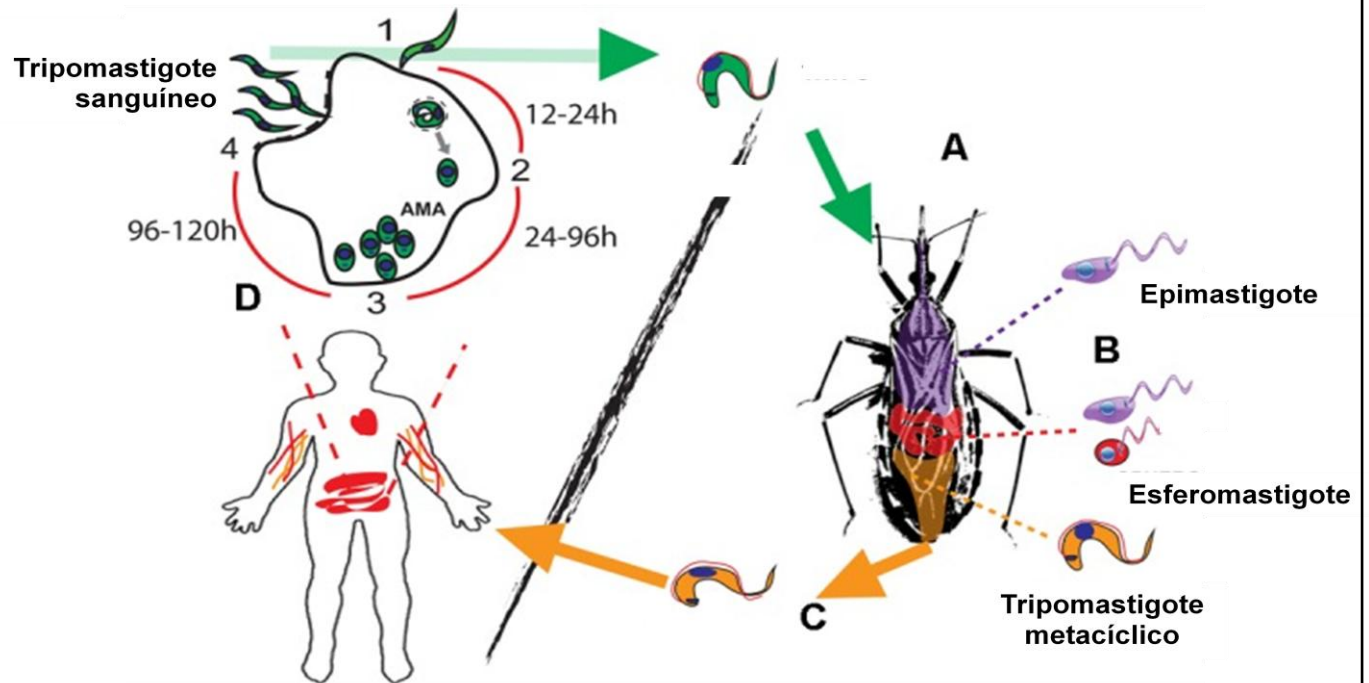
Diferentes enzimas están a cargo de la generación de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (ROS y RNS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species* y *Reactive Nitrogen Species*, respectivamente). La oxido nítrico sintasa (NOS), la oxidasa dual (DUOX) y la NADPH oxidasa (NOX) colaboran para producir óxido nítrico (NO) y radical superóxido ( $O_2\bullet^-$ ), éste último puede dismutar y formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o reaccionar con NO para producir peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) [59]. Este ambiente oxidativo fue inicialmente considerado un mecanismo de control de la proliferación del parásito [61–63]. Sin embargo, una visión diferente surgió a partir del trabajo de Nogueira y colaboradores. De acuerdo a sus resultados, *T. cruzi* podría darle un significado diferente a su ambiente redox. Es así que muchos pro-oxidantes tales como el grupo hemo (ferritoporfirina IX) presente en la sangre, pueden promover la proliferación de los epimastigotes [64]. En este estadio, la exposición al hemo puede provocar la hiperpolarización de la membrana mitocondrial del propio parásito y una disminución de la actividad respiratoria, llevando al incremento de la producción de  $O_2\bullet^-$ . Esto llevó a los autores del trabajo a proponer que el incremento de ROS podría ser un mecanismo metabólico para mantener una activa proliferación de los epimastigotes [65]. Asimismo, la exposición a antioxidantes dentro del vector, tales como el urato presente en la hemolinfa, promueven el arresto de la proliferación y la diferenciación hacia la forma infectiva no replicativa de tripomastigote metacíclico [64]. Esto, pone de manifiesto la importancia del balance de oxidantes/antioxidantes sobre los diferentes procesos celulares del parásito. Luego de esta transición hacia el estadio metacíclico, esta forma parasitaria es liberada junto con las heces durante una futura alimentación del insecto para continuar con el ciclo (Fig. 2).

Dentro del hospedador vertebrado, *T. cruzi* tiene que lidiar con una nueva condición oxidativa. Por un lado, la respuesta inmune contra este parásito implica la articulación del sistema innato y el adaptativo, involucrando macrófagos, neutrófilos, células *natural killers*, linfocitos T y B, y la producción de citoquinas pro-inflamatorias de tipo  $T_H1$  [66–68]. Dentro de los macrófagos, considerados la primera barrera de defensa, las ROS son las principales efectoras para el control del patógeno [69]. Entre

## 1. Antecedentes

estas moléculas, el anión superóxido producido por la NOX, puede espontánea o enzimáticamente, ser transformado en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Otra de las enzimas involucradas es la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), responsable de la producción sostenida de óxido nítrico, y la generación de peroxinitrito como consecuencia. A pesar de que ONOO<sup>-</sup> tiene una corta vida media, es capaz de controlar la infección en sus primeras etapas [70].

Por otro lado, los parásitos también son expuestos a moléculas citotóxicas producidas por parte de células no inmunológicas, ya que una gran variedad de ROS y RNS son continuamente generadas como productos secundarios del metabolismo aeróbico. En este sentido, la mitocondria es una organela involucrada directamente en el estado redox de la célula. En ella, tiene lugar la cadena de transporte de electrones (ETC, por su sigla en inglés *Electron Transport Chain*) que, acoplada a la fosforilación oxidativa, consume un 85-90% del O<sub>2</sub> total utilizado por la célula. Del total de O<sub>2</sub>, un 3% es metabolizado de forma incompleta, resultando en la formación de O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> [72,73]. En particular el corazón, órgano blanco de *T. cruzi*, constituye un órgano altamente dependiente de la actividad mitocondrial para obtener la energía necesaria para la contracción. Se estima que en los miocardiocitos, un 30% del total de su volumen estaría representado por mitocondrias. Además de la producción normal de ROS, en estas células se ha observado –tanto en modelo murino como en humanos– una disfunción mitocondrial asociada a la infección por *T. cruzi* [74–76]. En esta condición, la actividad de los complejos I y III de la ETC se ve comprometida, incrementando la liberación de anión superóxido [77,78]. Estudios *in vivo*, demostraron que estos defectos mitocondriales persisten más allá de la fase aguda de infección, correlacionando la patología crónica con el aumento de ROS mitocondriales. Además de la cadena respiratoria, pacientes con EdC crónica presentaron una disminución tanto en la actividad de sus enzimas antioxidantes como en el contenido de GSH, revelando la persistencia de un ambiente pro-oxidante a lo largo del proceso de infección [79–82]. Por lo tanto, la ETC constituye una importante fuente de estrés oxidativo en células no inmunológicas, tales como los miocardiocitos que son particularmente infectados por *T. cruzi* (Fig. 3).



Tomado de de PablosTorró *et al*, 2018

**Figura 2: Ciclo de vida de *T. cruzi***

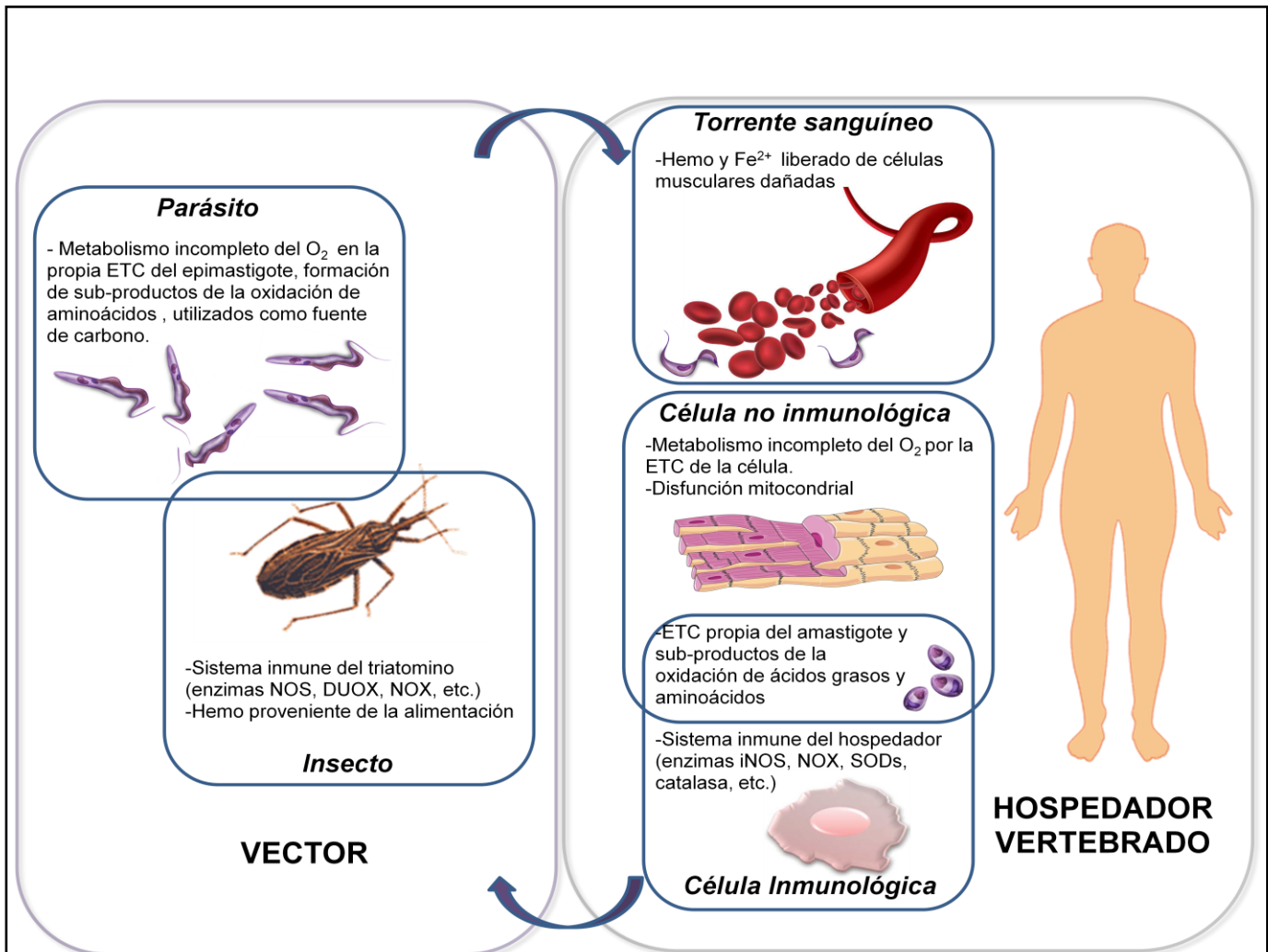
**A.** Los tripomastigote sanguíneos (verde) son incorporados junto con la ingesta de sangre por parte del vector. **B.** Estas formas del parásito se transformarán en epimastigotes (violeta) y las formas intermedias de esferomastigotes (rojo) dentro de las primeras secciones del tubo digestivo del insecto. **C.** En el recto del vector se produce la diferenciación de una subpoblación de parásitos a la forma de tripomastigote metacíclico (naranja), que serán liberados junto con las heces del insecto. **D.** Los tripomastigotes metacíclicos o sanguíneos (verde) invadirán un amplio rango de células nucleadas para replicarse en su interior. Para la invasión de la célula deben tener lugar: 1) la adhesión, invasión y formación de la vacuola parasitófora y 2) la diferenciación hacia la forma de amastigote (AMA). Luego, 3) la replicación activa de los amastigotes mediante fisión binaria y finalmente 4) la diferenciación hacia la forma de tripomastigote sanguíneo y su liberación al medio extracelular. Tomado de [71].

## 1. Antecedentes

Otro aspecto a tener en cuenta, es la producción endógena de especies reactivas, que se encuentra muy ligada a la disponibilidad de nutrientes a lo largo de cada estadio de desarrollo del parásito. Brevemente, la obtención de energía en el epimastigote depende principalmente de la oxidación de L-prolina, L-histidina y L-glutamina, que son abundantes en la hemolinfa y fluidos de los vectores hematófagos [83]. La L-alanina, por su parte, puede tener un rol dual, puede ser producida y secretada como un sub-producto del metabolismo de la glucosa y, a su vez, puede ser consumida por el parásito y completamente oxidada a  $\text{CO}_2$  mediante fosforilación oxidativa [84].

Una vez dentro del hospedador vertebrado, los requerimientos energéticos del tripomastigote dependen de la glucosa (Glc) como principal fuente de carbono, debido a la abundancia de esta molécula en el hospedador. Algunas evidencias sugieren que la oxidación de ácidos grasos [85] y aminoácidos [86], por sobre la de Glc, podrían ser las fuentes de energía preferidas en el caso del amastigote. Por el contrario, en un trabajo más reciente se demostró que *T. cruzi* sería capaz de modular el metabolismo energético de la célula hospedadora, promoviendo la incorporación de Glc, para ser luego utilizada directamente por el amastigote [87]. Esto podría significar que la forma intracelular del parásito podría nutrirse a partir de diversas fuentes de carbono de una forma flexible, de acuerdo a las condiciones del entorno celular.

Este cambio entre los tipos de metabolismo energético que utiliza cada estadio del parásito, guarda un correlato en el incremento de la producción de ROS cuando la respiración mitocondrial es más activa con respecto a la glicólisis [88]. Es decir, cuando el metabolismo energético es más dependiente de la ETC mitocondrial, existe también una mayor oxidación incompleta del  $\text{O}_2$ , aumentando la producción de ROS. Esto significa que estas moléculas reactivas pueden provenir no sólo de fuentes externas, sino también ser generadas por el propio parásito en cantidades considerables dependiendo del tipo de metabolismo energético empleado (Fig. 3).



**Figura 3: Fuentes de ROS y RNS a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi***

Durante su paso por el insecto, además de las ROS y RNS generadas como sub-productos del metabolismo energético propio, *T. cruzi* está expuesto al sistema inmune del vector, que involucra la activación de enzimas como la NOS, la DUOX y la NOX. Asimismo, luego de la alimentación del insecto, los epimastigotes son expuestos a grandes cantidades de hemo, que puede resultar altamente oxidante. Una vez dentro del hospedador vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos pueden encontrarse con oxidantes ubicuos presentes en el torrente sanguíneo como el complejo hemo y el hierro  $Fe^{2+}$  que pueda ser liberado de los tejidos dañados. Luego, dentro de las células inmunológicas, el parásito debe enfrentar nuevamente una fuerte respuesta oxidativa, generada por enzimas tales como la iNOS, la NOX y SODs, generando grandes cantidades de ROS y RNS. En el contexto de células no inmunológicas, como miocardiocitos, se produce una disfunción mitocondrial resultando en el aumento de ROS. Por último, durante su estadio replicativo, el parásito puede utilizar la oxidación de aminoácidos y ácidos grasos, con la formación concomitante de sub-productos oxidantes a nivel de la cadena respiratoria.

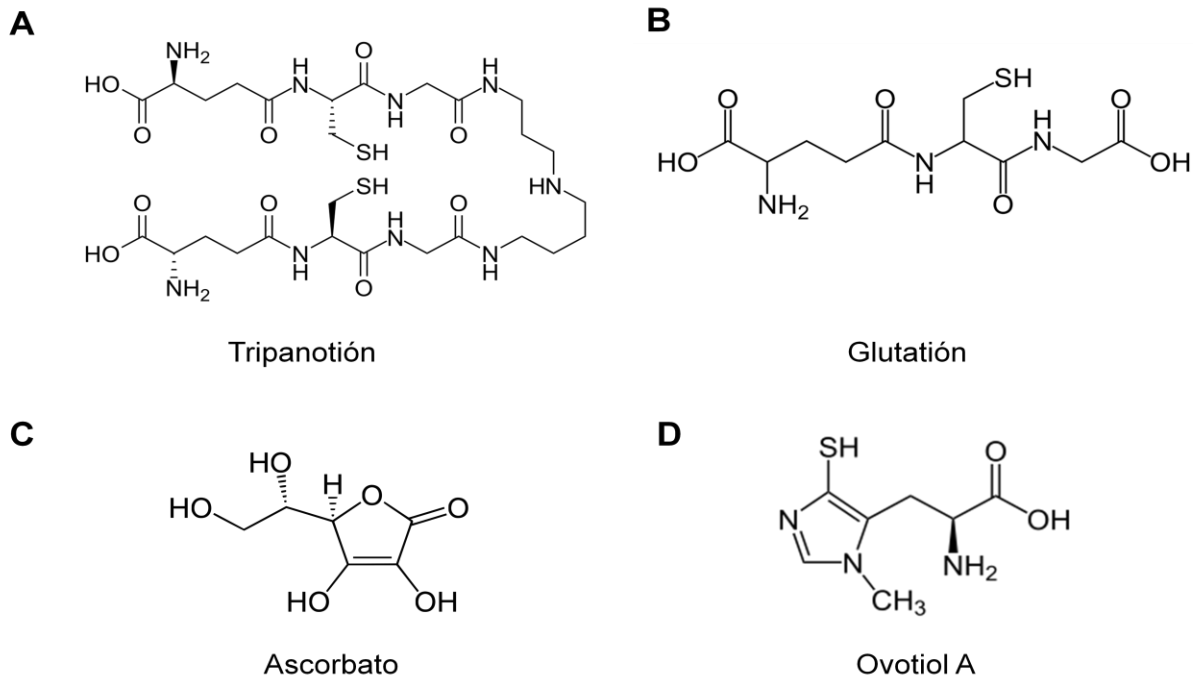
Considerando todos los desafíos oxidativos que el parásito debe superar durante su ciclo de vida, resulta fácil entender que la presencia de un robusto sistema antioxidante constituye un requisito fundamental para mantener el balance redox frente a las condiciones oxidantes extremas y variables.

### 1.7. Sistema antioxidante de *T. cruzi*

El sistema antioxidante de *T. cruzi* se encuentra formado por componentes enzimáticos y una variedad de moléculas capaces de neutralizar los efectos oxidantes. Esta red se sustenta principalmente en un ditiol de bajo peso molecular conocido como tripanotión ( $T[SH]_2$ ;  $N_1, N_8$ -bisglutathionilspermidina), en analogía con el glutatión (GSH) utilizado por la mayor parte de los eucariotas [89]. La biosíntesis de este antioxidante es catalizada por la enzima tripanotión sintetasa (TryS) a partir de dos moléculas de GSH y una de espermidina en un proceso de dos pasos, dependientes de ATP [90]. En *T. cruzi*, al igual que en otros tripanosomátidos, el  $T[SH]_2$  transfiere equivalentes de reducción desde el NADPH, proveniente de la vía de las pentosas fosfato (PPP), hacia las enzimas encargadas de neutralizar ROS [48].

Si bien el  $T[SH]_2$  es el principal antioxidante para *T. cruzi*, otras moléculas completan el sistema (Fig. 4). El GSH puede ser incorporado del entorno extracelular, mediante transportadores específicos o bien producirse de manera endógena. Por lo que la síntesis *de novo* de GSH en este parásito, podría compensar las fluctuaciones del nivel de este antioxidante en su ambiente [91], para así proveer este sustrato requerido para la síntesis de  $T[SH]_2$ . La síntesis de GSH se encuentra altamente conservada y es catalizada por dos enzimas: la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa (GshA) produce la unión de L-glutamato y L-cisteína para generar  $\gamma$ -glutamilcisteína, y en un segundo paso la glutatión sintetasa (GshB) forma el enlace C-N entre  $\gamma$ -glutamilcisteína y L-glicina [48,92,93], sin embargo la biosíntesis de este metabolito no ha sido del todo caracterizada para *T. cruzi*.





**Figura 4: Moléculas con función antioxidante presentes en los diferentes estadios de *T. cruzi***

**A.** T[SH]<sub>2</sub> es el principal antioxidante utilizado por *T. cruzi*. **B.** Además del T[SH]<sub>2</sub>, el parásito cuenta con otras moléculas capaces de neutralizar ROS y RNS, tal como el GSH, utilizado por la mayoría de los eucariotas. **C.** El ascorbato o vitamina C, también es empleado para la transferencia de equivalentes de reducción dentro de su red antioxidante. **D.** El ovotiol A, se encuentra presente en todos los estadios de desarrollo de *T. cruzi* aunque su contribución al balance del estado redox, sería de mayor relevancia en la forma de epimastigote.

Probablemente la presencia de tioles alternativos representa una importante ventaja ya que se podría pensar que un patógeno equipado con una variedad de moléculas antioxidantes podría tener más flexibilidad para responder frente al estrés oxidativo al que está expuesto. Si bien los potenciales de reducción del T[SH]<sub>2</sub> y GSH son muy similares (-2242 mV y -2230 mV, respectivamente) existen diferencias significativas entre el valor de pKa reportado para cada molécula, siendo este de 7.4 para el T[SH]<sub>2</sub>, más de una unidad de pH por debajo del valor de pKa del GSH estimado en 8.7 [94]. Debido a que el intercambio de tioles, presenta un valor máximo cuando el pKa del tiol es igual al pH de la

## 1. Antecedentes

solución, los grupos tiólicos del T[SH]<sub>2</sub> serían más reactivos en condiciones fisiológicas, en comparación al GSH. Y por otro lado, los ditioles resultan cinéticamente superiores al ser comparados con los monotioles para reducir disulfuros intramoleculares [95]. En la Tabla 1, se presentan algunas diferencias entre el T[SH]<sub>2</sub> y el GSH, los principales antioxidantes utilizados por tripanosomátidos y eucariotas superiores, respectivamente.

Además de contar con T[SH]<sub>2</sub> y GSH, *T. cruzi* posee también niveles significativos de vitamina C (ascorbato) (Fig. 4), como otra molécula antioxidante ubicua. Los genes que forman parte de la vía de síntesis del ascorbato se encuentran presentes en el genoma del parásito y su biosíntesis probablemente tenga lugar dentro de los glicosomas [96]. Cabe destacar que la capacidad de sintetizar vitamina C se encuentra ausente en humanos. El ascorbato constituye entonces una molécula antioxidante alternativa, utilizada por la hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (APX) [97]. A pesar de estar presente en todos los estadios de desarrollo de *T. cruzi*, en el epimastigote, se encuentran cantidades significativas de ovotiol A (N<sup>1</sup>-metil-4-mercaptohistidina) (Fig. 4) como otro antioxidante tiólico de bajo peso molecular. El ovotiol A presenta una baja reactividad frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respecto de la observada para T[SH]<sub>2</sub>, y por otra parte, no se han identificado enzimas capaces de reducir esta molécula. Esto significaría que cualquier reacción que oxide al ovotiol A, dependerá en última instancia del sistema T[SH]<sub>2</sub>/TR para el reciclado de este antioxidante. Es por estos motivos que se considera que su contribución no sería tan relevante [98].

Otra característica destacable del sistema antioxidante del parásito, es su compartimentalización. En el citoplasma se encuentran localizadas la TryS y la tripanotión reductasa (TR). El T[SH]<sub>2</sub>, tal como se dijo anteriormente, contiene dos cisteínas con grupos sulfhidrilos susceptibles de ser oxidados, que son mantenidos en su estado reducido por la TR. Otras enzimas citoplasmáticas son la triparredoxina peroxidasa citosólica (cTXNPx o CPX), la superóxido dismutasa dependiente de hierro (FeSODb) y la peroxidasa dependiente de glutatión (GPX-I). En conjunto, estos

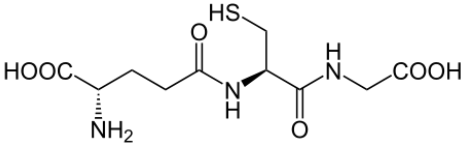
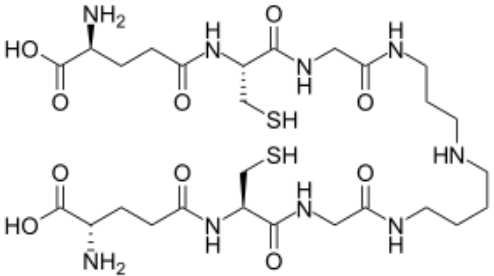
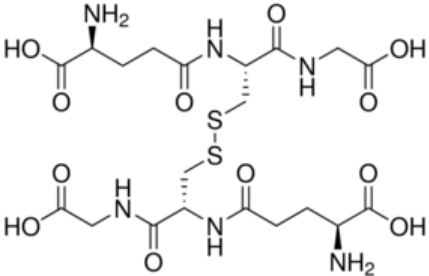
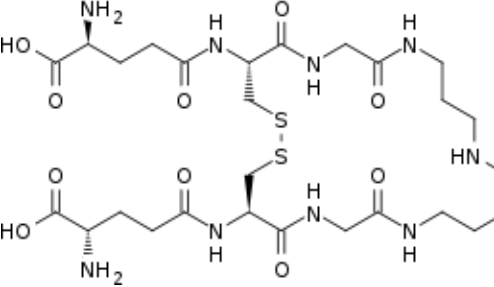
componentes junto con los antioxidantes no enzimáticos mantienen la homeóstasis redox a nivel citoplasmático (Fig. 5) [49].

Dentro de la matriz mitocondrial, donde tiene lugar la transferencia de electrones hacia el  $O_2$  y la consecuente formación de  $O_2\bullet^-$  como sub-producto, se encuentra i) otra superóxido dismutasa dependiente de hierro (FeSODa) que convierte  $O_2\bullet^-$  en  $H_2O_2$ . Luego, ii) la triparredoxina peroxidasa mitocondrial (mTXNPx o MPX) es capaz de detoxificar  $ONOO^-$  y  $H_2O_2$ , produciendo  $NO_2$  y  $H_2O$ , como productos respectivos [99–101]. En el retículo endoplasmático, donde el ambiente oxidativo es utilizado para la formación de uniones disulfuro en el plegado de proteínas [102], se encuentran dos peroxidases, i) la mencionada APX remueve  $H_2O_2$ , mientras que ii) la glutatión peroxidasa II (GPX-II) detoxifica hidroperóxidos en un mecanismo dependiente de GSH. Los tripanosomátidos utilizan además una forma especializada del peroxisoma llamada glicosoma, donde tienen lugar importantes vías metabólicas, incluyendo la PPP, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y la biosíntesis de pirimidinas, entre otras [103]. En esta organela se localizan las enzimas Fe-SODb, GPX-I y GPX-II [49] (Fig. 5), para protegerla del estrés oxidativo [104].

Resulta muy interesante que los niveles de expresión de la cTXNPx en citoplasma guardan una correlación con los niveles de expresión de la mTXNPx en mitocondria [105]. Esta observación, puede sugerir la existencia de un mecanismo de interacción entre las defensas antioxidantes del citosol y la mitocondria, o bien un sistema de regulación común. Otro componente fundamental en la red antioxidante de *T. cruzi* está dado por las triparredoxinas (TXN-I y TXN-II), que pertenecen a la superfamilia de las tiorredoxinas y transfieren equivalentes de reducción desde el  $T[SH]_2$  hacia las peroxidases. De acuerdo con el interactoma obtenido para la TXN-I, esta enzima sería capaz de interactuar con otros componentes del metabolismo oxidativo, con las vías de síntesis de cisteína y metionina, así como también con proteínas asociadas a la traducción y degradación [106]. De esta forma, estos elementos de la red permitirían integrar otras funciones celulares. La TXN-II por su parte, es una proteína transmembrana anclada en la superficie de la mitocondria y el retículo

## 1. Antecedentes

endoplasmático, con su dominio redox orientado hacia el citosol. La TXN-II sería capaz de interactuar con proteínas asociadas al sistema antioxidante, al metabolismo energético, citoesqueleto y a la maquinaria traduccional [107]. Debido a su ubicación se postula que esta enzima podría actuar como conexión entre el estado redox de diferentes organelas [107].

	GSH	T[SH] <sub>2</sub>
<b>Estructura química</b>		
- <b>Forma reducida</b>		
- <b>Forma oxidada</b>		
<b>Sustratos para la síntesis</b>	ATP, L-glutamato, L-cisteína, L-glicina	ATP, espermidina, GSH
<b>Enzimas</b>	GshA, GshB	TryS
<b>Coefficiente de reducción (E<sub>0</sub>) [108]</b>	E <sub>0</sub> = -2230 mV	E <sub>0</sub> = -2242 mV
<b>pKa [94]</b>	8.7	7.4
<b>Concentración</b>	~1 mM en sangre [109] ~6.9 mM, determinado en células HeLa [110]	0.12-0.64 nmol/10 <sup>8</sup> células [98] en epimastigotes; 0.25-0.95 nmol/10 <sup>8</sup> células en tripomastigotes sanguíneos [98,112]; 0.12 nmol/10 <sup>8</sup> células en amastigotes [112]

**Tabla 1: Comparación de T[SH]<sub>2</sub> y GSH como antioxidantes**

T[SH]<sub>2</sub> y GSH son los principales tioles de bajo peso molecular utilizados por el patógeno y el hospedador, respectivamente. Si bien ambas moléculas tienen similitudes a nivel estructural, difieren en algunos parámetros químicos. Siendo el T[SH]<sub>2</sub> más reactivo, en condiciones fisiológicas.

De esta forma se puede entender al sistema antioxidante de *T. cruzi* como un sistema flexible formado por variados componentes enzimáticos y no enzimáticos alternativos, con una organización compartimentalizada y a su vez que integrada, con puntos de contacto con otras vías metabólicas [106,107,113].

Vale la pena destacar que, de acuerdo con la secuenciación genómica de *T. cruzi* [114], las enzimas catalasa, glutatión reductasa, tiorredoxina reductasa y la glutatión peroxidasa dependiente de selenio no se encuentran presentes en el parásito. Sin embargo, estas ausencias no representan una debilidad en el manejo de ROS y RNS, tal como se especuló inicialmente. Por el contrario, el parásito cuenta con una red alternativa, y altamente eficiente que le permite resistir los diversos desafíos oxidantes. La naturaleza diferencial de sus componentes ofrecen a su vez la oportunidad de utilizarlos como blancos para el diseño de drogas tripanocidas.

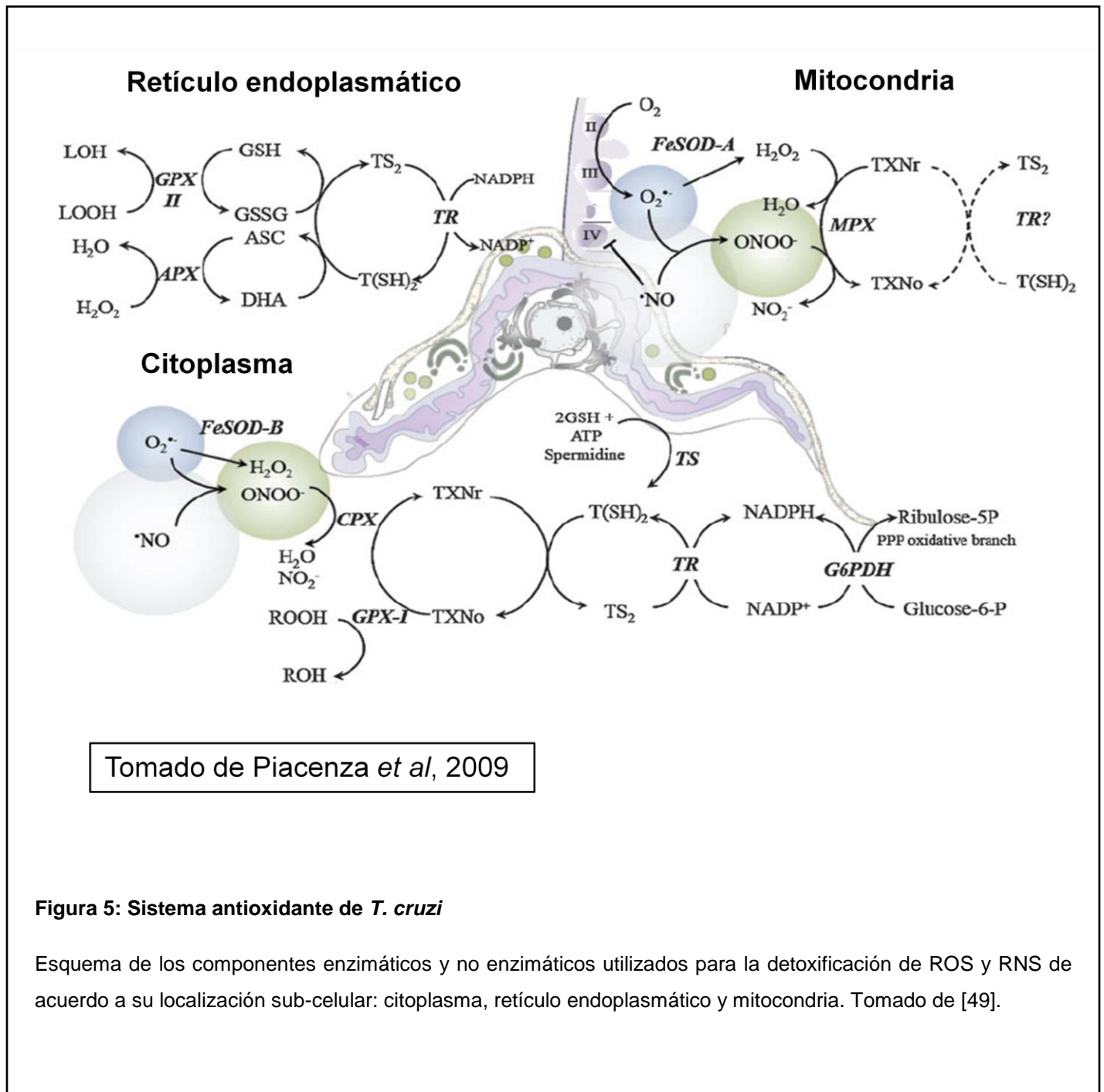
### 1.8. La enzima TryS

El objeto de estudio de este trabajo de Tesis es la enzima TryS (EC 6.3.1.9), que desempeña un rol fundamental en el sistema antioxidante de *T. cruzi* y otros tripanosomátidos. Esto es debido a que el T[SH]<sub>2</sub> es una molécula esencial para el funcionamiento de toda la red *río abajo* (*downstream*). Junto con la enzima TR, es capaz de llevar adelante muchas de las funciones metabólicas desarrolladas por el sistema GSH/GR y tiorredoxina/tiorredoxina reductasa en otros organismos [115].

TryS es una enzima bifuncional, con un dominio N-terminal con actividad amidasa capaz de hidrolizar T[SH]<sub>2</sub>. Mientras que en el dominio C-terminal radica la actividad sintetasa que como se dijo previamente, tiene lugar en dos pasos catalíticos secuenciales dependientes de ATP, con la formación de glutationilespermidina (Gsp, Fig. 6) como intermediario. En otros tripanosomátidos se identificó una enzima alternativa capaz de sintetizar este intermediario, la glutationilespermidina sintetasa (GspS), sin

## 1. Antecedentes

embargo se ha demostrado para *Leishmania* que no sería una enzima esencial [116]. En el caso de *T. cruzi* se encuentra presente en el genoma el gen completo para esta proteína, aunque no se ha profundizado en su caracterización [114].



**Figura 5: Sistema antioxidante de *T. cruzi***

Esquema de los componentes enzimáticos y no enzimáticos utilizados para la detoxificación de ROS y RNS de acuerdo a su localización sub-celular: citoplasma, retículo endoplasmático y mitocondria. Tomado de [49].

## 1. Antecedentes

La TryS es una flavoproteína monomérica de 72 kDa, codificada por un gen de copia única [114]. Se ha observado para la cepa CL Brener de *T. cruzi*, que presenta una alta divergencia entre los dos alelos identificados (4%) [117]. Si bien sus sustratos típicos son el GSH y la espermidina, esta enzima es capaz de catalizar la síntesis de T[SH]<sub>2</sub> a partir de poliaminas alternativas tales como espermina, N<sup>8</sup>-acetilespermidina y N-acetilespermina [118]. Cabe destacar que, debido a que *T. cruzi* es un organismo auxótrofo para las diaminas y poliaminas, la actividad de TryS podría funcionar además como un mecanismo para regular el nivel intracelular de poliaminas. Los análisis cinéticos a partir de TcTryS recombinante purificada a partir de *E. coli* revelaron que esta enzima tiene una alta inhibición por parte del sustrato GSH (*K<sub>m</sub>* y *K<sub>i</sub>* de 0.57 y 1.2 mM, respectivamente), mientras que para el resto de los sustratos obedece a una cinética clásica de Michaelis-Menten [90].

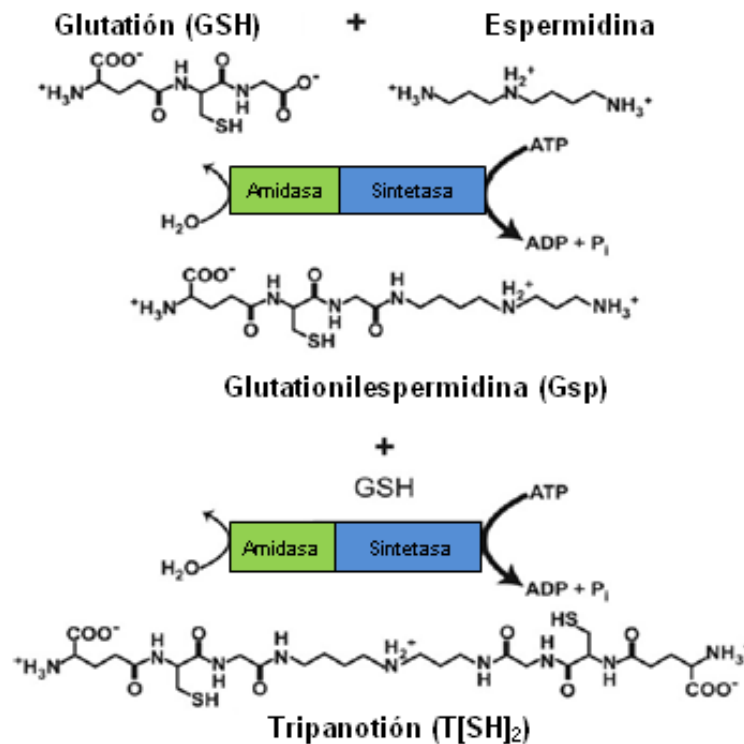
Si bien el carácter esencial de TryS en la biología de *Trypanosoma brucei* y *Leishmania sp.* pudo ser comprobado [116,119], el rol de esta enzima en el contexto de *T. cruzi* aún no ha sido completamente delineado, probablemente debido a las limitaciones que reviste este organismo en cuanto al uso de herramientas moleculares para su caracterización. Aunque existe una gran similitud en el sistema de T[SH]<sub>2</sub> entre los tripanosomátidos, existen también varias diferencias entre ellos que determinan la necesidad de su abordaje individual. Algunas de estas diferencias se presentan en la Tabla 2.

### 1.9. Procesos dependientes del entorno redox

En los últimos años, diferentes líneas de investigación identificaron varios procesos metabólicos dependientes del ambiente redox en tripanosomátidos, tal como ocurre en otros organismos eucariotas. Incluso, es sabido que bajos niveles de ROS, entre ellos el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, actúan como segundos mensajeros con un rol fundamental en diferentes procesos fisiológicos [120–123]. Bajo esta visión, el

## 1. Antecedentes

sistema antioxidante del parásito, no solo lo protegería del efecto deletéreo de ROS y RNS sino que también contribuiría a regular procesos dependientes del estado redox celular.



Tomado de Leroux *et al*, 2013

### Figura 6: Reacción enzimática catalizada por TryS

La enzima bifuncional TryS es capaz de producir T[SH]<sub>2</sub> en una reacción de dos pasos enzimáticos a partir de GSH y espermidina, con consumo de dos moléculas de ATP. La glutacionilespermidina (Gsp) es un producto intermedio generado durante esta reacción. Tomada de [124].



## 1. Antecedentes

Organismo	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>	<i>Leishmania sp.</i>	<i>C. fasciculata</i> <sup>(*)</sup>
<b>Carácter de TryS</b>	No determinado	Esencial	Esencial en <i>L. infantum</i>	No determinado
<b>Abordaje Utilizado para su análisis</b>	Sobre-expresión e inhibición farmacológica (utilizado en este trabajo de Tesis)	- <i>Knock down</i> mediante <i>ds</i> ARNi [118,125] -Doble <i>Knock out</i> condicional [119]	- <i>Knock out</i> de TryS y GspS [116]	Expresión heteróloga y caracterización bioquímica [126]
<b>TryS</b>	Cataliza la reacción completa de síntesis de T[SH] <sub>2</sub> El dominio amidasa es capaz de hidrolizar T[SH] <sub>2</sub> , homotripanotión y glutationileespermidina [90]	Cataliza la reacción completa de síntesis de T[SH] <sub>2</sub>	Cataliza la reacción completa de síntesis de T[SH] <sub>2</sub>	Cataliza la reacción completa de síntesis de T[SH] <sub>2</sub> .
<b>GspS</b>	El análisis genómico demuestra que se retiene copia <i>full length</i> del gen, sin caracterización funcional ni bioquímica de la proteína codificada	Poca información disponible, pero sería una situación similar a la de <i>T. cruzi</i> [127]	-En <i>L. infantum</i> y <i>L. mexicana</i> , el análisis genómico demuestra que se retiene copia <i>full length</i> del gen, la enzima no es esencial. - <i>L. major</i> y <i>L. braziliensis</i> poseen pseudogenes. - <i>L. donovani</i> y <i>L. amazonensis</i> no tendrían GspS	Cataliza la síntesis de Gsp [128]
<b>Sustratos</b>	-No existe síntesis <i>de novo</i> de poliaminas, debe incorporar cadaverina o putrescina por transportadores de alta afinidad [129] -Amplia especificidad de sustratos tipo poliamina: espermidina, espermina, N <sup>8</sup> -acetileespermidina y N-acetileespermina. -Alta inhibición por sustrato GSH	-Origen endógeno de espermidina vía ornitina decarboxilasa -Ausencia de transportadores de cadaverina, putrescina y espermidina	-Origen endógeno de espermidina vía ornitina decarboxilasa. -Ausencia de transportadores de cadaverina, putrescina y espermidina	-Origen endógeno de espermidina vía ornitina decarboxilasa.

**Tabla 2: Diferencias en el sistema de TryS/T[SH]<sub>2</sub> entre diferentes tripanosomátidos**

A pesar de que todos los tripanosomátidos utilizan el T[SH]<sub>2</sub> como tiol de bajo peso molecular para el intercambio de equivalentes de reducción y neutralización de ROS, el sistema de poliaminas y tioles en cada organismo no es estrictamente igual en todos ellos. <sup>(\*)</sup> Organismo modelo utilizado para el estudio de vías metabólicas de patógenos del género *Trypanosoma* y *Leishmania*. *ds* ARNi, ARN de interferencia doble cadena.

## 1. Antecedentes

Brevemente, se mencionan a continuación algunos de estos fenómenos. Uno de ellos es la muerte celular programada (PCD, por su sigla en inglés *Programmed Cell Death*), un proceso ya caracterizado en *T. cruzi* [130,131] en el cual la mitocondria juega un rol fundamental para su regulación. El suero humano fresco es un inductor de esta respuesta de muerte celular y en epimastigotes se observó además un aumento concomitante de ROS y una disminución en los niveles de T[SH]<sub>2</sub> y GSH, en respuesta a su exposición. Incluso, la sobre-expresión de una enzima del sistema antioxidante, como la FeSODa, logró proteger al parásito de la activación de la apoptosis [111], sugiriendo que *T. cruzi* utilizaría sus herramientas antioxidantes como un mecanismo para sobrevivir en el torrente sanguíneo, evitando entrar en un proceso de muerte celular, y favoreciendo la diseminación de la infección.

Otro fenómeno relacionado al ambiente redox, es la síntesis de nucleótidos *de novo*, requeridos para la replicación del ADN y mecanismos de reparación. En este sentido, se ha observado en *T. brucei*, que el T[SH]<sub>2</sub> en su estado oxidado es capaz de inhibir la síntesis de desoxirribonucleótidos [95]. También en este organismo, se ha demostrado la transferencia de poder reductor proveniente del T[SH]<sub>2</sub> hacia la ribonucleótido reductasa, encargada de la síntesis de precursores para la replicación del ADN en un mecanismo mediado por la mTXNPx [95]. Por lo tanto podría decirse que, la relación  $T[SH]_{2-red}/T[SH]_{2-ox}$ , al menos parcialmente, regularía la síntesis de ADN necesaria para la replicación celular.

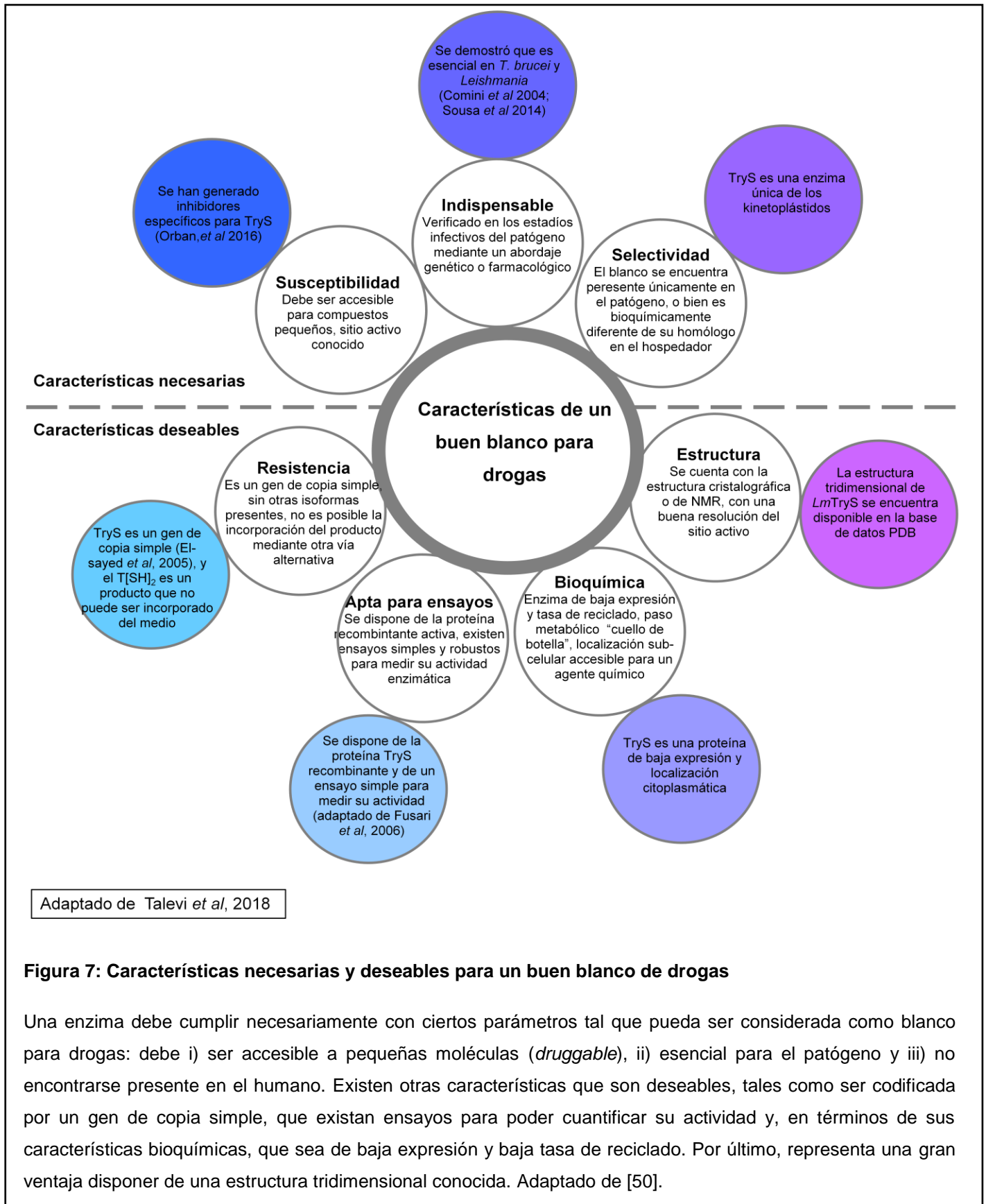
También, la replicación del ADN kinetoplastídico (ADNk) es un proceso dependiente del entorno redox. La replicación de los minicírculos del ADNk de *T. cruzi* es un mecanismo complejo que comienza con la unión de la proteína UMSBP (*Universal Minicircle Sequence - Binding Protein*) a la secuencia blanco UMS (*Universal Minicircle Sequence*) ubicada en el origen de replicación de los minicírculos [132]. Resulta muy interesante que la afinidad de UMSBP por su secuencia blanco es sensible al potencial redox [133,134] y es regulada mediante la mTXNPx [135,136]. Nuevamente, el

ambiente redox podría regular, al menos parcialmente, no sólo la producción de precursores para la síntesis de ADN genómico sino también la replicación del ADNk y por lo tanto, la entrada en mitosis.

Es posible que el estudio de los interactomas de diferentes componentes del sistema antioxidante de *T. cruzi*, u otros kinetoplástidos, brinden más información acerca de la relación de esta red con enzimas de otras vías metabólicas.

### 1.10. La enzima TryS como blanco para drogas

El sistema antioxidante de los tripanosomátidos presenta diversos componentes que se postulan, desde hace muchos años, como buenos candidatos para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos [47,92,104,137,138]. Esto se debe a que este sistema difiere del utilizado por la mayoría de los eucariotas superiores, tal como se comentó en apartados anteriores. Dentro del metabolismo de tioles y poliaminas, la TryS es el blanco más atractivo debido a que cumple con todas las características requeridas y deseables para un blanco terapéutico [50]. i) La TryS es una enzima exclusivamente presente en los kinetoplástidos, ii) es de abundancia relativa baja y de localización sub-celular citoplasmática [90], por lo que su ubicación sería de fácil acceso para la droga. Además, iii) se trata de una enzima esencial tal como se demostró para *Leishmania sp.* y *T. brucei*, [116,119,125] (ver Tabla 2). Por otra parte, TryS iv) tiene una cinética ya caracterizada [90] y lo que es fundamental, v) resulta ser una enzima susceptible de ser inhibida (*druggable*) [93,139,140] y vi) con una estructura tridimensional disponible [141] (Fig. 7).



**Figura 7: Características necesarias y deseables para un buen blanco de drogas**

Una enzima debe cumplir necesariamente con ciertos parámetros tal que pueda ser considerada como blanco para drogas: debe i) ser accesible a pequeñas moléculas (*druggable*), ii) esencial para el patógeno y iii) no encontrarse presente en el humano. Existen otras características que son deseables, tales como ser codificada por un gen de copia simple, que existan ensayos para poder cuantificar su actividad y, en términos de sus características bioquímicas, que sea de baja expresión y baja tasa de reciclado. Por último, representa una gran ventaja disponer de una estructura tridimensional conocida. Adaptado de [50].

## **2.OBJETIVOS**

## 2. Objetivos

En base a los antecedentes expuestos, queda manifiesta la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EdC, especialmente para la fase crónica de la enfermedad. La enzima TryS, al ser una proteína específica de los kinetoplastos, codificada por un gen de copia simple y de carácter esencial, de acuerdo a lo observado para *T. brucei* y *Leishmania* sp., resulta sin dudas un blanco promisorio para la generación dirigida de nuevas drogas o el reposicionamiento de fármacos. A su vez, se trata de una enzima con un rol fundamental dentro del sistema antioxidante de *T. cruzi*, el cual no solo cumple funciones redox sino que también ejerce una regulación sobre otras vías metabólicas. Sin embargo, hasta el momento, el estudio funcional de TryS no había sido abordado en profundidad para este patógeno en particular.

En este marco, el objetivo general de este trabajo de Tesis, fue la caracterización funcional de TryS en el contexto de la biología de *T. cruzi*, abarcando diferentes estadios de su complejo ciclo de vida. De esta forma, se contribuiría a validar su uso como potencial blanco de tratamiento y se aportaría al conocimiento a través de la descripción de los efectos que traería su inhibición para el patógeno.

Como objetivos particulares se propuso:

- Generar parásitos recombinantes sobre-expresantes de TryS en su forma *wild type*.
- Caracterizar los parásitos recombinantes desde un punto de vista bioquímico y molecular.
- Estudiar el rol de la enzima TryS en diferentes fases del ciclo de vida de *T. cruzi* y en relación a diferentes procesos metabólicos: proliferación, metaciclogénesis, resistencia a estrés oxidativo y drogas tripanocidas, infectividad.
- Analizar las posibles funciones que esta enzima pueda tener en la interacción con células del hospedador.

# 3.MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Técnicas moleculares y bioquímicas

##### 3.1.1. Técnicas analíticas de ácidos nucleicos

##### **Extracción de ADN genómico de tripanosomas y tejidos**

Aproximadamente  $10^8$  epimastigotes en fase logarítmica tardía se centrifugaron a 3,000 rpm (950 x *g*) durante 10 min a temperatura ambiente. El precipitado se lavó dos veces con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4), se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de solución de lisis para ADN (50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) y se agregó 0.1 mg/ml de Proteinasa K, dejando incubar por 3 h a 60°C. A continuación, se extrajo el ADN con 1 volumen de Fenol saturado con Tris-HCl pH 8.0, y se centrifugó a 13,000 rpm (18,000 x *g*) por 10 min a temperatura ambiente, este paso se repitió por 2 veces adicionales. La fase acuosa recuperada se extrajo 2 veces con 1 volumen de cloroformo y se volvió a centrifugar por 5,000 rpm (2,600 x *g*) por 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se precipitó con 0.1 volumen de 3 M acetato de sodio (pH 5.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, dejando incubar toda la noche (*overnight*) a -20°C. Luego de esto, se centrifugó el ADN precipitado a 45,000 rpm (20,800 x *g*) por 10 min a 4°C, se lavó dos veces con una solución de 70% etanol y se resuspendió en 100-200  $\mu\text{l}$  de *buffer* TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) o agua *mQ*. Por último, se procedió a la cuantificación y evaluación de la pureza del producto obtenido mediante espectrofotometría, por absorbancia a 260/280 nm y se evaluó su integridad mediante su visualización en una electroforesis en gel de 1% agarosa. Se conservó a -20°C hasta su utilización.



### 3. Materiales y métodos

Las muestras de tejido proveniente de ratones (sangre, corazón, colon y músculo esquelético) se procesaron para la obtención de ADN apto para su análisis por qPCR, mediante el kit comercial *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante.

#### **Aislamiento de ADN plasmídico (*Mini prep*)**

Todas las purificaciones se realizaron por el método de lisis alcalina [226]. Se partió rutinariamente de 2 ml de cultivo bacteriano crecido en medio Luria Bertani (LB) a 37°C con agitación vigorosa, el cual se cosechó mediante centrifugación a máxima velocidad (~15,000 x g) por 30 seg a 4°C. Se descartó completamente el sobrenadante (SN) invirtiendo el tubo y el precipitado (*pellet*) obtenido se resuspendió en 100 µl de la solución PI pre-enfriada (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM glucosa) conteniendo 1 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incubó durante 5 min en hielo. Luego, se agregaron a esta mezcla, 200 µl de la solución de lisis alcalina PII (0.2 N NaOH, 1% SDS, preparada en el momento), se homogeneizó por inversión y se incubó por otros 5 min en hielo. A continuación, se agregaron 150 µl de la solución de neutralización PIII (3 M acetato de potasio, pH 4.8). Luego de una tercera incubación de 5 min en hielo, se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a 4°C y se recuperó el SN. A este, se le adicionó 1 volumen de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico en una relación 24:1 para extracción del ADN. Después de una agitación por inversión se centrifugó a máxima velocidad, por 5 min a 4°C, desechando la fase orgánica. Sobre la fase acuosa se realizó la precipitación del ADN plasmídico mediante la adición 2 volúmenes de isopropanol (opcional: incubar a -20°C por 1-2 h). Luego se centrifugó a máxima velocidad por 10 min a 4°C y este *pellet* obtenido se limpió de sales remanentes con un lavado en una solución de etanol al 70%, dejando secar por completo el tubo abierto a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 50 µl de agua *mQ* o *buffer* TE. En todos los casos se cuantificó y se evaluó la pureza del producto obtenido

### 3. Materiales y métodos

mediante espectrofotometría, por absorbancia a 260/280 nm. Las muestras obtenidas se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Para una mayor pureza de los plásmidos utilizados en las transfecciones, este material se obtuvo con el kit *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Cat # 12162) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final y en tiempo real

Para las reacciones de PCR en tiempo final, se utilizaron las enzimas Taq ADN polimerasa (Invitrogen) o Pfu ADN polimerasa (Fermentas). Se llevaron a cabo en una mezcla de reacción conteniendo 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de los desoxirribonucleótidos dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 0.2 µM de cada oligonucleótido cebador, 0.75 U de enzima y 500 ng de ADN total de epimastigotes, en un volumen final de 25 µl. La temperatura de elongación fue la adecuada para cada polimerasa (72°C Taq y 68°C Pfu). La temperatura de anidado (*annealing*) utilizada para cada reacción fue la sugerida por el programa Vector NTI v.10 de Invitrogen, de 5°C por debajo de la *T<sub>m</sub>* (*Temperature of melting*) de los oligonucleótidos correspondientes. El tiempo de elongación fue estimado de acuerdo al largo de cada producto y teniendo en cuenta las velocidades de incorporación de nucleótidos por minuto de las enzimas utilizadas (1000 y 500 nucleótidos por minuto para la enzima Taq y Pfu, respectivamente). Los oligonucleótidos empleados como cebadores se detallan en el ANEXO B.

Para los ensayos de *Colony* PCR, se procedió de igual forma, tomando las muestras de ADN molde mediante el repique directo de las colonias de interés (tomado con la punta de un tip) a partir de medio LB Agar, suplementado con el antibiótico correspondiente. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador de gradiente *Verity* (ThermoFisher Scientific).

### 3. Materiales y métodos

En el caso de las PCRs cuantitativas (qPCRs) se usó *SYBR green* como agente intercalante para su detección, utilizando la *iTaq Universal SYBR green supermix* (Bio-Rad), 300 nM de cebadores directo (F) y reverso (R), y ~50 ng de ADN total por muestra. Se analizaron mediante un termociclador *iCycler IQ* (Bio-Rad), utilizando los oligonucleótidos *Tc18S-F* y *Tc18S-R* (ver ANEXO B) para la amplificación del ADN de *T. cruzi*. Los resultados se normalizaron respecto de la amplificación del gen murino *gapdh* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) utilizando los oligonucleótidos *gapdh-F* y *gapdh-R* (ver ANEXO B). Para determinar los equivalentes parasitarios por muestra, se utilizó una regresión lineal (realizada con ambas variables transformadas como  $X=\log(X)$  e  $Y=\log(Y)$ ) a partir de los valores de ciclo umbral o *Ct* (*cycle threshold*) obtenidos en la curva de calibración. Para la obtención de las curvas se utilizaron diluciones de ADN total correspondientes a 0.005-50,000 parásitos/ml. Lo mismo se realizó para la determinación de células, realizando una curva a partir de ADN extraído de células RAW 264.7 (murinas) y abarcando concentraciones de ADN correspondientes a  $250-2.5 \times 10^8$  células/ml. Finalmente se normalizaron los valores de equivalentes de parásitos, respecto de la cantidad de células murinas estimadas por muestra.

#### Digestión con enzimas de restricción

Para todas las estrategias de clonado empleadas, se utilizó alrededor de 1 U de enzima por  $\mu\text{g}$  de ADN a digerir, utilizando 100  $\mu\text{g/ml}$  de BSA y el *buffer* óptimo para cada una de acuerdo a las condiciones descritas por el fabricante (New England Biolabs o Fermentas). Se incubó luego por períodos de 2-3 h a 37°C en termobloque. Para el caso de digestiones dobles con enzimas no compatibles, se llevó a cabo la primera digestión en un volumen de reacción de 100  $\mu\text{l}$ . Cumplido el tiempo de incubación de la primera enzima, se agregó 0.1 volumen de solución PIII (3 M acetato de potasio, pH 4.8) y 2.5 volúmenes de etanol al 100% (calidad biología molecular), y las muestras se incubaron a -20°C durante 1-2 h. Luego, para precipitar el ADN, se centrifugó a 13,000 rpm (11,000 x

### 3. Materiales y métodos

g) durante 20 min a 4°C y el *pellet* se lavó en una solución de etanol al 70%. Una vez seco, se lo resuspendió en la mezcla de reacción de la segunda endonucleasa.

#### Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN resultantes de los ensayos de restricción o productos de PCR, se identificaron mediante una corrida electroforética en geles de agarosa. Para tal fin, se sembraron con *buffer* de siembra (BS) 1X (BS 6X: 0.25% p/v azul de bromofenol, 0,25 % p/v xilen cianol, 30% glicerol) y se separaron en geles de agarosa típicamente al 1% para geles de rutina, conteniendo 0.5 µg/ml bromuro de etidio. Las corridas se llevaron a cabo en condiciones de voltaje constantes (5 V/cm) durante aproximadamente 1 h. Se utilizó *buffer* TBE 0.5X (TBE 10X: 0.45 M Tris-borato, 0.01 M EDTA, pH 8.3) o bien TAE (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA.) en aquellos casos donde se requirió una purificación de banda posterior. El ADN se visualizó por la fluorescencia inducida al exponer el gel teñido con bromuro de etidio a luz ultravioleta en un equipo *ChemiDoc-It<sup>2</sup> Imager* (UVP).

#### Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para la purificación de ADN a partir de un taco de gel de agarosa se utilizó el kit comercial de extracción *PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen), basado en la retención por afinidad del ADN en columnas de sílica en altas concentraciones de sal, siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### Ligación de fragmentos de ADN

Para todas las ligaciones de fragmentos se utilizó la enzima DNA ligasa, del bacteriófago T4 (New England Biolabs), en una concentración de 0.4 U por reacción, y con su *buffer* correspondiente, realizando las incubaciones ya sea *overnight* a 4°C o bien por 3-4 h a temperatura ambiente. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10-20 µl, utilizando 50 ng de vector y la cantidad necesaria de inserto para obtener una relación 1:3 (vector:inserto).

#### Clonado molecular

Para la construcción de los plásmidos pRSET-A.TryS y pTREX.TryS, se diseñaron oligonucleótidos cebadores (ver ANEXO B) sobre la base de la secuencia codificante completa de *Tctrys* (GenBank AF311782.1, ver ANEXO A). Se adicionaron en estos oligonucleótidos, los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* para el clonado direccional y bases extras para su clonado en marco de lectura. Luego de obtener el producto de PCR, este se purificó utilizando el kit comercial *PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo kit* (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El producto purificado se insertó en el vector pGEM T-Easy (como se describió en el apartado precedente) para facilitar su manejo posterior. Esta construcción preliminar se amplificó a través de su transformación en bacterias competentes *E. coli* DH5α, que se cultivaron en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina como antibiótico de selección y posterior extracción del ADN plasmídico. Esta construcción pGEM-T.TryS aislada se digirió junto con los plásmidos prSET-A y pTREX utilizando las enzimas de restricción elegidas para el clonado y en las condiciones citadas en el párrafo precedente. Se procedió a la ligación de acuerdo al protocolo ya detallado previamente. Los productos de esta reacción, se transformaron luego en bacterias *E. coli* DH5α (de acuerdo a lo descrito en apartado 7.2) para finalmente purificar los plásmidos obtenidos. Las construcciones recombinantes se evaluaron mediante *Colony PCR* amplificando las zonas de inserción, mediante su

digestión por enzimas de restricción y secuenciación automática en el servicio del Instituto Cerela (UNT-CONICET, Tucumán, Argentina).

#### 3.1.2. Técnicas analíticas de proteínas e inmunológicas

##### Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Para la expresión de la proteína TryS recombinante (TryS<sub>rec</sub>) se utilizó el plásmido pRSET-A (ThermoFisher) como se describió en la sección de clonado molecular. Este plásmido permite dos objetivos: a) lograr altos niveles de expresión y b) expresar el gen de interés fusionado al *tag* de poli-histidina (6XHis). Para su expresión, la construcción pRSET-A.TryS se transformó en *E. coli* BL21(DE3), mediante *shock* térmico (descrito en apartado 7.2).

La purificación se realizó a partir de un cultivo bacteriano de inicio (*starter*) de 5 ml incubado durante una noche en medio LB selectivo de Ampicilina y Cloranfenicol, a 37°C y agitación vigorosa. Este fue luego diluido 1:25 en 250 ml de LB y crecido a 37°C con agitación hasta una OD<sub>600nm</sub>=0.5. El cultivo fue inducido con el agregado de 1 mM Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma) e incubado por 5 h a 28°C en agitación, para favorecer la expresión por sobre la mitosis. Luego, se centrifugó a 4,000 rpm (1,700 x *g*) durante 10 min a 4°C y el *pellet* de bacterias cosechado se resuspendió en 10 ml de *buffer de pegado* (*binding buffer*, 20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.4) de condiciones no desnaturizantes, suplementado con 1 mM PMSF. A continuación, se incubaron las muestras con 0.2 mg/ml de lisozima, 20 µg/ml DNAsa y 1 mM MgCl<sub>2</sub>, agitando durante 30 min en hielo y luego se procedió a la lisis mecánica por sonicación (4 pulsos intermitentes de 20 seg en hielo). El lisado obtenido se centrifugó a 14,000 rpm (21,000 x *g*) por 20 min a 4°C. Para purificar la proteína recombinante, el sobrenadante se sembró en columnas de níquel-

### 3. Materiales y métodos

sefarosa *His GraviTrap* (GE Healthcare) que permiten la purificación de proteínas conteniendo 6XHis por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés); y se permitió el pasaje del SN por gravedad a través de la columna. Luego, se realizaron 2 lavados de 20 ml cada uno con el *buffer* de pegado y finalmente se eluyó la proteína recombinante con 2 pasajes de 3 ml cada uno de *buffer* de elusión (20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7.4). Las fracciones fueron visualizadas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), junto con el extracto total para evaluar la sobre-expresión de la proteína recombinante.

#### Obtención de sueros de inmunización

La síntesis del péptido LQSLAVPFGCVQGY de la región N-terminal de TryS, se encargó a la empresa GenScript (Piscataway, Nueva Jersey, EEUU) y se lo conjugó con la proteína albúmina sérica bovina (BSA) mediante la utilización de glutaraldehído. Brevemente, para ello, se disolvió 1 mg de BSA y 1 mg de péptido TryS N-Ter en 500  $\mu$ l de PBS y se agregaron, gota a gota, 200  $\mu$ l de 20 mM glutaraldehído (preparado fresco). Esta mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación orbital y la reacción se detuvo mediante el agregado de 50  $\mu$ l de 1 M Tris-HCl (pH 8.0). Se adicionó luego glicina hasta una concentración final de 10 mM para eliminar el glutaraldehído excedente y prevenir la formación de agregados proteicos. El producto obtenido se dializó *overnight* a 4°C contra 500 volúmenes de PBS, a través de un cassette de diálisis de 2,000 Da de *cut-off* (*Slide-A-Lyzer*, ThermoFisher Scientific).

Para obtener el anti-suero policlonal contra este antígeno, 400  $\mu$ g de BSA-TryS N-Ter se combinaron con 1:2 volumen de adyuvante de Freund completo (Sigma) mediante varios pasajes por una jeringa conectada a una aguja de 21-G hasta obtener una emulsión estable. El objetivo del adyuvante completo fue prolongar la persistencia del antígeno y aumentar las señales co-estimuladoras, favoreciendo la proliferación de linfocitos de manera inespecífica. La emulsión del

### 3. Materiales y métodos

antígeno se inoculó en conejo en forma intradérmica en 4 sitios múltiples, con la administración previa de una anestesia leve sobre el animal. Se realizaron posteriormente, dos inoculaciones de refuerzo de 250 µg de antígeno (BSA-TryS N-Ter) en 1:2 volumen de adyuvante incompleto de Freund a los 30 y 50 días posteriores a la primer inoculación vía intramuscular. Finalmente, 15 días posteriores al último refuerzo, se tomó sangre en ausencia de anticoagulante para la obtención del suero anti-TryS, para lo cual se incubó 1 h a 37°C para permitir la formación del coágulo y luego se separó el suero por centrifugación a 4,000 rpm (1,700 x g), durante 10 min a 4°C.

Para la purificación del anticuerpo obtenido, el suero se incubó (5 ml) durante toda la noche a 4°C con 800 µg de péptido TryS N-Ter, adsorbido sobre una membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos unidos a la membrana, se eluyeron luego con una solución de 0.1 M glicina-HCl (pH 2.7), agitando vigorosamente con vortex durante 10 min. La solución se neutralizó mediante el agregado de 0.1 volumen de 2 M Tris (pH 8.0), a fin de prevenir la desnaturalización de los anticuerpos producto del bajo pH utilizado en la elusión. Se controló esta mezcla con papel indicador de pH y se determinó la concentración de proteína mediante su absorbancia a 280 nm. Se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para la obtención de un anticuerpo policlonal anti-TryS en ratón, se inoculó la proteína TryS<sub>rec</sub> completa (25 µg/ratón) obtenida de acuerdo al método descrito en esta sección, en ratones BALB/c machos (de 60-90 días de vida), diluida 1:2 con adyuvante completo de Freund (Sigma) en forma intraperitoneal (volumen final de 100 µl/ratón). Se realizaron posteriormente dos refuerzos de 12,5 µg de proteína cada uno, en adyuvante incompleto con intervalos de 14 días. Los ratones se sangraron a blanco a los 10 días luego del último refuerzo y los sueros se obtuvieron luego de la formación del coágulo por incubación a 37°C por 1 h y centrifugación a 4,000 rpm (1,700 x g), durante 10 min a 4°C. Todos los sueros se conservaron a -20°C.



#### Extractos proteicos para SDS PAGE

Los homogenados de proteínas de parásitos se obtuvieron mediante un ciclo de congelado-descongelado y posterior extracción con solución de lisis (50 mM HEPES, 200 mM NaCl y 1% NP-40, pH 7.4). Se emplearon cultivos de epimastigotes o tripomastigotes ( $3 \times 10^7$  parásitos), que se precipitaron por centrifugación a 3,000 rpm (950 x g) u 8,000 rpm (6,800 x g), respectivamente, durante 5 min a 4°C y se incubaron a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente el *pellet* se descongeló en hielo, y se homogeneizó en 100 µl de solución de lisis conteniendo 1X de cóctel de inhibidores de proteasas (2 mM AEBSF, 0.3 µM aprotinina, 130 µM Bestatin, 1 mM EDTA, 14 µM E-64, 1 µM Leupeptina; Sigma). Se incubó 3 h en hielo y luego de centrifugar a 12,000 rpm (15,000 x g) por 20 min a 4°C, se separó el lisado proteico y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad). Brevemente, para esto, se colocaron en una placa de 96-pocillos, 10 µl de una dilución 1:20 en PBS de las muestras a determinar (por duplicado) y 200 µl de una dilución 1:5 en agua bidestilada del reactivo de Bradford. Al cabo de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 595 nm y se estimaron las concentraciones a partir de una curva de calibración de BSA (0.05 a 0.5 mg/ml).

#### SDS-PAGE

Los homogenados proteicos (60 µg de proteína total por calle) se resolvieron mediante su corrida electroforética en geles de 10% poliacrilamida. Cada gel se preparó a partir de 3 ml de solución de 30% acrilamida (29.2 g acrilamida, 0.8 g bisacrilamida, en 100 ml de agua); 2.25 ml de *buffer* de separación (1.5 M Tris-HCl, pH 8.0), 40 µl de 10% persulfato de amonio y 3.75 ml de agua deionizada. Se inició la polimerización del mismo mediante el agregado de 5 µl de TEMED. Se sembraron las muestras en estos geles desnaturalizantes mezclándolas en una relación 5:1, con *Laemmli Buffer* (para 5X: 50% (v/v) glicerol, 7.7 % (p/v) DTT, 10% (p/v) SDS, 0.4 M Tris-HCl pH 6.8, 0.002% (p/v) azul

### 3. Materiales y métodos

de bromofenol). Las corridas se realizaron en Tris-Glicina-SDS (3,0 g Tris base, 14,4 g glicina, 1% SDS en 1 litro de agua *mQ*), a un amperaje constante de 20 mA por gel, durante 90 min a temperatura ambiente y se utilizó *PageRuler prestained protein ladder* (ThermoScientific) como marcador de peso molecular. Los geles se tiñeron en solución de Coomassie *blue* (0.25% v/v Coomassie R250, 30% metanol, 10% ácido acético) para la visualización de las proteínas.

#### **Western blot**

Los geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore), previamente activadas mediante su incubación con metanol por 30 seg. La transferencia se realizó por medio de un sistema húmedo, bajo un amperaje constante de 300 mA durante 1 h en solución de transferencia (Tris-glicina 1X, 20% metanol). Para comprobar la carga proteica y la eficiencia de la transferencia, se realizó la tinción reversible de la membrana con el colorante diazoico rojo Ponceau S (Sigma, 0.1% p/v en ácido acético 5%), durante 5 min en agitación suave. Luego de la detección de carga proteica, se lavó el colorante dos veces en agua bidestilada por 5 min a temperatura ambiente. Las membranas se bloquearon luego durante 1 h a temperatura ambiente en T-TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.05% Tween 20, pH 7.0) adicionado con leche deshidratada al 5%. A continuación se incubaron las membranas con el anticuerpo específico *overnight* a 4°C, en solución de T-TBS/leche 5%: con anti-TryS (en una dilución 1:200) o anti-GAPDH (gentilmente cedido por el Dr. C. Labriola, en una dilución 1:1500). Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se llevaron a cabo una serie de 3 lavados de 10 min en T-TBS, para incubar posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado peroxidasa (HRP, en una dilución 1:5000, Sigma, Cat # AQ132P) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitador orbital. Finalmente, luego de una nueva serie de lavados en T-TBS, se revelaron los complejos inmunes utilizando un sustrato quimioluminiscente ECL Pierce (ThermoScientific). La señal

quimioluminiscente producida se registró mediante autoradiografía en placas (GE Healthcare Life Sciences).

#### ***Dot blot***

Para los ensayos de *Dot blot* se sembró de 1 µg de proteína o extracto total de epimastigotes en membranas de nitrocelulosa. Luego de adsorbidas las muestras, se dejaron secar las membranas y se prosiguió con la misma metodología utilizada en los ensayos de *Western blot* para la detección de los complejos inmunes.

#### **Inmunofluorescencia indirecta**

Se emplearon  $5 \times 10^6$  epimastigotes por muestra, para lo cual los parásitos se lavaron tres veces en PBS, se resuspendieron en 200 µl del mismo *buffer* y se inmovilizaron durante 30 min sobre cubreobjetos tratados previamente con solución de poli-lisina (1 ml/25 cm<sup>2</sup>, 0.01% p/v de poli-lisina en agua bidestilada) a temperatura ambiente, para favorecer su adhesión. Se fijaron luego con solución de 4% m/v paraformaldehído en PBS por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un lavado adicional con 25 mM NH<sub>4</sub>Cl en PBS para la disminución de la autofluorescencia de las células. Para el bloqueo, se trataron los preparados durante 1 h a temperatura ambiente en una solución de 2% m/v BSA preparada en PBS y suplementada con 0.2% m/v saponina para permitir la permeabilización de los parásitos. Se utilizó como anticuerpo primario el anti-TryS obtenido contra el fragmento N terminal en conejo, y como anticuerpo secundario, un anti-conejo obtenido de cabra, conjugado con *Alexa fluor 488* (Thermo Fisher Scientific, Cat # A11008). Las incubaciones se realizaron en una dilución de 1:200 durante 2 h y en una dilución de 1:2500 durante 1 h, respectivamente, en solución de bloqueo (2% BSA, 0.2% saponina, en PBS). Y se realizaron tres

### 3. Materiales y métodos

lavados con PBS, durante 10 min cada uno, entre cada incubación. Finalmente se realizó una última incubación en una solución de PBS-DAPI (1 µg/ml) por 10 min para poder visualizar el ADN nuclear y del kinetoplasto de cada célula, y se montaron sobre un portaobjetos con *FluorSave Reagent* (Merck Millipore). Los preparados obtenidos fueron analizados en microscopio de epifluorescencia *Axio Imager 2* (Zeiss). Se utilizó el programa *Image J*, para realizar la combinación (*merge*) de las imágenes de fluorescencia tomadas con diferentes filtros.

#### ELISA

Las determinaciones de citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 murinas liberadas al sobrenadante por las células RAW 264.7, se realizaron mediante un protocolo de ELISA *Sándwich* (BD Biosciences), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se adhirió un anticuerpo de captura específico para cada citoquina (100 µl/pocillo) en placas de 96-pocillos, *overnight* a 4°C. Luego de remover este anticuerpo, se realizaron 3-5 lavados con PBS (realizados entre cada incubación) y se colocaron 200 µl/pocillo de solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Cumplido este tiempo, se removió la solución de bloqueo y se adicionaron los sobrenadantes de cultivo (100 µl por reacción) y los estándares, que se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Luego de realizados 3-5 lavados con PBS, se incubó con un anticuerpo primario de detección (asociado a HRP) durante 1 h a temperatura ambiente, se repitieron 3-5 lavados, manteniendo cada uno por al menos 30 seg y por último para revelar la formación de los complejos inmunes se utilizó TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) como sustrato, dejándolo actuar durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción se detuvo mediante el agregado de 50 µl/pocillo de una solución de 2 N ácido sulfúrico. La lectura se realizó en espectrofotómetro de placa, a 450 y 570 nm para la corrección de los datos, dentro de los 30 min de finalizada la reacción. Para todas las citoquinas, se realizó una curva de calibración a partir de

diluciones al medio de las muestras estándar y abarcando el rango de concentraciones sugeridas por el fabricante.

#### 3.1.3. Técnicas bioquímicas

##### Determinación de la actividad enzimática de TryS

La actividad enzimática específica (AEE) de TryS se determinó mediante una técnica que emplea verde de malaquita para cuantificar el fosfato inorgánico proveniente del ATP, liberado durante la catálisis [153]. Brevemente, se adicionaron 50  $\mu$ l de *buffer* de reacción (50 mM HEPES pH 8.0, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT) conteniendo 0.5 mM GSH, 10 mM espermidina y 1 mM ATP en una placa de 96-pocillos. La solución de malaquita, preparada en el momento de uso, se obtuvo mezclando 0.5 mM verde de malaquita (Sigma, Cat # M6880) y 0.034 M molibdato de amonio, en 4 M HCl y 2% Tween 20 (en una relación v/v/v de 3.0:1.0:0.6). Los homogenados totales de parásitos se obtuvieron a partir de  $1.5-5 \times 10^7$  células en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl y 1% v/v NP-40). Se inició la reacción adicionando 10  $\mu$ l de los extractos de epimastigotes o tripomastigotes a los pocillos y luego de 10 min de incubación a 37°C, se detuvo con el agregado de 200  $\mu$ l de la solución fresca de malaquita. A los 30 min, se realizó la lectura de las absorbancias a 650 nm en un equipo *Multiskan Ascent Microplate Reader* (Thermo Electron). Los valores obtenidos se relativizaron respecto del total de proteínas, determinado a través del ensayo colorimétrico de Bradford (Bio-Rad), descrito en párrafos anteriores. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y la actividad enzimática se expresó como mU por mg de proteína. Una unidad (U) de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1  $\mu$ mol de ATP por minuto en las condiciones especificadas.

#### Determinación del contenido total de T[SH]<sub>2</sub> y GSH

Se resuspendieron epimastigotes y tripomastigotes (pTREX y TryS<sup>hi</sup>) en 4% p/v ácido tricloroacético (1x10<sup>7</sup> parásitos en 50 µl) y se incubaron 10 min a 4°C. Los lisados obtenidos se centrifugaron a 21.000 x g por 30 min a 4°C y los sobrenadantes se liofilizaron y resuspendieron en 30 µl de agua mQ para iniciar la reacción enzimática para la determinación de T[SH]<sub>2</sub> o GSH. Para la cuantificación de T[SH]<sub>2</sub>, las muestras (5 µl) se mezclaron en una relación 1:10 con *buffer* de reacción (400 µM NADPH, 5 nM tripanotión reductasa recombinante, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM DTNB). La reducción del DTNB, dependiente de T[SH]<sub>2</sub> se midió a través de espectrofotometría, utilizando el modo cinético a 405 nm. El contenido de GSH total se determinó con un procedimiento similar de reciclado enzimático, tal como se describió en publicaciones previas [154].

#### 3.2. Manipulación de bacterias

##### Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el trabajo

- DH5α: F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-. Cepa de bacterias empleada en la manipulación de ácidos nucleicos.
- BL21(DE3): F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3). Cepa de bacterias empleada para la expresión de proteínas recombinantes. Es nula para proteasas y lisógena para el derivado del bacteriófago lambda DE3. Este último codifica para la ARN polimerasa del bacteriófago T7, cuya transcripción es regulada por el represor Lac.

#### Medios de cultivo y antibióticos utilizados para bacterias

- Luria Bertani (LB): se disolvieron: 10 g triptona de caseína, 5 g extracto de levadura y 5 g NaCl en 1 litro de agua *mQ*. Se autoclavó a 121°C por 20 min.
- SOB (para obtener bacterias competentes): se disolvieron: 20 g triptona de caseína, 5 g extracto de levadura, 0.5 g NaCl g, 0.186 g KCl en 950 ml de agua *mQ*. Se ajustó el pH a 7.0 con una solución de 5 N NaOH. Se llevó a 1000 ml y se autoclavó a 121°C por 20 min. Antes de utilizar se adicionaron 5 ml de una solución de 2 M MgCl<sub>2</sub> estéril.
- LB-Agar: se preparó LB y se adicionaron 15 g/l de agar antes de autoclavar. Posteriormente se dejó enfriar a 50°C y se adicionaron los antibióticos (opcional). Se dejó solidificar en placas de Petri.
- Antibióticos y concentraciones de utilización: los antibióticos fueron suplementados a las siguientes concentraciones finales: 100 µg/ml Ampicilina; 40 µg/ml Cloranfenicol.

#### Preparación de bacterias competentes DH5α o BL21(DE3)

A partir de una placa sembrada con *E. coli* DH5α o BL21, se picó una colonia aislada y se la inoculó en 10 ml de LB en un erlenmeyer de 125 ml. Se creció con agitación a 37°C hasta una DO<sub>600nm</sub>=0.3. Luego, se pasaron 5 ml de este cultivo a 100 ml de medio SOB en un erlenmeyer de 1,000 ml. Se lo dejó incubando en agitación vigorosa a 37°C hasta una DO<sub>600nm</sub>=0.44 y luego se colocó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 3,000 rpm (~950 x g) por 5 min a 4°C y se descartó el

### 3. Materiales y métodos

sobrenadante por inversión, asegurándose la eliminación del medio remanente sobre un papel *tissue*. A continuación, el *pellet* de bacterias se resuspendió cuidadosamente en 40 ml de solución Inoue fría (10,88 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2.2 g  $\text{CaCl}_2$ , 18,65 g KCl, 10 ml PIPES 0.5 M, en 1,000 ml de agua *mQ*, pH 6.7 esterilizada por filtrado) y se dejó en hielo 5 min. Luego se centrifugó a 3,000 rpm (950 x *g*) por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió nuevamente y siempre en hielo, en 4 ml de Inoue pre-enfriado y se incubó en hielo por 15 min. Las células se alicuotaron en tubos *ependorfs* estériles en volúmenes de 50 a 200  $\mu\text{l}$ , se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C hasta el momento de usar. Por transformación se utilizaron 50  $\mu\text{l}$  de bacterias. Adaptado de [226].

#### Cultivo y transformación de bacterias

Para la amplificación de los diferentes plásmidos recombinantes, se transformaron bacterias competentes de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ . Las bacterias se transformaron con la mitad de la reacción de ligación (5-10  $\mu\text{l}$ ), mediante la técnica de *shock* térmico. Para ello, se incubó la mezcla de bacterias competentes y ADN en hielo por 30 min para luego llevarla a 42°C por 90 seg en termobloque y hielo nuevamente durante 3 min. Finalmente, se agregó a cada reacción 750  $\mu\text{l}$  de medio LB (pre-entibiado) y se incubó por 1 h a 37°C, para permitir la recuperación de las bacterias. Del total del volumen de recuperación se sembraron 150  $\mu\text{l}$  en placas de LB-agar con el antibiótico correspondiente y se incubaron en estufa de cultivo a 37°C toda la noche. Para el caso de expresión de proteínas recombinantes, se transformaron bacterias de la cepa BL21(DE3), utilizando el mismo protocolo.



#### 3.3. Manipulación de parásitos

##### Medio de cultivo para epimastigotes

Para la preparación del medio LIT (infusión de hígado - triptosa) se disolvieron en 1,000 ml de agua bidestilada: 25.0 g *liver infusion* Broth (Difco), 5.0 g de triptosa (Difco), 4.0 g NaCl, 8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro, 0.4 g KCl, 2.0 g dextrosa anhidra. Se ajustó el pH 7.2 y se autoclavó por 30 min a 121°C. Se alicuotó en botellas de 100 ml estériles y se conservó a 4°C hasta el momento de uso. Antes de ser utilizado, se complementó con 10 mg/L de hemina estéril, SBF al 10% o 20% según corresponda y antibióticos (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin).

##### Cultivo de parásitos

Para todos los ensayos se utilizó una población parásitos de la cepa Sylvio X10/4 (ATCC 50823) de *T.cruzi* (*Tc*), obtenida a partir de un cultivo axénico. Los parásitos se mantuvieron mediante pasajes sucesivos cada 4-7 días, en medio de cultivo monofásico LIT, suplementado con SBF inactivado, al 10% para cultivos de rutina o al 20% durante el proceso de selección de parásitos transfectantes a una temperatura de 28°C y sin agitación. En el caso de los parásitos transfectados, se cultivaron en el mismo medio y condiciones de temperatura pero en presencia del agente de selección G418 (geneticina, Corning) en una concentración final de 300 µg/ml.

##### Transfección y clonado de parásitos

Para las transfecciones, se utilizaron  $1.5 \times 10^8$  parásitos por muestra. Brevemente, los parásitos en fase exponencial se cosecharon mediante una centrifugación a 3,000 rpm (~950 x g) durante 5 min

### 3. Materiales y métodos

a temperatura ambiente, luego de lo cual se realizaron dos lavados con 10 y 2 ml de PBS, respectivamente y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de solución de transfección HBS (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mM glucosa, pH 7.0). Para la electroporación se utilizaron de 20 a 30  $\mu$ g de ADN (previamente incubado a 95°C durante 5 min para su esterilización), que se pre-incubó durante 10 min en hielo con la suspensión de epimastigotes, para luego trasvasar todo el volumen a las cubetas de electroporación de 4 mm previamente enfriadas. La electroporación se realizó en un equipo BTX ECM 630, utilizando 2 pulsos secuenciales de 1500 V y 25  $\mu$ F. Las muestras se incubaron en hielo durante 10 min para permitir la recuperación de los parásitos luego de los pulsos eléctricos. A continuación, se cultivaron los parásitos en botellas con 3 ml de medio LIT, suplementado con 20% de SBF. Para su posterior selección, se adicionó el agente G418 (Corning) a las 24 h de realizada la electroporación, en una concentración inicial de 200  $\mu$ g/ml, y una semana más tarde se incrementó esta concentración a 300  $\mu$ g/ml. Se controlaron diariamente durante 45 días. Al cumplirse este período se procedió al clonado mediante la siembra de los parásitos (3-5x10<sup>3</sup> células totales) en placas de medio Usmaru [227] suplementadas con 300  $\mu$ g/ml G418 y se cultivaron a 28°C en cámara húmeda para recuperar las colonias luego de transcurridos ~30 días.

Para confirmar la correcta integración de los plásmidos (pTREX y pTREX.TryS), se obtuvo ADN total de las poblaciones clonales *wild type* (WT), transfectadas con pTREX y pTREX.TryS (de acuerdo al protocolo detallado previamente en el apartado 7.1). El ADN total (100 ng) se sometió a una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos complementarios al gen de resistencia a neomicina (*neo-F* y *neo-R*) y un segundo set de oligonucleótidos (*T7-F* y *RIB-R*) se usó para chequear la correcta integración del plásmido en el locus ribosomal 18S [152]. Todos los oligonucleótidos utilizados, con sus correspondientes valores de *T<sub>m</sub>* se listan en el ANEXO B.

#### Curvas de crecimiento y análisis de duplicación con CFSE

Para obtener las curvas de proliferación de epimastigotes, cultivos de poblaciones clonales y no clonales de pTREX y TryS<sup>hi</sup> se sincronizaron mediante su incubación en medio LIT sin suplementar con SBF por 24 h, a 28°C. Los epimastigotes se sembraron luego en placas de 24-pocillos (5x10<sup>5</sup> parásitos/pocillo en 1 ml de medio LIT completo) y se incubaron a 28°C sin agitación. La cantidad de parásitos se obtuvo mediante su recuento diario en cámara de Neubauer, a través de microscopía óptica (objetivo de 25X). La tasa de crecimiento y tiempo de duplicación se estimaron mediante la herramienta de crecimiento exponencial del programa *GraphPad Prism 5*.

Para el análisis mediante citometría de flujo, se sincronizaron epimastigotes (5x10<sup>6</sup> por muestra) y se incubaron en 1 ml de PBS con 5 µM *CellTrace CFSE* (Thermo Fisher Scientific, Cat # C34554) por 20 min, se lavaron 3 veces en 1 ml de PBS y se resuspendieron en 1 ml de medio LIT completo, para ser incubados por 3 días a 28°C. Luego, se centrifugaron los parásitos a 3,000 rpm (950 x g) por 5 min a temperatura ambiente, y se incubaron con el colorante vital *Fixable Viability Dye eFluor 780* (en una dilución 1:1000 en PBS, Invitrogen, Cat # 65-0865-14) por 30 min a 4°C. A continuación, los epimastigotes se lavaron 3 veces con 1 ml PBS y se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS por 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se visualizaron a través de un equipo LSRII *Fortessa Cell Analyzer* (BD Biosciences), adquiriendo 100,000 eventos por muestra. Los datos fueron analizados con el programa *FlowJo v.10* (Tree-Star).

#### Obtención de tripomastigotes derivados de cultivo y parásitos metacíclicos

Para obtener formas infectivas, se resuspendieron epimastigotes (5 x 10<sup>8</sup> células/ml) en solución TAU (*Triatomine Artificial Urine*, 190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 8 mM *buffer* fosfato, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.8) y se incubaron por 3 h a 28°C. Luego, se transfirieron los parásitos a medio

### 3. Materiales y métodos

TAU3AAG (TAU suplementado con 0.035% NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM L-prolina, 50 mM glutamato de sodio, 2 mM L-aspartato y 10 mM glucosa) y se incubaron por 72-96 h a 28°C [228].

Para el ensayo de metacicloogénesis, se sincronizaron epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, mediante su incubación en medio LIT sin SBF por 24 h a 28°C. Luego, se incubaron en medio LIT completo suplementado con 10% de homogenado intestinal de *T. infestans* (HV) [228] a 28°C. Se realizó el recuento de los parásitos diferenciados en cámara de Neubauer a través de microscopio óptico durante 10 días, y se identificaron de acuerdo con su morfología y movimiento. El HV se obtuvo a partir de *vinchucas* (*T. infestans*) que fueron alimentadas con sangre de ratón 5-7 días previos a la preparación del homogenado. Para ello, se removió con tijera el extremo posterior del abdomen de los insectos (de ~0.5 cm) y se colectó el contenido abdominal en PBS mantenido en hielo, utilizando pinzas de disección de acero inoxidable. Se utilizaron 10 insectos adultos para obtener 10 ml de macerado. Este, se incubó en agitación durante 1 h en hielo y posteriormente se esterilizó por filtración. Se conservó a -20°C hasta su utilización.

Los tripomastigotes metacíclicos obtenidos por su diferenciación en medio TAU3AAG, se utilizaron para infectar células de una línea murina de mioblastocitos, C2C12 (ATCC) en una relación 3:1 (parásito:célula). Los tripomastigotes liberados al medio de cultivo se cosecharon, mediante su centrifugación a 8,000 rpm (6,800 x g) por 10 min a temperatura ambiente, cada 2 días para los experimentos, y a su vez se propagaron por pasajes continuos en la misma línea celular.

#### Exposición a ROS y drogas anti-parasitarias

Epimastigotes y tripomastigotes derivados de cultivo celular (pTREX, TryS<sup>hi</sup> y WT) se sembraron en 100 µl de medio de cultivo en placas de 96-pocillos y se incubaron en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50-1000 µM, Santa Cruz Biotechnology, soluciones de trabajo preparadas en el día), acetato de cadmio (1-500 µM, Merck), nifurtimox (1-400 µM, CAS 26256-30-6, Sigma), o benznidazol (5-500 µM,

### 3. Materiales y métodos

CAS 22994-85-0, Santa Cruz Biotechnology), con tres réplicas para cada muestra y concentración utilizada. En algunos experimentos se adicionaron inhibidores de TryS KuOrb39 y KuOrb54 (5, 10 o 30  $\mu\text{M}$ ), que corresponden a los compuestos 3d y 3h descritos en Orban *et al*, 2016 [139] y cedidos por el grupo del Dr. Comini (Institut Pasteur de Montevideo, Ciudad de Montevideo, Uruguay). En todos los experimentos, los epimastigotes se sembraron ( $1 \times 10^4$ /pocillo/100  $\mu\text{l}$  LIT completo) e incubaron a  $28^\circ\text{C}$  por 24 h, mientras que los tripomastigotes ( $2.5 \times 10^5$ /pocillo/100  $\mu\text{l}$  RPMI 10% SBF) se incubaron 6 h a  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . Luego de estas incubaciones, las formas viables, móviles y con morfología normal, se contaron en microscopio óptico (con objetivos de 25X y 40X).

#### 3.4. Cultivo y ensayos con líneas celulares

##### Mantenimiento de células C2C12 y RAW 264.7

Los cultivos celulares para el mantenimiento de las líneas y la propagación de tripomastigotes, se realizó rutinariamente en frascos ventilados T75 con cambios de medio cada 3 días, mientras que los ensayos experimentales se realizaron en placas de 24, 48 o 96-pocillos o en cámaras desmontables (*chamber slides*) Nunc Lab-Tek II, y fueron cultivadas a  $37^\circ\text{C}$  con  $5\% \text{CO}_2$ . La línea celular murina de miocitos C2C2 (ATCC) se cultivó en medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco) con  $5\%$  o  $10\%$  SBF, para su mantenimiento o crecimiento, respectivamente. La línea de monocitos murinos RAW 264.7 se cultivó en medio DMEM alta glucosa (*Dulbecco modified Eagle medium*, Gibco), con  $10\%$  SBF y en ambos casos, los medios se suplementaron con 100 U/ml de ampicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina, 2 mM L-glutamina y 1 mM piruvato de sodio.

#### Determinación de marcadores apoptóticos

En todas las infecciones experimentales se utilizó una relación de 3:1 parásitos:célula y luego de 3 h de incubación a 37°C/5% CO<sub>2</sub> en *chamber slides*, se removieron aquellos parásitos remanentes del medio de cultivo mediante 2 lavados con RPMI sin SBF. Para la determinación del porcentaje (%) de células con hipercondensación de la cromatina, se fijaron las células con 4% paraformaldehído en PBS a temperatura ambiente durante 15 min, luego se lavaron los preparados por 5 min en PBS. A continuación, se permeabilizaron las células utilizando 0.15% Triton X-100 por 15 min a temperatura ambiente y se repitió un lavado de 5 min en PBS. Se tiñó el ADN con 2 µg/ml *Hoechst 33342* diluido en PBS, incubando por 10 min a temperatura ambiente. A diferencia del ioduro de propidio, también utilizado para la tinción del ADN, éste no se une al ARN, evitando el uso de RNAsa A. Se descartó luego el exceso de solución de *Hoechst* y se montaron los portaobjetos con *Prolong Gold antifade* (Molecular Probes) para su análisis en microscopio de fluorescencia utilizando el mismo filtro utilizado para la detección de DAPI, de una longitud de onda de absorción/emisión de ~340/510 nm. El recuento de núcleos totales por campo se realizó en el programa *ImageJ*, contabilizando  $\geq 3$  campos por réplica de tratamiento (con  $\geq 100$  células cada uno) mediante la herramienta *Analyze particles*.

La determinación de actividad caspasa-3 se realizó utilizando el sustrato *CellEvent Caspase-3/7Green* (Thermo Scientific, Cat # C10423), un péptido de cuatro aminoácidos (DEVD), conjugado a una molécula de unión a ácidos nucleicos (absorción/emisión de ~502/530 nm) que es capaz de entrar en el núcleo una vez dissociada del componente proteico. Para esto, se diluyó el sustrato en PBS-5% SBF en una concentración final de 5 µM, se añadió el sustrato a las células y se incubó durante 30 min a 37°C. Luego, se realizaron 2 lavados de PBS durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, se marcaron los núcleos con *Hoechst 33342* de acuerdo a lo descrito en el párrafo precedente, para el recuento de células totales por campo. Se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS durante 15 min y se montaron con *Prolong Gold antifade* (Molecular Probes), para ser analizadas mediante microscopía de fluorescencia dentro de las 24 h de realizada la tinción.

#### 3.5. Ensayos con animales de laboratorio

Ratones machos BALB/cJ (The Jackson Laboratory, EEUU.) de 5 semanas de edad se inocularon con 10,000 tripomastigotes/individuo pTREX o TryS<sup>hi</sup> (n=5 por grupo), vía intraperitoneal. Se mantuvieron bajo condiciones estándar, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, a 25°C de temperatura controlada, con comida y agua *ad libitum*. Luego de 10 o 18 días post-inoculación se sacrificaron por sobredosis de anestesia (isoflurano, por vía inhalatoria) y se procedió a la toma de muestras de sangre y órganos para qPCR, mantenidas a -20°C hasta el momento de uso.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la “Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación” (*Guide for the Care and Use of Experimental Animals*) del *National Institutes of Health* (EEUU.).

#### 3.6. Análisis bioinformáticos

Se estimó el peso molecular y punto isoeléctrico de la proteína TcTryS mediante la herramienta *Computepl/Mw* de la plataforma *Expasy* (<https://web.expasy.org/>) del Instituto Suizo de Bioinformática (*Swiss Institute of Bioinformatics*). Se utilizó el algoritmo *DogSiteScorer* [144], disponible en <https://proteins.plus/#dogsite>, para la identificación de bolsillos accesibles a drogas, sobre la estructura de la proteína LmTryS (2VOB), tomada de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB, <http://www.rcsb.org/>). El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de TryS de diferentes organismos, se realizó por medio de la herramienta *Kalig 2.0 multiple sequence alignment* disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/>, plataforma del Instituto Europeo de Bioinformática (*European Bioinformatics Institute*).

### 3. Materiales y métodos

Se identificaron los péptidos potencialmente inmunogénicos de TryS, a partir del análisis de la secuencia primaria de la proteína con el algoritmo Kolaskar & Tongaonkar [149] disponible en la plataforma *ExpPASy* del *Swiss Institute of Bioinformatics* (Lausanne, Suiza), seleccionándose un péptido N-terminal (LQSLAVPFGCVQGY) con una alta antigenicidad. Este método se basa en el análisis semi-empírico de las secuencias e identifica residuos hidrofóbicos (Cys, Leu, Val), que de acuerdo a datos experimentales demostraron ser determinantes antigénicos cuando son presentados en la superficie proteica.

#### 3.7. Análisis estadístico

Todos los datos recabados fueron analizados con el paquete estadístico del programa *GraphPad Prism 5*. En todos los casos, se realizaron al menos dos experimentos independientes, realizados en diferentes días, con tres réplicas por muestra y se expresaron los resultados como media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Se utilizó el test de *student*, análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y test de Tukey para las comparaciones múltiples. Los valores  $p < 0.05$ , fueron considerados significativos en todos los casos. Para la determinación de las concentraciones requeridas para inhibir el crecimiento al 50% de los epimastigotes, u obtener un 50% de mortalidad en los tripomastigotes ( $IC_{50}$ ), se analizaron los datos mediante regresión sigmoideal con el modelo de inhibición dosis-respuesta (*dose-response – inhibition model*), se graficaron los valores de  $IC_{50}$  como media con un intervalo de confianza del 95%.



## **4. RESULTADOS**

### 4.1. Desarrollo del sistema de trabajo

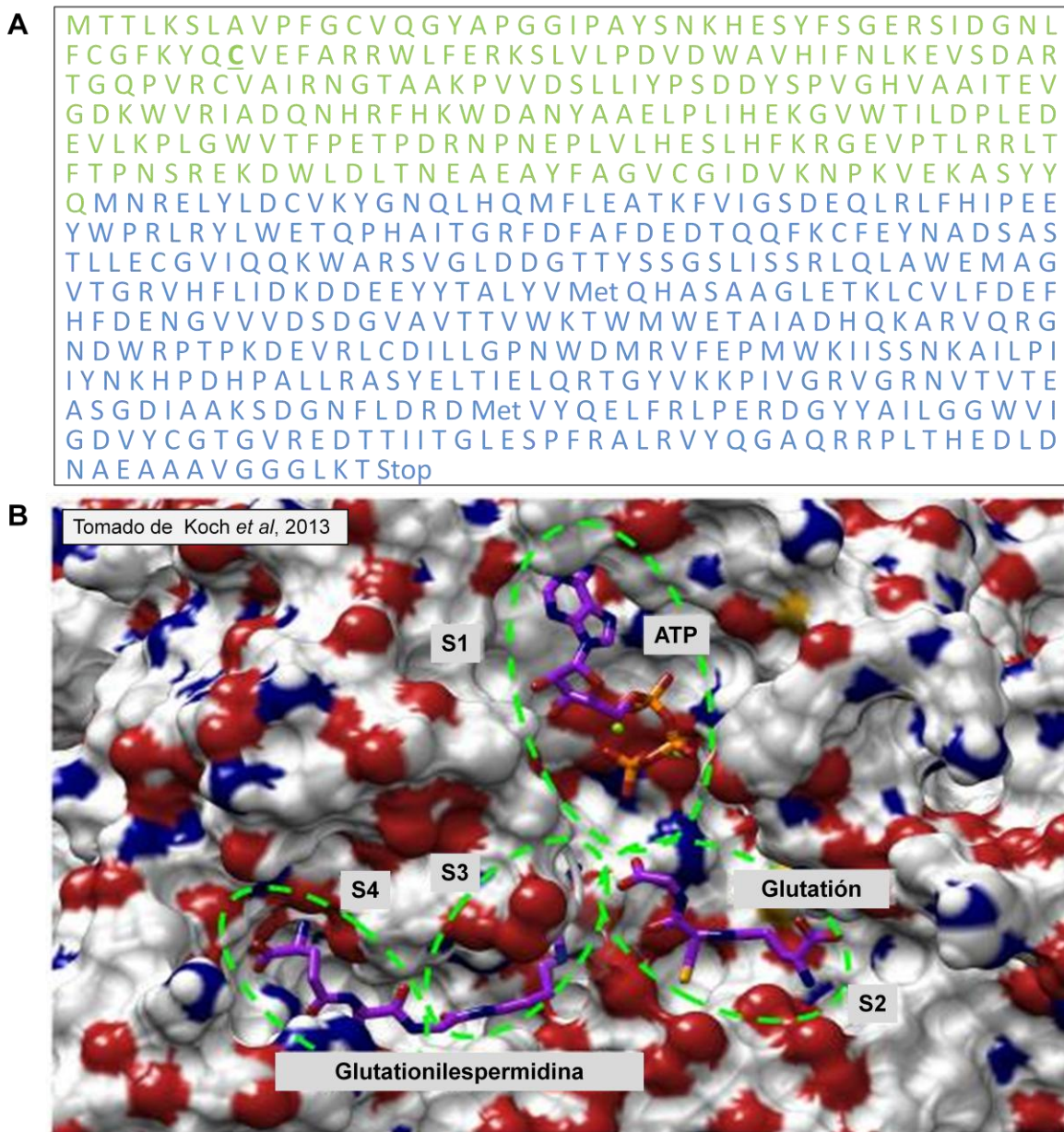
TryS, tal como se describió en la introducción de este trabajo, es una enzima ya caracterizada en cuanto a sus características cinéticas y moleculares principalmente a partir del trabajo en organismos como *Crithidia fasciculata* y *Leishmania* [126,128,141–143]. Asimismo, algunas de sus funciones en la biología de otros tripanosomátidos como *T. brucei*, han sido descritas [118,119,125]. Es posible que debido a las limitaciones técnicas que tiene la manipulación genética de *T. cruzi*, el conocimiento acerca de sus funciones, más allá de la biosíntesis de T[SH]<sub>2</sub>, en este sistema resulte aún más limitado. Para el estudio funcional de TryS en el contexto de este patógeno, se propusieron una serie de estrategias que se describirán a continuación, abarcando un análisis bioinformático preliminar, la generación de un anticuerpo específico y la sobre-expresión entre los principales elementos del plan de trabajo utilizado. Este sistema a su vez, se completó con la utilización de inhibidores específicos de TryS desarrollados originalmente para *T. brucei* [139], gentilmente cedidos por el Dr. Comini (Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay), el Dr. Conrad Kunick y el Dr. Oliver Orban (Technische Universität Braunschweig, Alemania).

#### 4.1.1. Análisis bioinformático de la enzima TryS de *T. cruzi*

El estudio de la enzima TryS de *Trypanosoma cruzi* (TcTryS) comenzó con un análisis preliminar de la secuencia completa del gen obtenida de la base de datos *GenBank* (AF311782.1). Este análisis mediante herramientas bioinformáticas y datos bibliográficos, resultó necesario para el diseño posterior de las herramientas de sobre-expresión y la generación del anticuerpo anti-TryS. La secuencia AF311782.1 pertenece a la cepa Sylvio X10/c7, correspondiente a la DTU TcI de *T. cruzi*, e

incluye las regiones no codificantes 5'UTR y 3'UTR, de 969 y 193 pb de longitud, respectivamente. La traducción de la región codificante (Fig. 8A) se correspondió con una secuencia aminoacídica de 648 residuos, con un peso molecular estimado de 73,56 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 5.39. De esta secuencia primaria, se pudo identificar el dominio amidasa (Fig. 8A, en verde) hacía el extremo N-terminal de la proteína y el dominio sintetasa en la región C-Terminal (Fig. 8A, en azul). A partir de resultados obtenidos en otros organismos ([141] para *L. major* y [143] para *C. fasciculata*), y la homología que conservan las secuencias de TryS dentro de los tripanosomátidos, se pudo predecir que la Cys-51 correspondería a la cisteína catalítica requerida para la función amidasa. Mientras que la funcionalidad del dominio sintetasa, depende de una serie de sitios conservados para la unión al fosfato del ATP y a iones  $Mg^{2+}$  que estabilizan esta interacción, además de los sitios de unión a los sustratos Spd y GSH [142]. De acuerdo a las simulaciones moleculares realizadas para la enzima *LmTryS* (TryS de *Leishmania major*), el ATP se uniría al bolsillo S1, el GSH al S2 y la Spd al bolsillo S3 (Fig. 8B, tomada de [142]). Luego de la primera reacción de estos sustratos para producir el Gsp, mediante la unión de los bolsillos S2 y S3, se incorporaría una segunda molécula de ATP y GSH, dando lugar la síntesis del T[SH]<sub>2</sub>.

Por tratarse de un potencial blanco para el desarrollo de nuevas drogas [47,125], se realizó un análisis *in silico* de la susceptibilidad de TryS de ser inhibida farmacológicamente. Recientemente se han desarrollado inhibidores para esta enzima [139], demostrando que es factible su inhibición. Sin embargo, el análisis realizado mediante herramientas de bioinformática, podría permitir una aproximación a la identificación de sitios alternativos para el diseño de nuevas drogas más adecuadas en un futuro. Para este análisis se recurrió a la herramienta *DoGSigeScorer* [144], que requiere como entrada la estructura tridimensional de la proteína en estudio determinada, en este caso, mediante cristalografía de rayos X. A partir de esta información, esta herramienta es capaz de identificar bolsillos y sub-bolsillos mediante un filtro que busca espacios favorables para la ubicación de un objeto esférico.



**Figura 8: Estructura primaria de la enzima TryS de *T. cruzi***

**A.** La secuencia aminoacídica de la proteína TryS de la cepa Sylvio X10 puede ser dividida en dos dominios funcionales: sintetasa (azul) y amidasa (verde). El residuo Cys-51 (en negrita, subrayado) correspondería con la cisteína catalítica altamente conservada para la actividad amidasa. **B.** Mediante simulación molecular, Koch y colaboradores obtuvieron la estructura de los bolsillos de unión a ATP (S1), a GSH (S2) y al producto intermedio N<sup>8</sup>-glutathionilespermidina (Gsp, S3 y S4) para la enzima TryS de *Leishmania major*, altamente conservados para la funcionalidad de la enzima (Tomado de [142]).

Como siguiente paso analiza las propiedades geométricas y físicoquímicas de cada bolsillo identificado para finalmente asignar un valor de 0 a 1 en base a la consideración del volumen, la hidrofobicidad y la accesibilidad de cada uno. En particular, el volumen de estos espacios no debe ser muy grande ya que esto dificultaría el diseño de una molécula pequeña con alta afinidad por este sitio [50].

La herramienta *DogSiteScorer* fue evaluada a partir de estructuras conocidas y arrojó predicciones acertadas en un 88% de los casos [144]. A los fines del análisis realizado en esta Tesis, se utilizó la estructura tridimensional de la enzima TryS de *L. major* obtenida de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB, 2VOB, <https://www.rcsb.org/>, Fig. 9B), ya que hasta el momento no se dispone del análisis cristalográfico de su contraparte en *T. cruzi*. Es importante resaltar la necesidad de obtener la estructura tridimensional de *TcTryS* en vistas al diseño y modificación racional de drogas específicas, dado que la identidad entre las secuencias aminoacídicas de *T. cruzi* y *L. donovani* es de un ~60%. La identidad de las secuencias de TryS dentro de los *TriTryps* es de un 71.6% entre *T. cruzi* y *T. brucei*, y de un 64.7% entre *T. brucei* y *L. infantum* [140]. Los alineamientos entre las proteínas de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* y *L. donovani* se presenta en la Fig. 10.

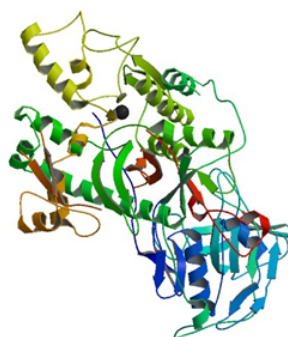
El análisis de la presencia de bolsillos en donde una molécula inhibidora pueda interactuar arrojó valores positivos para 16 de 43 bolsillos hallados (37%), con un valor máximo de 0.6 (Fig. 9A). Este porcentaje de bolsillos susceptibles resulta bajo respecto de lo observado para las otras enzimas susceptibles a drogas, como es el caso de las enzimas tipo quinasa de humanos que son objeto de estudio de muchos proyectos de desarrollo de fármacos [145–147]. Para estas enzimas se observó que un ~75% de los bolsillos presentan valores  $\geq 0.5$  [148]. Los resultados obtenidos para TryS podrían indicar que no sería una proteína que pueda ser fácilmente inhibida, al menos de acuerdo con este análisis predictivo. Sin embargo, la capacidad de esta enzima de unirse a una variedad de poliaminas (espermidina, espermina, N<sup>8</sup>-acetilespermidine y N-acetilespermina) y la obtención de paulonas inhibidoras [139], sugieren la existencia de una variedad de bolsillos susceptibles.

A

Bolsillo (P)	Volumen (Å <sup>3</sup> )	Superficie (Å <sup>2</sup> )	Superficie lipofílica (Å <sup>2</sup> )	Profundidad (Å <sub>z</sub> )	Valoración
P0	1157.59	1271.06	809.74	32.52	0.59
P1	1006.81	1185.63	684.97	23.94	0.60
P2	977.39	1258.21	726.09	27.57	0.59
P3	889.40	1073.74	611.19	23.70	0.56
P4	668.23	862.33	553.02	15.24	0.46
P5	574.98	649.52	383.43	15.11	0.33
P6	483.84	529.02	222.14	14.56	0.20
P7	437.08	571.50	325.68	12.15	0.24
P8	431.83	462.45	230.55	14.79	0.16
P9	378.24	492.20	289.18	18.63	0.18
P10	359.33	470.86	252.96	16.81	0.16
P11	358.54	400.96	254.37	14.35	0.16
P12	314.94	555.76	380.54	10.83	0.23
P13	309.43	542.61	352.53	15.28	0.16
P14	251.11	341.95	228.99	8.42	0.07
P15	240.34	413.66	316.14	11.91	0.14
P16	202.26	317.12	179.85	9.98	0.00
P17	199.10	259.04	147.08	14.35	0.00
P18	191.75	252.50	117.69	8.62	0.00
P19	178.62	496.15	248.19	9.86	0.00
P20	169.95	266.59	143.67	8.15	0.00

P21	168.37	302.23	206.26	7.76	0.05
P22	163.12	225.24	160.54	7.41	0.08
P23	161.02	177.11	68.95	8.64	0.00
P24	150.77	98.61	75.04	14.23	0.00
P25	150.51	151.03	103.27	11.60	0.00
P26	148.41	346.83	191.06	8.25	0.00
P27	148.15	318.90	201.23	8.35	0.00
P28	145.78	239.67	169.99	9.46	0.00
P29	137.38	162.53	69.29	7.47	0.00
P30	134.49	281.36	179.69	6.84	0.00
P31	134.22	144.21	55.53	7.60	0.00
P32	133.44	193.19	79.59	8.30	0.00
P33	131.33	95.54	80.87	10.04	0.00
P34	126.87	273.32	176.96	7.97	0.00
P35	126.34	110.37	93.08	12.73	0.00
P36	115.84	281.44	193.88	7.16	0.00
P37	114.00	249.77	136.24	6.53	0.00
P38	112.42	182.80	111.35	7.41	0.00
P39	111.11	165.79	70.44	6.59	0.00
P40	107.69	222.22	160.21	6.84	0.00
P41	104.02	76.62	53.28	10.04	0.00
P42	102.44	170.12	130.23	11.06	0.00
P43	101.65	57.72	19.78	10.11	0.00

B



**Figura 9: Bolsillos accesibles a drogas de acuerdo a la estructura de *LmTryS***

**A.** Para cada bolsillo (P1 a P43), el algoritmo *DogSiteScorer* estimó su volumen, superficie, superficie lipofílica y profundidad para arrojar una valoración o puntaje final de 0 a 1 como máximo para la probabilidad de que una molécula pueda interferir en dicho sitio. **B.** Estructura tridimensional predicha para la enzima *LmTryS* tomada de la base de datos PDB.



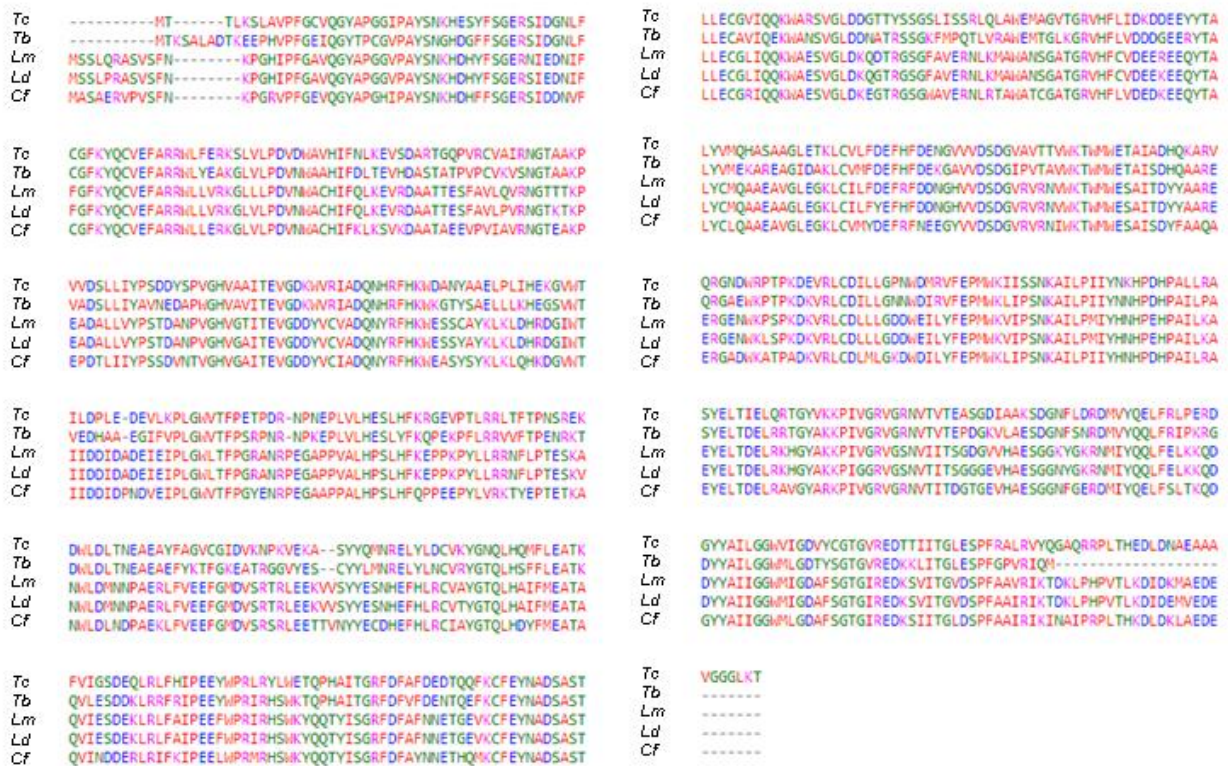


Figura 10: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de TryS de diferentes especies de tripanosomátidos

Alineamientos realizados a partir de las secuencias aminoacídicas de TryS de (de arriba hacia abajo) *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* y *L. donovani*. Se incorporó también la secuencia correspondiente a *C. fasciculata*, organismo no patogénico, utilizado como modelo para el estudio de estos organismos. Para el alineamiento, se utilizó el algoritmo *CLUSTAL multiple sequence alignment* (Kalign 2.0), disponible en la plataforma *ExpasyWeb* del Instituto Suizo de Bioinformática (Swiss Institute of Bioinformatics).

### 4.1.2. Generación de anticuerpos anti-TryS

Para la obtención de un anticuerpo específico anti-TryS, se analizó primeramente la secuencia de la proteína con el algoritmo predictivo *Kolaskar and Tongaonkar Antigenicity* [149], a fin de seleccionar un péptido capaz de actuar como un potencial inmunógeno óptimo. Para este análisis, se recurrió a la herramienta *Predicting Antigenic Peptides*, disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/> (ver M&M). A partir de los datos obtenidos se seleccionó un péptido de 14 aminoácidos (Tabla 3, resaltado en gris), de la porción N-terminal de la proteína TryS (TryS N-Ter).

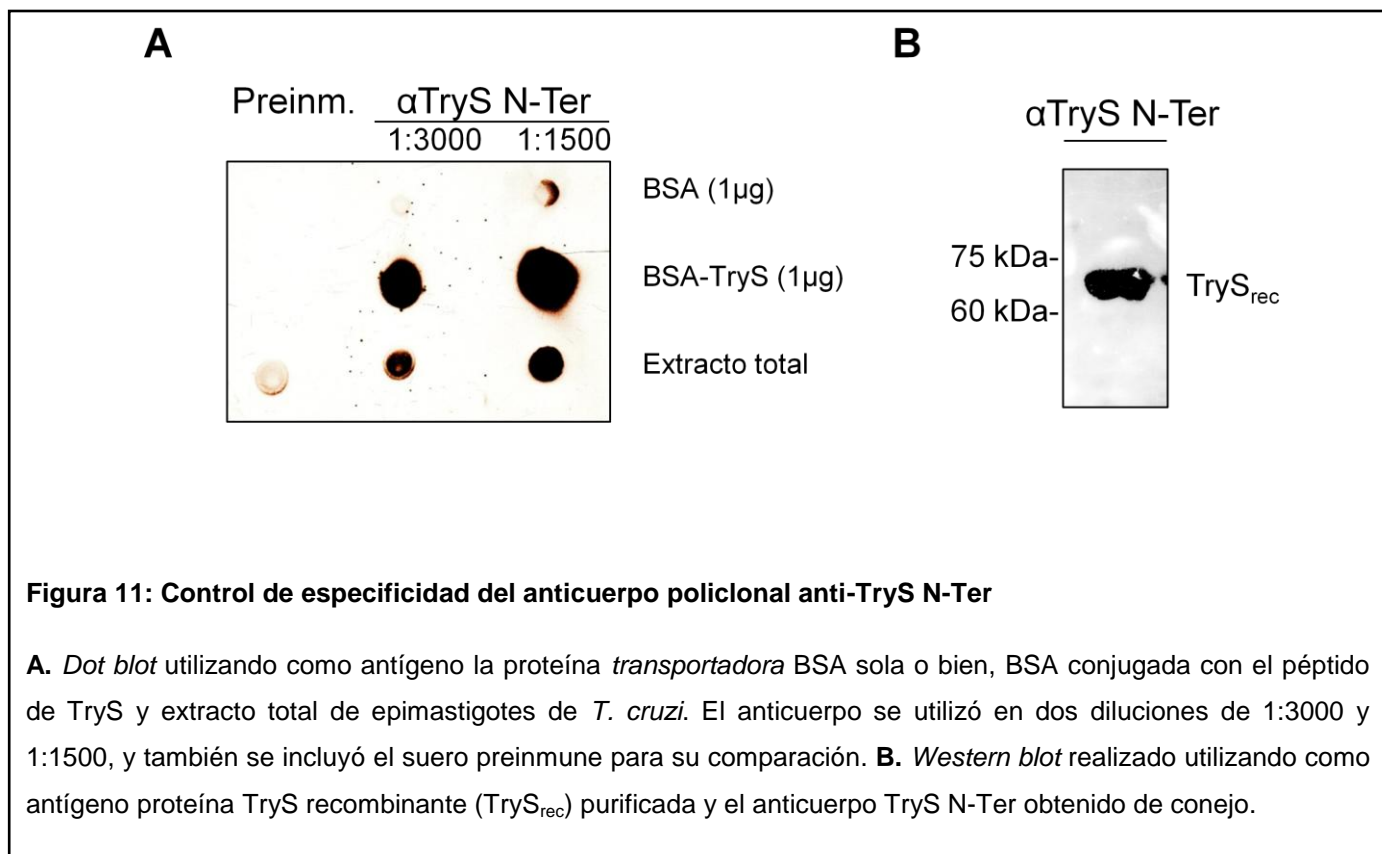
El péptido LQSLAVPFGCVQGY fue sintetizado por el servicio de *Genscript* (New Jersey, EEUU.) y conjugado a albúmina sérica bovina (BSA), como proteína *transportadora (carrier)*, mediante su reacción con glutaraldehído [150]. Para obtener una respuesta inmune exitosa, el inmunógeno debe ser detectado por linfocitos T. Los péptidos antigénicos identificados pueden contener epítopes para células B, pero no ser capaces de reaccionar con células T. A través de esta estrategia, de combinar el péptido a una proteína mayor, que posee epítopes para células T, fue posible inducir una respuesta adecuada por el inmunógeno (péptido acoplado al *transportador*). Típicamente, las proteínas BSA y ovoalbúmina (OVA) suelen utilizarse con este fin debido a su buena solubilidad y bajo costo. El glutaraldehído por su parte, es utilizado como un *crosslinker* homobifuncional que permite la conjugación a través de los grupos amino, resultando apropiado para la reacción de péptidos que no contienen grupos reactivos.



No.	Posición de inicio	Posición de final	Péptido	Largo (aa)
1	4	17	LQSLAVPFGCVQGY	14
2	19	26	PGGIPAYS	8
3	41	55	GNLFCGFKYQCVEFA	15
4	62	82	RKSLVLPDVEWAVHIFNLKEV	21
5	90	97	NVRCVAIR	8
6	102	128	AKPVADSLLIYPSDDYSPVGHVAAITE	27
7	151	160	AAELPLIHEK	10
8	163	168	WTILDP	6
9	170	183	EDEVLRPLGWVTFP	14
10	192	202	EPLVLHESLHF	11
11	207	213	VPTLRRL	7
12	233	246	AYFASVCGIDVKNP	14
13	249	254	EKASY	6
14	260	265	LYLDCT	6
15	278	286	ATKFVIGSD	9
16	288	295	QLRVFRIP	8
17	327	333	QFKCFEY	7
18	338	349	ASTLLECGVIQQ	12
19	352	358	ARSVGLD	7
20	362	376	TYSCGSLISSRLQLA	15
21	383	391	TGRVHFLID	9
22	398	411	YTALYVMQHASAAG	14
23	413	422	ETKLCVLFDE	10
24	428	442	NGVVVDSGDGVAVTTV	15
25	473	482	EVRLCDILLG	10
26	498	511	PSNKAILPIIYNKH	14
27	513	529	DHPALLRASYELTVELQ	17
28	531	550	TGYVKKPIVGRVGRNVTVTE	20
29	570	576	YQELFRL	7
30	582	589	YYAILGGW	8
31	591	599	IGDVYCGTG	9
32	607	622	ITGLESPFIALRVYQG	16

**Tabla 3: Identificación de péptidos inmunogénicos de acuerdo al algoritmo *Kolaskar and Tongaonkar***

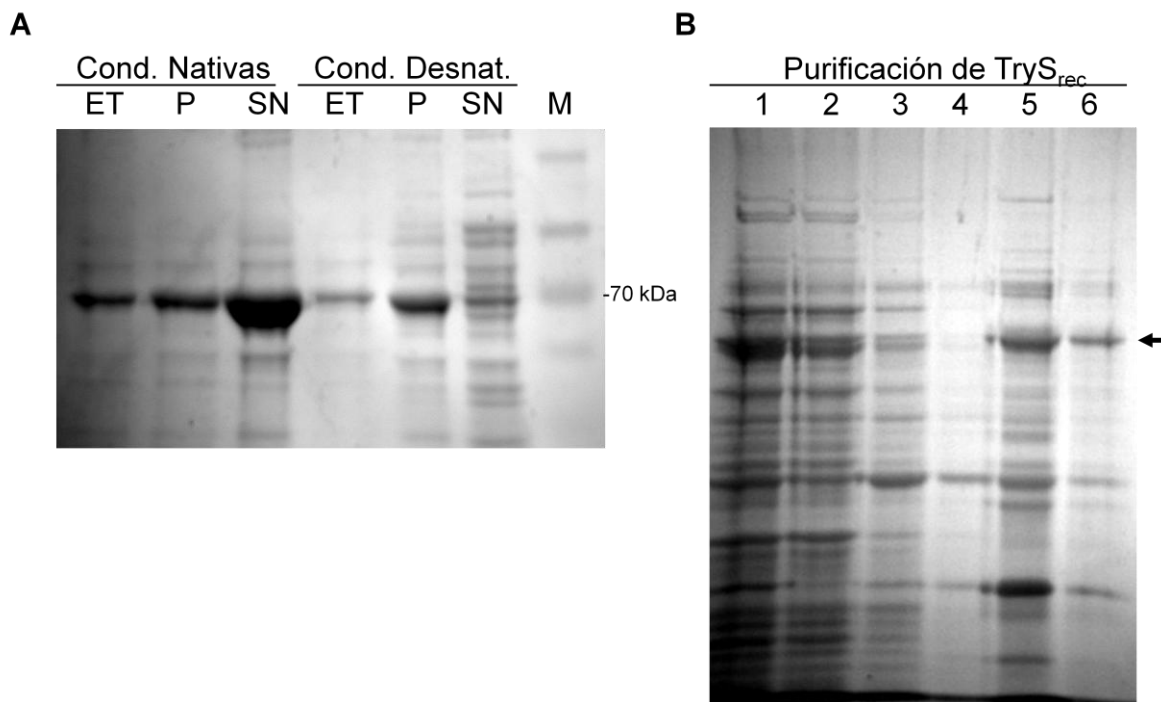
La secuencia aminoacídica de la proteína TryS se analizó mediante el algoritmo *Kolaskar and Tongaonkar Antigenicity*. Se obtuvieron así una serie de péptidos de largo variable, y potencial capacidad antigénica. Se presentan en esta tabla solo los primeros resultados obtenidos de un total de más de 70 péptidos candidatos, identificando su posición y largo (en aminoácidos, aa).



El inmunógeno obtenido a partir de la conjugación del péptido de la región N-terminal de TryS con BSA, se emulsionó con adyuvante de Freund e inoculó en conejo (ver M&M). Luego de tres inoculaciones, con un intervalo de 15 y 21 días entre ellas, respectivamente, se extrajo sangre vía intracardíaca para la obtención del suero final. El anti-suero obtenido ( $\alpha$ TryS N-Ter) se controló mediante *Dot Blot* utilizando como antígenos BSA, BSA conjugada al péptido TryS N-Ter y un extracto total de epimastigotes (Fig. 11A). Por medio de este análisis rápido, se pudo observar que el anticuerpo obtenido presentó una baja afinidad por la proteína BSA, pero fue capaz de detectarla fusionada al péptido antigénico y de reconocer al antígeno en el homogenado total. Como era esperado, el suero preinmune no presentó afinidad por BSA o BSA conjugada al péptido y solo un leve reconocimiento sobre el extracto total de epimastigotes *wild type* (Fig. 11A). Sin embargo, a partir de este ensayo no pudieron descartarse reacciones inespecíficas, sobre otras proteínas presentes en el

homogenado de parásitos. Luego, se evaluó la capacidad del anticuerpo  $\alpha$ TryS N-Ter de reconocer específicamente a la proteína TryS mediante *Western blot*. Para esto se realizó una corrida electroforética mediante el método de *SDS Page* de la proteína TryS recombinante purificada a partir de un cultivo bacteriano (TryS<sub>rec</sub>, descripta a continuación). Mediante estos ensayos, se verificó la capacidad del anticuerpo policlonal producido de detectar al péptido antigénico y a la proteína TryS en forma específica.

Por otro lado, en una segunda etapa se generó un anticuerpo utilizando la proteína completa TryS<sub>rec</sub> como antígeno. Para esto, se inocularon tres ratones para contar así con un suero desarrollado en una especie diferente. Muy brevemente, para ello se amplificó el gen *Tctrys* a partir de ADN genómico de la cepa Sylvio X10/c4 de *T. cruzi* y se lo clonó en el plásmido de expresión prSET-A (ver M&M). Luego de evaluar su correcta inserción, a través de su digestión con enzimas de restricción y secuenciación, se transformaron bacterias *E. coli* BL21(DE3) para proceder a la purificación de la proteína *full length* recombinante TryS<sub>rec</sub>. La proteína expresada, resultó ser soluble y accesible de ser purificada en condiciones nativas (Fig. 12A), mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). Las fracciones obtenidas en los pasos de lavado y elusión se visualizaron a través de *SDS PAGE* (Fig. 12B). Luego de la obtención de tres sueros policlonales  $\alpha$ TryS *full length* de ratón, éstos se controlaron mediante *Dot blot* y *Western blot* del mismo modo descripto para el anticuerpo de conejo. Debido a que la afinidad del anticuerpo obtenido en conejo resultó mayor, el anticuerpo  $\alpha$ TryS N-Ter fue el utilizado en todos los ensayos subsiguientes.



**Figura 12: Expresión y purificación de TryS recombinante a partir de *E. coli* BL21(DE3)**

**A.** *SDS Page* donde se visualizan las fracciones obtenidas en la solubilización de la proteína TryS en condiciones nativas y desnaturizantes: extracto total (ET), *pellet* (P) y sobrenadante (SN). **B.** *SDS Page* con las fracciones obtenidas a partir de la purificación de TryS realizada en condiciones nativas mediante columna de afinidad. Se observa el extracto total inicial (1), percolado (2), eluidos correspondientes al primer y segundo lavado (3 y 4), y finalmente un primer y segundo eluido de TryS (5 y 6), este último con menor presencia de proteínas inespecíficas.

#### 4.1.3. Generación y control de parásitos sobre-expresantes de TryS

Para el estudio de TryS, la propuesta inicial fue generar una batería de parásitos con diferentes niveles de expresión de la enzima: *knock outs* (KO) o *hemi-knock outs* (hKO) y sobre-expresantes. Para la generación de parásitos hKO/KO, se ensayaron dos técnicas, el sistema comercial *Gateway* y

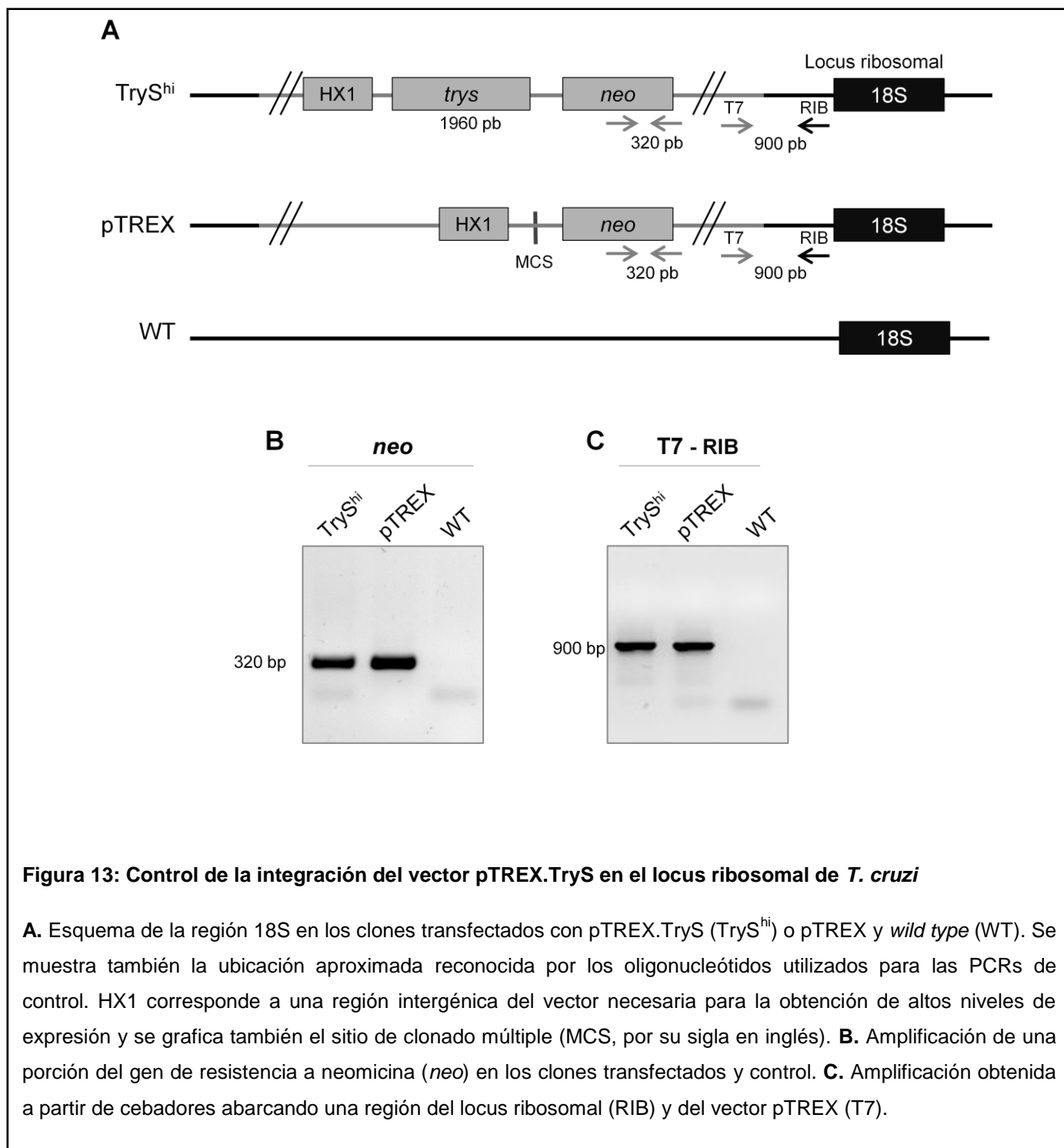
la generación de construcciones mediante técnicas de clonado convencional. En ambos casos, se generaron construcciones que incluían la secuencia codificante de la resistencia a un antibiótico (higromicina o blastomicina), flanqueada por fragmentos de las regiones 5' y 3'UTR de *Tctrys*. De esta manera, se produciría el reemplazo alélico mediante recombinación homóloga y posterior selección de los parásitos recombinantes en presencia del respectivo antibiótico. Sin embargo, luego de controlar las construcciones obtenidas (a través de su secuenciación automática) y realizar sendas transfecciones con estos productos, no se logró obtener poblaciones estables resistentes a los agentes de selección empleados. Este resultado no es sorprendente si se tiene en cuenta las dificultades que presenta la obtención de parásitos KO en *T. cruzi*, y la posibilidad de que *trys* por ser un gen presuntamente esencial de vital importancia para el patógeno, no permita el reemplazo alélico de ninguna de sus copias. En este sentido, tenemos conocimiento de las experiencias de otros grupos de investigación, que también sin éxito, intentaron este abordaje en *T. cruzi* CL Brener y *T. brucei*, poniendo de manifiesto la dificultades que tiene la delección parcial o total de este gen en estos organismos.

En cambio, sí pudieron obtenerse parásitos sobre-expresantes mediante su transfección con el vector de integración pTREX [151]. Esta herramienta molecular permite una expresión estable mediante su inserción en el locus ribosomal, específicamente en una región de 86 pb, ubicada 120 pb río abajo (*downstream*) del sitio de inicio de la transcripción del promotor ribosomal [152]. A diferencia del vector pRIBOTEX, este incluye un fragmento de la región HX1 del gen *Tcp2β* ubicada después del promotor ribosomal. Y esta secuencia de 220 pb contiene una señal de *trans-splicing* que permite obtener altos niveles de expresión [151].

Para generar la construcción pTREX.TryS, se amplificó la secuencia codificante del gen *trys* a partir de ADN genómico de la línea Sylvio X10/c4 *wild type* (ver M&M). Tanto el vector como el producto de PCR, fueron luego digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Sall* para el clonado en marco y direccionado. La construcción obtenida (pTREX.TryS, ver ANEXO C) fue chequeada

mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación automática. Luego de estos controles, se transfectaron parásitos correspondientes a la cepa virulenta Sylvio X10/c4 y se seleccionaron los parásitos transfectantes mediante su incubación con G418 (geneticina, 300 µg/ml) durante al menos 30 días. Los parásitos obtenidos, se clonaron a continuación mediante su siembra en medio Usmaru sólido suplementado con G418 (ver M&M) durante otros 30 días para la obtención de colonias.

Los parásitos sobre-expresantes para la enzima TryS (denominados TryS<sup>hi</sup>, TryS *high*) fueron controlados a nivel del ADN, de expresión proteica y de actividad enzimática. Para su control a nivel genómico, se verificó la integración del vector en el locus ribosomal [152] y la presencia del gen de resistencia a neomicina (*neo*) (Fig. 13). La presencia de la banda correspondiente a la amplificación del marcador de resistencia a neomicina, indica la presencia del ADN plasmídico integrado en el ADN genómico, ya que el ADN foráneo es degradado dentro de las 48 h luego de realizada la transfección por la maquinaria del parásito [152] (Fig. 13B). Luego, se realizó la amplificación mediante los oligonucleótidos T7 y RIB (ver ANEXO B), éste último complementario a una secuencia específica de la región 18S del ADN ribosomal. De esta manera, la amplificación de esta banda en los parásitos transfectantes y su ausencia en los parásitos *wild type* (WT) demostró la correcta integración del ADN recombinante en el locus ribosomal en los parásitos transfectados con la construcción pTREX.TryS o bien el vector vacío (pTREX) (Fig. 13C).



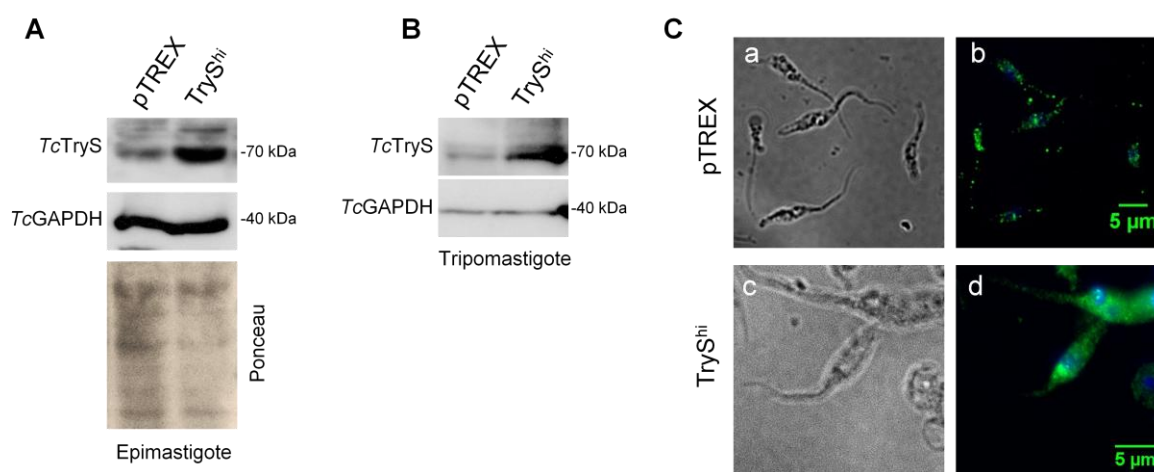
Por otro lado, la expresión de la enzima TryS en los parásitos transfectados y clonados fue evaluada mediante *Western blot* e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para ambas técnicas se utilizó el anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, cuya descripción se realizó en el apartado anterior. Los resultados de *Western blot*, revelaron un incremento en el nivel de expresión de la proteína TryS de >4 y >2.5 veces para los estadios de epimastigote y tripomastigote, respectivamente, al comparar los parásitos transfectados con pTREX.TryS respecto de los transfectados con el vector vacío (mencionados sólo como pTREX en adelante) (Fig. 14A&B). Estos resultados se normalizaron de acuerdo a los niveles de expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína *housekeeping* utilizada como control de carga proteica.

A continuación, se realizó un análisis de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en los epimastigotes. Para esto, los parásitos fueron marcados con el suero anti-TryS de conejo y un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo *Alexa-488* (verde), junto con tinción de DAPI (azul) para la visualización del ADN. Mediante la técnica de IFI se observó un aumento de la expresión de TryS en los epimastigotes TryS<sup>hi</sup> y una distribución consistente con la localización sub-celular citoplasmática descrita para esta enzima, presentando un patrón de agrupamiento en múltiples *foci* (Fig. 14C, b&d). En conjunto, las Figuras 13 y 14 evidencian el correcto funcionamiento del sistema de sobre-expresión, verificado a nivel del ADN y expresión.

A continuación, se analizó la funcionalidad de la enzima TryS sobre-expresada. Para esto, se cuantificó la actividad enzimática específica (AEE, Fig. 15A) así como también, se realizaron determinaciones de la cantidad intracelular de T[SH]<sub>2</sub> total sobre extractos totales de epimastigotes y tripomastigotes derivados de cultivo celular (Fig. 15B). De esta forma, se evaluó el sistema de sobre-expresión y funcionalidad de la enzima recombinante tanto en un estadio replicativo, como en uno infectivo, no replicativo del parásito. Para la determinación de la AEE de TryS se utilizó una técnica que cuantifica la liberación de fosfato inorgánico proveniente del ATP, a tiempo final mediante la formación de un complejo con verde de malaquita ([153], ver M&M). Asimismo se determinó el

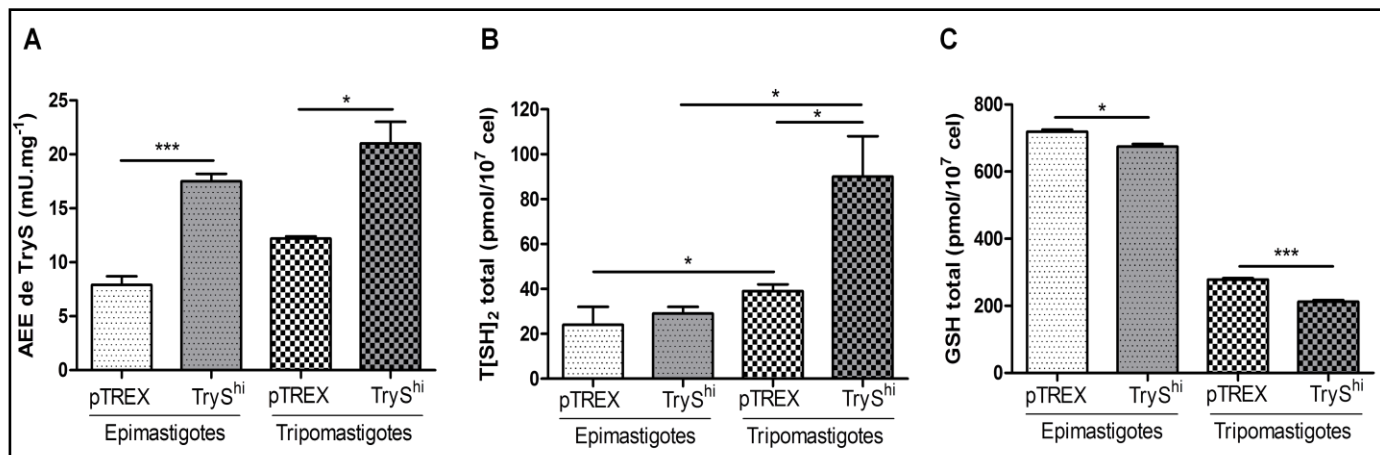


contenido de GSH total, un sustrato requerido para la síntesis de T[SH]<sub>2</sub> (Fig. 15C). Para esto se utilizó un protocolo que cuantifica el reciclado enzimático de GSH en su forma oxidada y es catalizado por la proteína glutatión reductasa recombinante a partir de los equivalentes de reducción del NADPH. La cinética del reciclado del GSH de cada muestra, se observó mediante espectrofotometría, para finalmente estimar la concentración de GSH, mediante su comparación contra una curva de calibración [154].



**Figura 14: Sobre-expresión de la enzima TryS en los parásitos transfectantes TryS<sup>hi</sup>**

Se presenta un *Western blot* representativo de los niveles de expresión de TcTryS y TcGAPDH en poblaciones clonales de epimastigotes (**A**) y tripomastigotes derivados de cultivo (**B**), TryS<sup>hi</sup> y pTREX (transfectados con el vector vacío). La detección de GAPDH, se utilizó como control de carga proteica. Se muestra asimismo en el primer panel una imagen de la membrana teñida con colorante de *Ponceau*, reflejando la cantidad de proteína de cada calle. **C**. Se muestran imágenes de inmunofluorescencia indirecta de TryS, realizada sobre epimastigotes transfectados con pTREX (**a&b**) y pTREX.TryS (**c&d**), de campo claro (**a&c**) y fluorescencia (**b&d**).



**Figura 15: Caracterización bioquímica de la enzima TryS en poblaciones de parásitos TryS<sup>hi</sup> y pTRES**

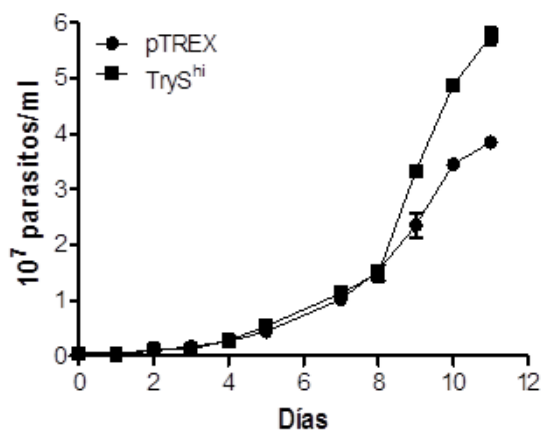
**A.** Las barras corresponden a los valores de media  $\pm$  SEM de la actividad enzimática específica (AEE) de TryS determinada sobre extractos totales de epimastigotes y tripomastigotes clonales de TryS<sup>hi</sup> y pTRES. **B.** Contenido total de T[SH]<sub>2</sub>, determinado mediante un método reciclado enzimático para TryS<sup>hi</sup> y el control pTRES. **C.** Contenido de GSH total determinado sobre poblaciones de epimastigotes y tripomastigotes, pTRES y TryS<sup>hi</sup>. Los resultados corresponden a  $\geq 2$  experimentos independientes con tres determinaciones por experimento (\* y \*\*\* corresponde a  $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente).

A través de estas determinaciones se observó i) una mayor actividad enzimática en parásitos TryS<sup>hi</sup> respecto de los controles pTRES, tanto en epimastigotes como en tripomastigotes, 2 y 1.7 veces mayor, en cada caso (Fig. 15A). ii) A su vez, se observó que los niveles de actividad fueron mayores en el estadio infeccioso de tripomastigote respecto del estadio replicativo de epimastigote. Esto se encuentra en correlación con el mayor nivel de expresión observado para este estadio mediante *Western blot* (Fig. 14B) y con lo descrito en trabajos previos [155]. iii) Respecto del contenido de T[SH]<sub>2</sub>, no se observaron diferencias significativas en los extractos de epimastigotes. Sin embargo, este metabolito se encontró incrementado 2.3 veces en tripomastigotes TryS<sup>hi</sup> respecto de los pTRES (Fig. 15B,  $p < 0.05$ ). iv) El contenido de GSH, resultó ser mayor en epimastigotes respecto de lo observado en tripomastigotes para ambos clones, TryS<sup>hi</sup> y pTRES (Fig. 15C). Mientras que se observó

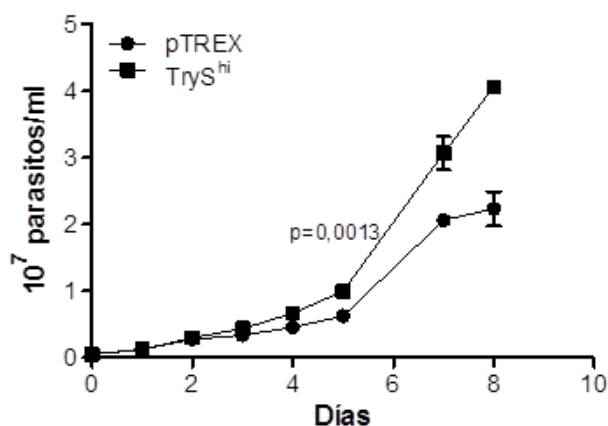
un patrón inverso al obtenido para T[SH]<sub>2</sub>, ya que el contenido de GSH en tripomastigotes TryS<sup>hi</sup> fue un ~24% menor que el estimado para pTREX, sugiriendo un mayor consumo de este monotiol para la síntesis de T[SH]<sub>2</sub> en esta fase parasitaria. En conjunto, estos resultados demuestran que los parásitos transfectados con la construcción pTREX.TryS, expresaron una enzima funcionalmente activa, tanto en epimastigotes como en tripomastigotes derivados de cultivo celular.

### 4.2. Mayores niveles de expresión de TryS favorecen la proliferación de epimastigotes y la metaciclogénesis

Como se describió en la introducción, en *T. brucei* se observó que el T[SH]<sub>2</sub> reducido, provee de equivalentes de reducción para sostener la actividad de la ribonucleótido reductasa, la enzima responsable de la síntesis de los desoxirribonucleótidos necesarios para la replicación y mecanismos de reparación del ADN [95]. Teniendo en cuenta este antecedente, se planteó evaluar el efecto de una alta expresión de TryS sobre la proliferación de *T. cruzi*. Para ello, se realizaron curvas de crecimiento a partir de poblaciones clonales, previamente sincronizadas de epimastigotes TryS<sup>hi</sup> y pTREX, en medio LIT completo, mediante el recuento de los parásitos en cámara de Neubauer en microscopio óptico. Los epimastigotes TryS<sup>hi</sup> mostraron un aumento significativo en la replicación respecto de lo observado para los epimastigotes pTREX (constantes de crecimiento  $k$  de 0.39 y 0.33 1/día, respectivamente,  $p < 0.05$ ). El tiempo de duplicación para los primeros fue de 1.77 días, mientras que para el grupo control fue de 2.05 días (Fig. 16A&B). Esta diferencia fue particularmente evidente durante la fase exponencial tardía en la curva de crecimiento. Estos experimentos se realizaron también con poblaciones transfectantes no clonales, obteniéndose tiempos de duplicación de 1.58 y 1.83 días, para TryS<sup>hi</sup> y pTREX respectivamente (Fig. 16C&D) y una mayor constante de crecimiento  $k$  de 0.43 1/día para el caso de TryS<sup>hi</sup> y de 0.37 1/día para pTREX, con diferencias significativas a partir del día 5 ( $p < 0.01$ ).

**A Poblaciones clonales****B**

Modelo $Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot X)$	pTRES	TryS <sup>hi</sup>
Tiempo de duplicación ( $\ln(2)/k$ , días)	2.05	1.77
Constante de crecimiento ( $k$ , 1/día)	$0.33 \pm 0.02$	$0.39 \pm 0.02$ ( $p < 0.05$ )
R <sup>2</sup>	0.97	0.97

**C Poblaciones no-clonales****D**

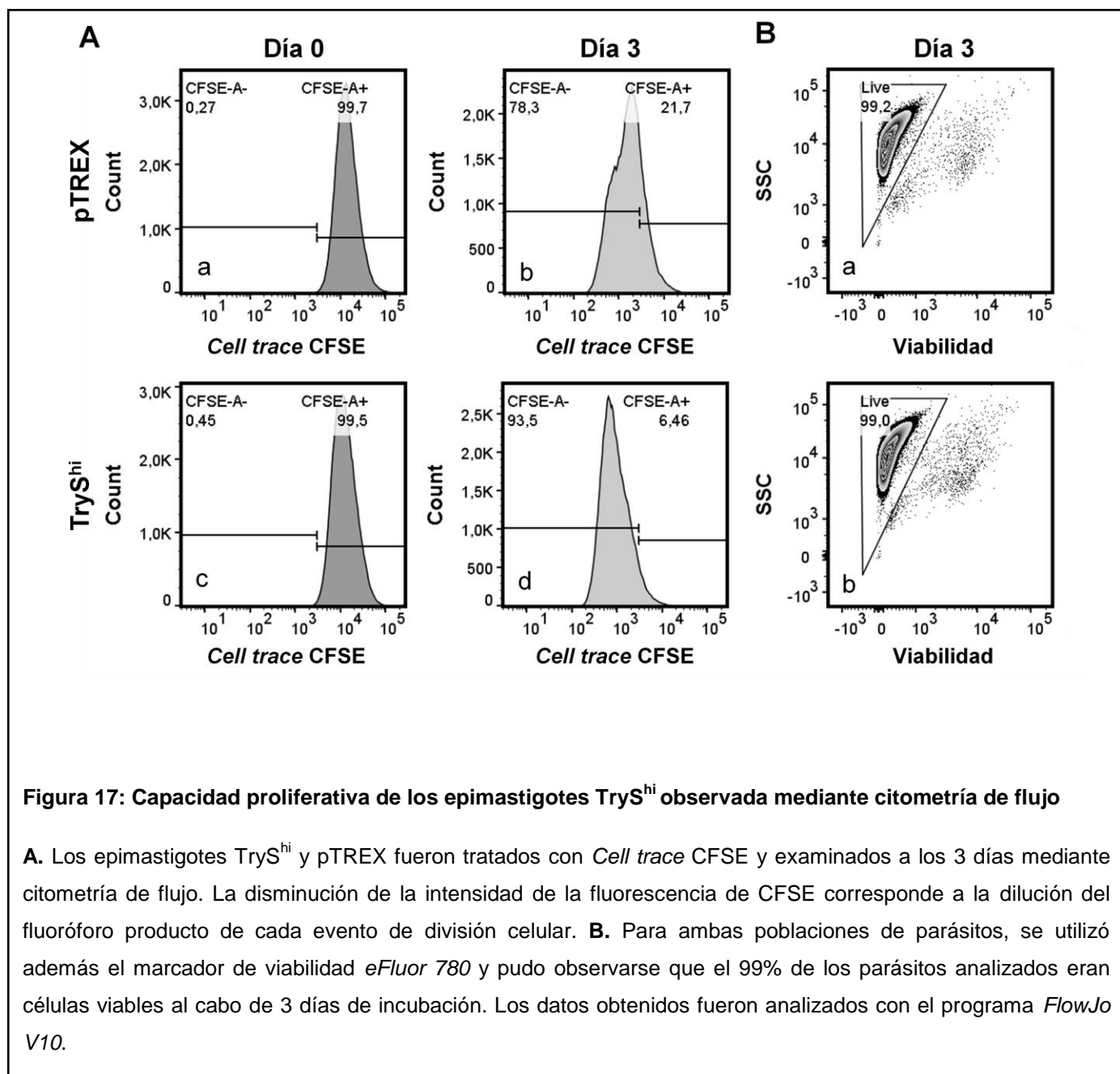
Modelo $Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot X)$	pTRES	TryS <sup>hi</sup>
Tiempo de duplicación ( $\ln(2)/k$ , días)	1.83	1.58
Constante de crecimiento ( $k$ , 1/día)	$0.37 \pm 0.03$	$0.43 \pm 0.02$
R <sup>2</sup>	0.93	0.98

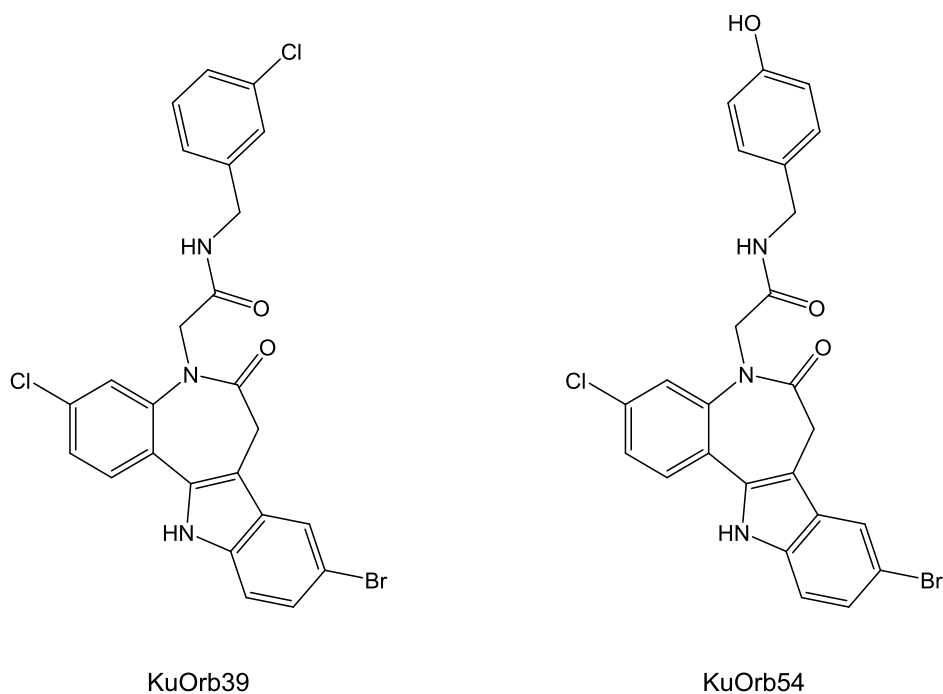
**Figura 16: Efecto de la sobre-expresión de TryS sobre la proliferación de epimastigotes**

**A.** Epimastigotes TryS<sup>hi</sup> y pTRES provenientes de poblaciones clonales, previamente sincronizadas, fueron monitoreados mediante recuento en cámara de Neubauer. **B.** El tiempo de duplicación de estas poblaciones se calculó mediante el programa *GraphPad Prism 5*. Se presenta la constante de crecimiento  $k$ , determinada bajo un modelo de crecimiento exponencial. Los valores de  $k$  de TryS<sup>hi</sup> y pTRES resultaron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). **C.** Se monitoreó también la proliferación en poblaciones no clonales de epimastigotes transfectados con los plásmidos pTRES o pTRES.TryS. En todos los casos se sembraron  $5 \times 10^5$  epimastigotes/ml de medio LIT y los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados (con tres determinaciones por muestra en cada caso). Se grafica la media  $\pm$  SEM ( $p < 0.01$  al día 5 de cultivo). **D.** En la tabla se presentan los parámetros determinados para estas poblaciones, a través del modelo de crecimiento exponencial.

A su vez, la proliferación se evaluó mediante citometría de flujo. Para ello, luego de ser sincronizados mediante su incubación en medio sin SBF, los parásitos se marcaron con el colorante *Cell trace* CFSE, cuya señal va disminuyendo proporcionalmente con cada ciclo de división celular. Transcurridos tres días desde su marcación, se analizaron estas poblaciones en el citómetro, determinándose un 93% de parásitos con una disminución de la fluorescencia de CFSE para los clones TryS<sup>hi</sup>, *versus* una reducción de 78% en la intensidad de la población pTREX (Fig. 17A). Esto, evidenció que una mayor proporción de parásitos de TryS<sup>hi</sup> atravesó un proceso de mitosis respecto de la población control. En ambos grupos, se observó un ~99% de epimastigotes viables de acuerdo con la señal fluorescente proporcionada por el colorante vital eFluor 780 (Invitrogen). Este compuesto tiene la capacidad de permitir la posterior fijación de los parásitos con paraformaldehído sin pérdida de la fluorescencia (Fig. 17B).

Una tercera línea de evidencia acerca del rol de TryS sobre la proliferación de epimastigotes, se obtuvo mediante la incubación de los parásitos transgénicos con inhibidores específicos de esta enzima [139]. Estos compuestos, desarrollados por Orban y colaboradores, pertenecen al grupo de las paulonas (derivados de benzazepinonas) que demostró tener actividad inhibitoria sobre proteínas del tipo quinasas de mamíferos, entre otros efectos. Las variantes desarrolladas como inhibidores de la enzima TryS de *T. brucei* son 3-cloroquinopaulonas con un grupo arilo en la posición N5. Estas moléculas exhibieron también actividad inhibitoria sobre la enzima recombinante *TcTryS* [139]. De este grupo de compuestos, KuOrb39 y KuOrb54 (referidos como 3d y 3h, respectivamente en [139]) fueron testeados por primera vez sobre el parásito *T. cruzi* en este trabajo (Fig. 18).





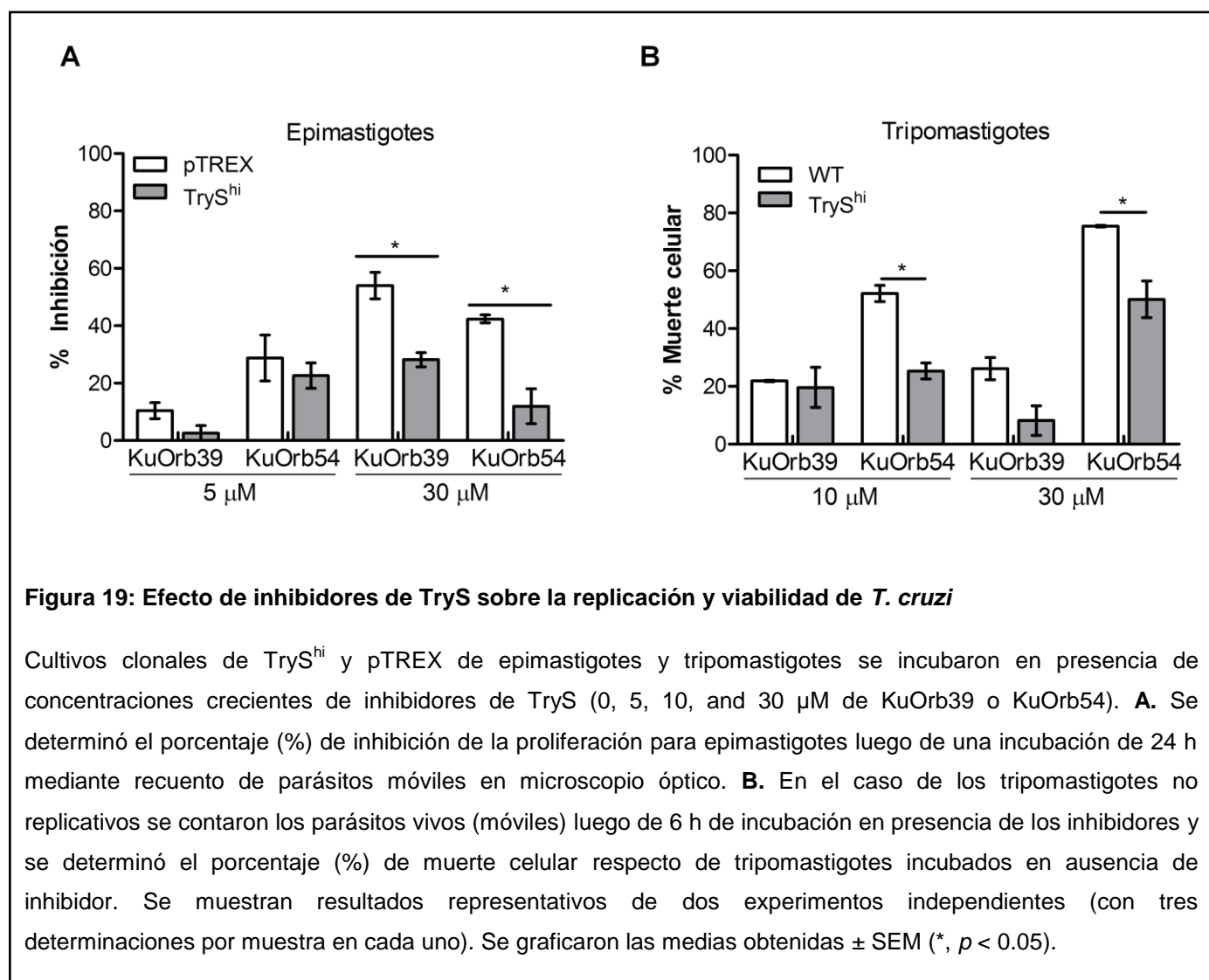
**Figura 18: Estructura química de los inhibidores de TryS KuOrb39 y KuOrb54 utilizados**

Ambos compuestos pertenecientes al grupo de las paulonas, fueron desarrollados por el Dr. Orban y colaboradores como inhibidores específicos de *TbTryS* [139].

La incubación con los inhibidores de TryS afectó la proliferación de los epimastigotes TryS<sup>hi</sup> y pTREX de una forma dosis-dependiente para el caso de KuOrb39. En la concentración de 30  $\mu\text{M}$ , el compuesto KuOrb39 resultó ser más efectivo que KuOrb54, para el estadio de epimastigote (Fig. 19A). En presencia de esta concentración de KuOrb39, se observó una inhibición de 28% y 54% para los clones TryS<sup>hi</sup> y pTREX, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Estos compuestos también afectaron la supervivencia de la forma infectiva y no replicativa de tripomastigote. En este caso, el compuesto KuOrb54 resultó ser el más efectivo. La exposición a 10 y 30  $\mu\text{M}$  de KuOrb54 resultó en un porcentaje

#### 4. Resultados

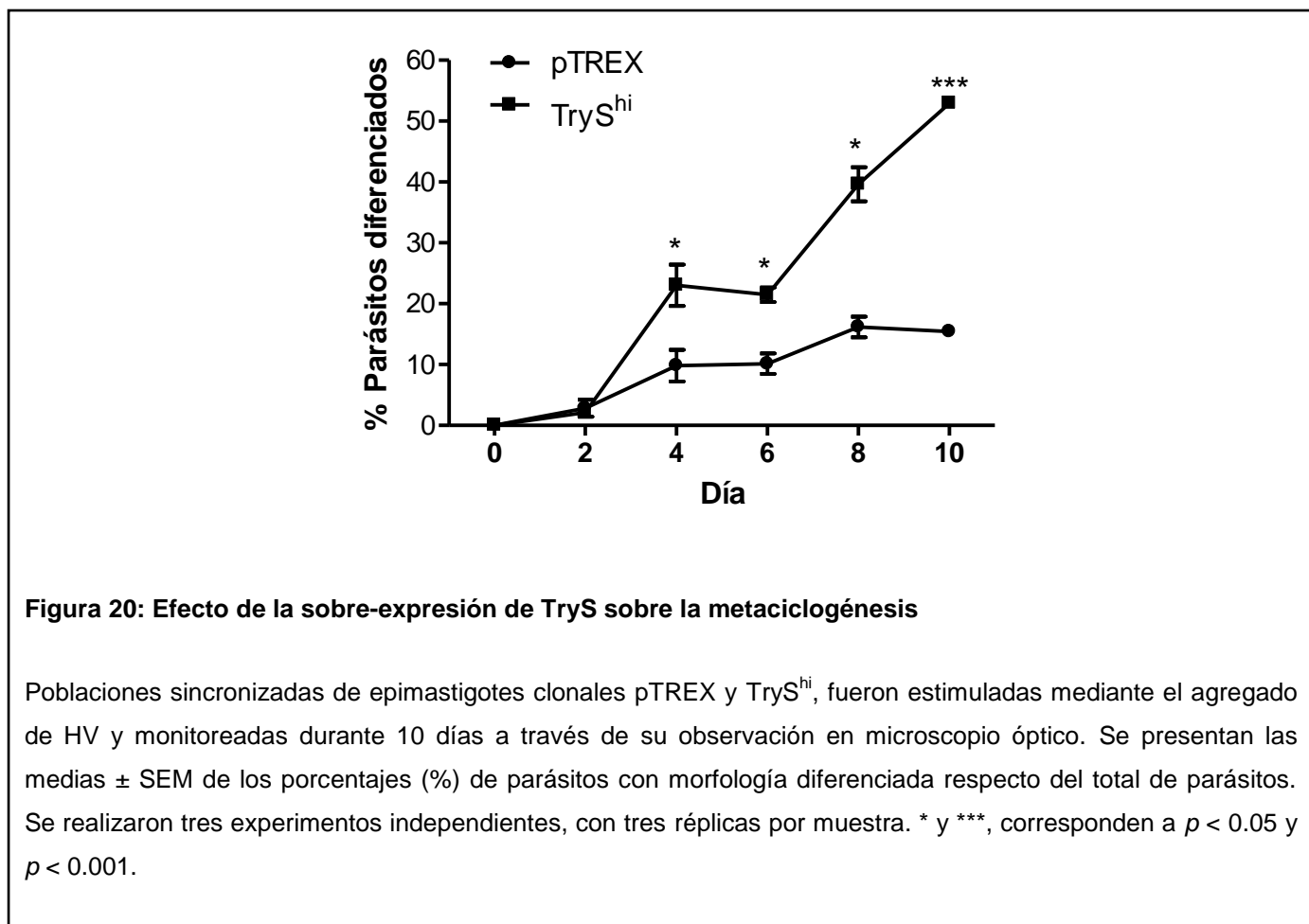
de muerte celular de 25% y 52% respectivamente para TryS<sup>hi</sup>, mientras que para los clones pTREX se obtuvieron porcentajes de 50% y 75% en esas mismas concentraciones (Fig. 19B,  $p < 0.05$ ). Los resultados presentados en las Figuras 16, 17 y 19 sugieren entonces que, TryS sería una enzima esencial, requerida para la supervivencia de la forma infectiva de *T. cruzi*, en condiciones fisiológicas normales. Por otra parte, una mayor expresión de TryS se correlacionó con menores tiempos de duplicación en los epimastigotes de *T. cruzi*, por lo que sería beneficiosa para la replicación de esta forma parasitaria.





A continuación se evaluó el efecto de la sobre-expresión de TryS sobre la transición hacia la forma de tripomastigote metacíclico o metaciclogénesis. Considerando que muchas de las enzimas del sistema antioxidante se ven reguladas positivamente durante el estadio de tripomastigote metacíclico [156,157], surgió el interrogante de si la sobre-expresión de TryS podría favorecer este proceso. Por el contrario, existen también evidencias que relacionaron un alto contenido de espermidina con el inicio de la autofagia, asociada a la metaciclogénesis [158]. Teniendo en cuenta esta segunda línea de evidencia, sería posible que un mayor consumo de espermidina por parte de los parásitos sobre-expresantes, resulte desfavorable para la activación de la autofagia y que por consiguiente, afecte la metaciclogénesis. Para evaluar estas hipótesis, se sincronizaron poblaciones clonales de epimastigotes pTRES y TryS<sup>hi</sup> mediante su incubación en medio LIT sin SBF por 24 h, para luego transferirlos a medio LIT completo suplementado con un 10% de homogenado intestinal de *T. infestans* (HV) filtrado [159]. El contenido del HV, obtenido 5 días más tarde de la alimentación de los insectos, actúa como un inductor de la diferenciación a la forma infectiva del parásito. Luego, se monitorearon durante 10 días los cultivos a fin de determinar, mediante su recuento en cámara de Neubauer, la proporción de parásitos diferenciados.

Los recuentos resultaron en un mayor porcentaje (53%) de parásitos diferenciados (parcial o totalmente) en la población TryS<sup>hi</sup>, respecto de lo observado en la población pTRES (15%) al día 10 de cultivo, con diferencias significativas a partir del día 4 post-inducción (Fig. 20,  $p < 0.05$ ). En su conjunto, los resultados presentados en las Figuras 16, 17, 19, evidenciaron que los parásitos con una mayor expresión de la enzima TryS tienen una mayor tasa de proliferación durante el estadio de epimastigote, y especialmente exhibieron una ventaja cuando las condiciones del medio fueron sub-óptimas, generándose así una mayor cantidad de parásitos. Estos, a su vez, presentaron una mayor capacidad de respuesta frente al estímulo de metaciclogénesis, en este caso, dado por el HV (Fig. 20), lo que se traduciría en un mayor inóculo infectivo en el insecto vector.



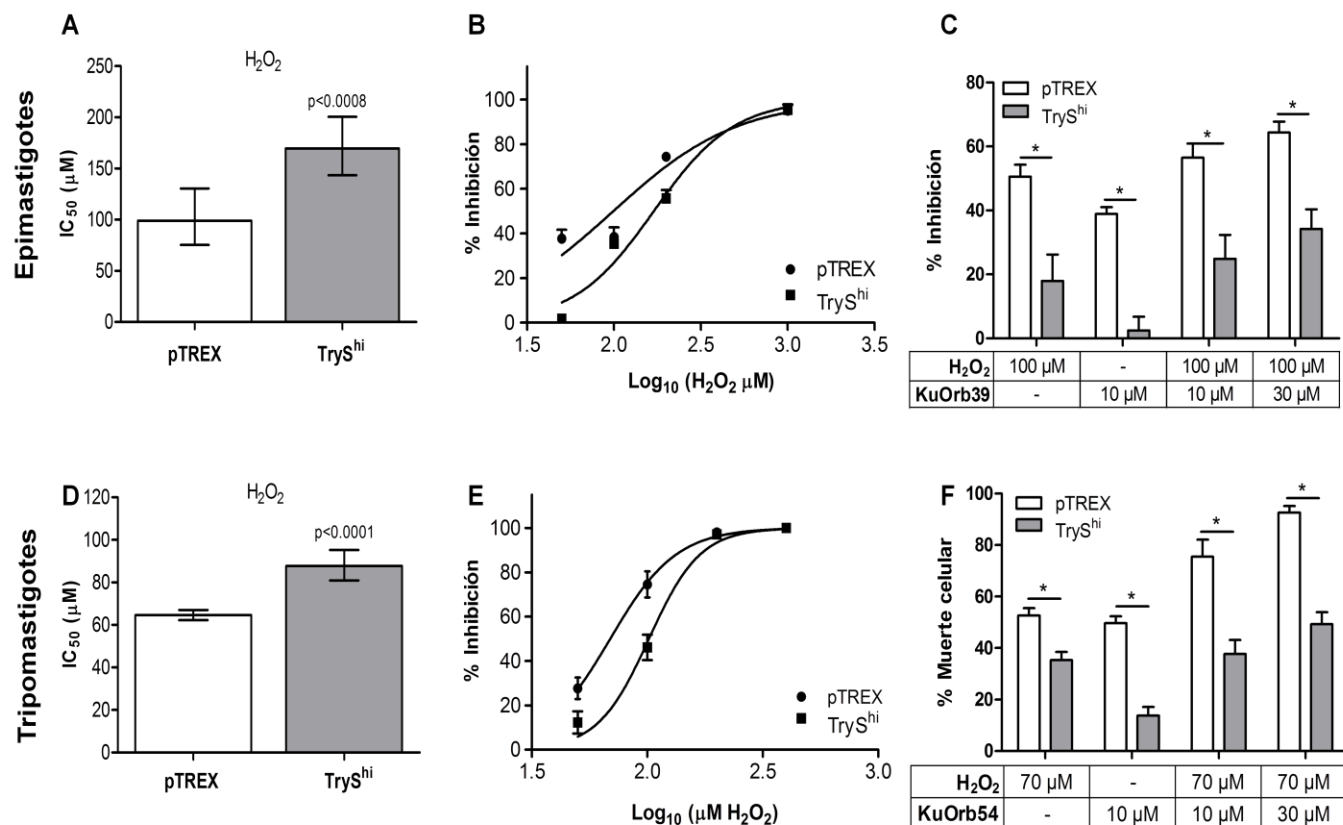
#### 4.3. La sobre-expresión de TryS confiere resistencia al estrés oxidativo

Debido a que el T[SH]<sub>2</sub> es capaz de remover ROS a través de su reacción directa o bien contribuir indirectamente a su neutralización a través de la maquinaria antioxidante del parásito, a continuación se propuso analizar el efecto de la sobre-expresión de TryS sobre la capacidad de *T. cruzi* de sobrevivir en condiciones de estrés oxidativo. Para esto utilizamos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante, ya que se trata de una molécula reactiva ubicua producida por el sistema inmunológico tanto del insecto vector como del hospedador mamífero [49,59,160]. Para determinar la susceptibilidad de las líneas clonales TryS<sup>hi</sup> y pTRES frente a este oxidante, se incubaron epimastigotes en presencia de 50-1000

$\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y se evaluó el porcentaje de inhibición de la proliferación mediante la determinación de la concentración inhibitoria 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) transcurridas 24 h de iniciado este tratamiento. Los epimastigotes correspondientes a la población  $\text{TryS}^{\text{hi}}$  mostraron un incremento de  $\sim 1.7$  veces en la tolerancia frente a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que pudo ser evidenciado mediante los valores  $\text{IC}_{50}$  de  $169.6 \mu\text{M}$  y  $99.1 \mu\text{M}$  para  $\text{TryS}^{\text{hi}}$  y pTREX, respectivamente (Fig. 21A&B,  $p < 0.001$ ).

Para verificar que el aumento en la tolerancia frente a este oxidante se correlacionaba con la mayor expresión y actividad de la enzima TryS, a continuación se evaluó el efecto de la inhibición de TryS por parte de KuOrb39 sobre la proliferación de epimastigotes incubados en presencia de  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (una concentración cercana al  $\text{IC}_{50}$  para la población control pTREX) y el inhibidor de TryS. Luego de la incubación con  $10 \mu\text{M}$  de KuOrb39, no se observaron resultados aditivos respecto de la inhibición de la proliferación generada por el oxidante *per se*. Sin embargo, la inhibición de TryS por una mayor concentración de KuOrb39 ( $30 \mu\text{M}$ ), se tradujo en una disminución del efecto de protección producido por la sobre-expresión de TryS frente al oxidante (Fig. 21C).

Paralelamente, se realizó este análisis sobre la forma infectiva de tripomastigotes derivados de cultivo celular, determinándose en este caso el porcentaje de muerte celular, al tratarse de un estadio no replicativo. De manera similar, las formas infectivas de  $\text{TryS}^{\text{hi}}$  (*versus* pTREX) mostraron un incremento de 1.4 veces en la tolerancia frente a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los valores de  $\text{IC}_{50}$  en este caso fueron de  $87.7 \mu\text{M}$  y  $64.6 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  para los tripomastigotes  $\text{TryS}^{\text{hi}}$  y pTREX, respectivamente. Para el caso de esta forma parasitaria, se utilizó el compuesto KuOrb54 ya que fue el más efectivo para este estadio, de acuerdo a los resultados previos (Fig.19B). La co-incubación con  $10 \mu\text{M}$  de KuOrb54 produjo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la toxicidad producida por el oxidante, observándose una muerte celular de 37.7% y 75.5%, para  $\text{TryS}^{\text{hi}}$  y pTREX, respectivamente. Esta diferencia fue aún mayor en presencia de  $30 \mu\text{M}$  del inhibidor, donde se observó una muerte celular de 49.3% y 92.6%, para  $\text{TryS}^{\text{hi}}$  y pTREX, respectivamente. Es decir que, también en presencia del inhibidor KuOrb54, los tripomastigotes  $\text{TryS}^{\text{hi}}$  mostraron una mayor capacidad de resistir el insulto oxidativo (Fig. 21F).



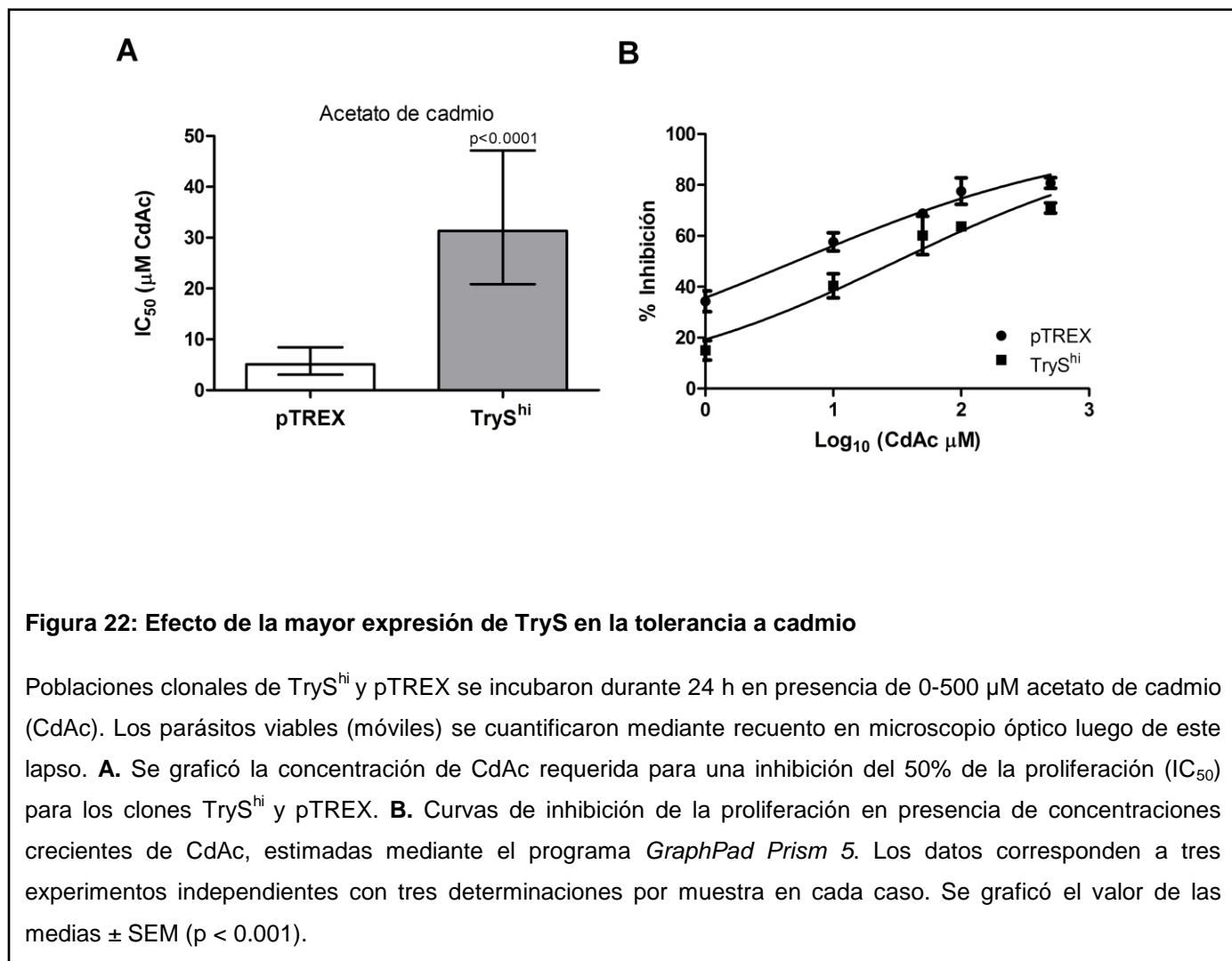
**Figura 21: Participación de TryS en la resistencia frente a estrés oxidativo**

Las poblaciones transfectantes y clonales de epimastigotes (**A-C**) y tripomastigotes (**D-F**) pTRES y TryS<sup>hi</sup> de *T. cruzi* fueron incubadas por 24 h y 6 h, respectivamente, en presencia de 0-1000  $\mu M$   $H_2O_2$  y 0-30  $\mu M$  de los inhibidores de TryS KuOrb39 o KuOrb54. **A y D.** Se determinaron las concentraciones requeridas para una inhibición del 50% ( $IC_{50}$ ) para los parásitos TryS<sup>hi</sup> (*versus* control). **B y E.** Se estimaron las curvas de inhibición de la proliferación o la viabilidad celular en presencia de concentraciones crecientes de  $H_2O_2$ . **C y F.** Porcentajes (%) de inhibición de la proliferación (para epimastigotes) o de muerte celular (para tripomastigotes) en presencia de  $H_2O_2$  en una concentración  $\sim IC_{50}$  de los parásitos control y concentraciones variables de los inhibidores, KuOrb39 o KuOrb54. En todos los experimentos se realizó el recuento de los parásitos móviles y de morfología normal, en cámara de Neubauer. Todos los experimentos fueron realizados al menos dos veces, con tres determinaciones por muestra en cada uno. Se grafican las medias  $\pm$  SEM (\*,  $p < 0.05$ ).

Es reconocido que los metales activos en un ambiente oxidante, pueden sufrir un ciclado redox que lleva a la producción exacerbada de radicales libres. Principalmente, aquellos capaces de reducir peróxidos y producir radicales hidroxilo, como el hierro y el cobre, pueden generar una alta toxicidad a través de la reacción de Fenton [161,162]. Por otro lado los metales inactivos, tales como el plomo, el cadmio o el mercurio, pueden generar la depleción de antioxidantes celulares, particularmente de aquellos del tipo tiólicos, debido a su capacidad de unirse a grupos nucleofílicos como los sulfhidrilos. Por lo tanto, los metales con o sin actividad redox, pueden generar un incremento de ROS en el microambiente celular [163]. En el caso particular de *T. cruzi*, fue demostrado que metales como el zinc, el cadmio y el mercurio, pueden generar un aumento de ROS y así ejercer toxicidad [164]. Este contacto del parásito con tales metales podría tener lugar *in vivo*, debido a la lisis de glóbulos rojos o al daño celular en el tejido muscular, donde el hierro contenido en la hemoglobina y mioglobina es abundante [165].

Por lo tanto, a continuación se evaluó el efecto del cadmio como una fuente alternativa de estrés oxidativo. En este caso, para los epimastigotes TryS<sup>hi</sup> se determinó una tolerancia >6 veces mayor frente a Cd<sup>2+</sup> en comparación con los epimastigotes pTRES. Los valores de IC<sub>50</sub> calculados fueron de 31.4 µM and 5.1 µM, respectivamente (Fig. 22, *p* < 0.001). En conclusión, los resultados presentados en las Figuras 21 y 22 sugieren que: i) a pesar del bajo nivel de expresión de TryS en el estadio de epimastigote, esta enzima contribuye al manejo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en esta fase parasitaria; ii) por otra parte, pese a que TryS y otras enzimas del sistema antioxidante son expresadas en mayores niveles en el tripomastigote (*versus* lo observado en el epimastigote) [155,156], esta forma del parásito resultó más sensible al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los experimentos realizados. iii) La sobre-expresión de TryS confirió protección frente a esta fuente de estrés oxidativo tanto en el epimastigote como en el tripomastigote. Además iv) esta enzima tendría un rol fundamental para la detoxificación de metales pesados a través del T[SH]<sub>2</sub> en *T. cruzi*. A modo de conclusión preliminar, es posible decir que la alta expresión de TryS puede

proporcionarle al parásito una mayor tolerancia frente al estrés oxidativo tanto en el contexto del insecto vector como en el hospedador mamífero.



### 4.4. Altos niveles de expresión de TryS se asocian con una mayor tolerancia a benznidazol y nifurtimox

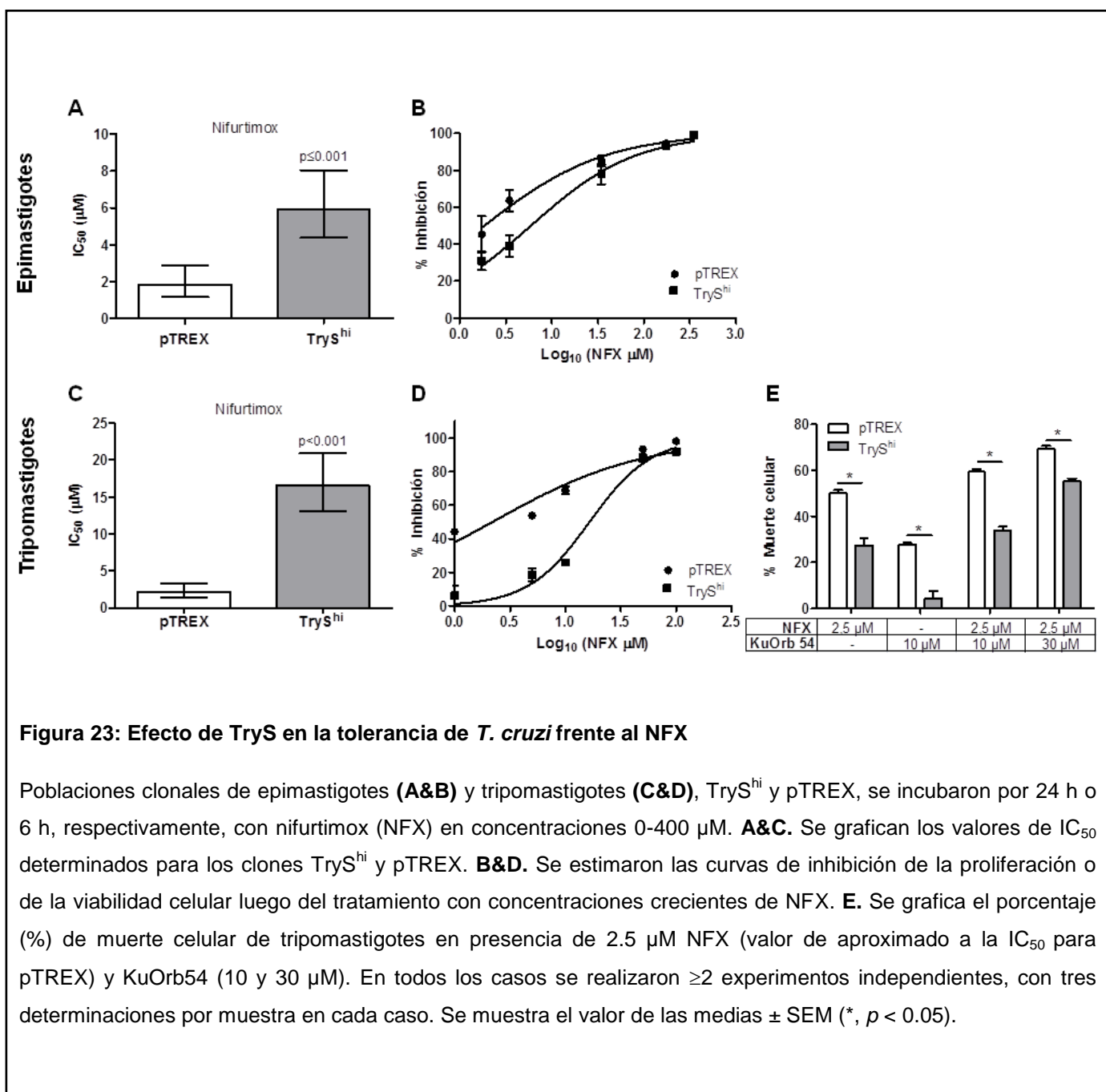
Nifurtimox (NFX) y benznidazol (BZ) son en la actualidad las únicas drogas disponibles para el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad de Chagas. NFX es un derivado nitrofurano, que ejerce su actividad biológica mediante la formación de nitrilos insaturados de cadena lineal, altamente reactivos y citotóxicos [166], además de la depleción de tioles de bajo peso molecular como el T[SH]<sub>2</sub> [167]. El benznidazol (BZ) por su parte es la droga mayormente administrada para el control de la infección con *T. cruzi*. Se ha demostrado que este nitroimidazol, causa un efecto pleiotrópico a través de la depleción de los tioles de bajo peso molecular en el patógeno, mediante la formación de aductos [43], causando una condición de estrés oxidativo y comprometiendo las biomoléculas del parásito.

A fin de analizar el efecto que la sobre-expresión de TryS pudiera tener sobre la resistencia de *T. cruzi* frente a estos fármacos, se incubaron tanto epimastigotes como tripomastigotes derivados de cultivo celular, en presencia de ambos. Para el caso de NFX, se incubaron parásitos TryS<sup>hi</sup> y pTREG en presencia de 1-400 µM NFX para luego determinar el porcentaje de inhibición de la proliferación para los epimastigotes replicativos y la disminución de la supervivencia en tripomastigotes (fase infectiva, no proliferativa). Los epimastigotes TryS<sup>hi</sup> mostraron un aumento de >3 veces en la tolerancia a NFX, con valores de IC<sub>50</sub> de 5.9 µM y 1.8 µM para TryS<sup>hi</sup> y pTREG, respectivamente (Fig. 23A&B,  $p < 0.001$ ).

Resultó interesante que, en el caso de los tripomastigotes derivados de cultivo celular, se obtuvo una amplia diferencia entre las IC<sub>50</sub> de cada población clonal. Para los parásitos TryS<sup>hi</sup> se observó una tolerancia 7.5 veces mayor frente a NFX respecto de los parásitos control pTREG, con valores de IC<sub>50</sub> de 16.53 µM y 2.19 µM para TryS<sup>hi</sup> y pTREG, respectivamente (Fig. 23C&D,  $p < 0.001$ ). Independientemente de la base genética del parásito, la co-incubación con el inhibidor KuOrb54 redujo

#### 4. Resultados

significativamente la resistencia al NFX de los tripomastigotes. Esto fue evidenciado mediante los porcentajes de muerte celular obtenidos: de 50%, 59% y 69% para pTRES y de 27%, 34%, y 55% para el clon sobre-expresante, en presencia de 2.5  $\mu\text{M}$  NFX, NFX combinado con 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  de KuOrb54, respectivamente (Fig. 23E,  $p < 0.05$ ).





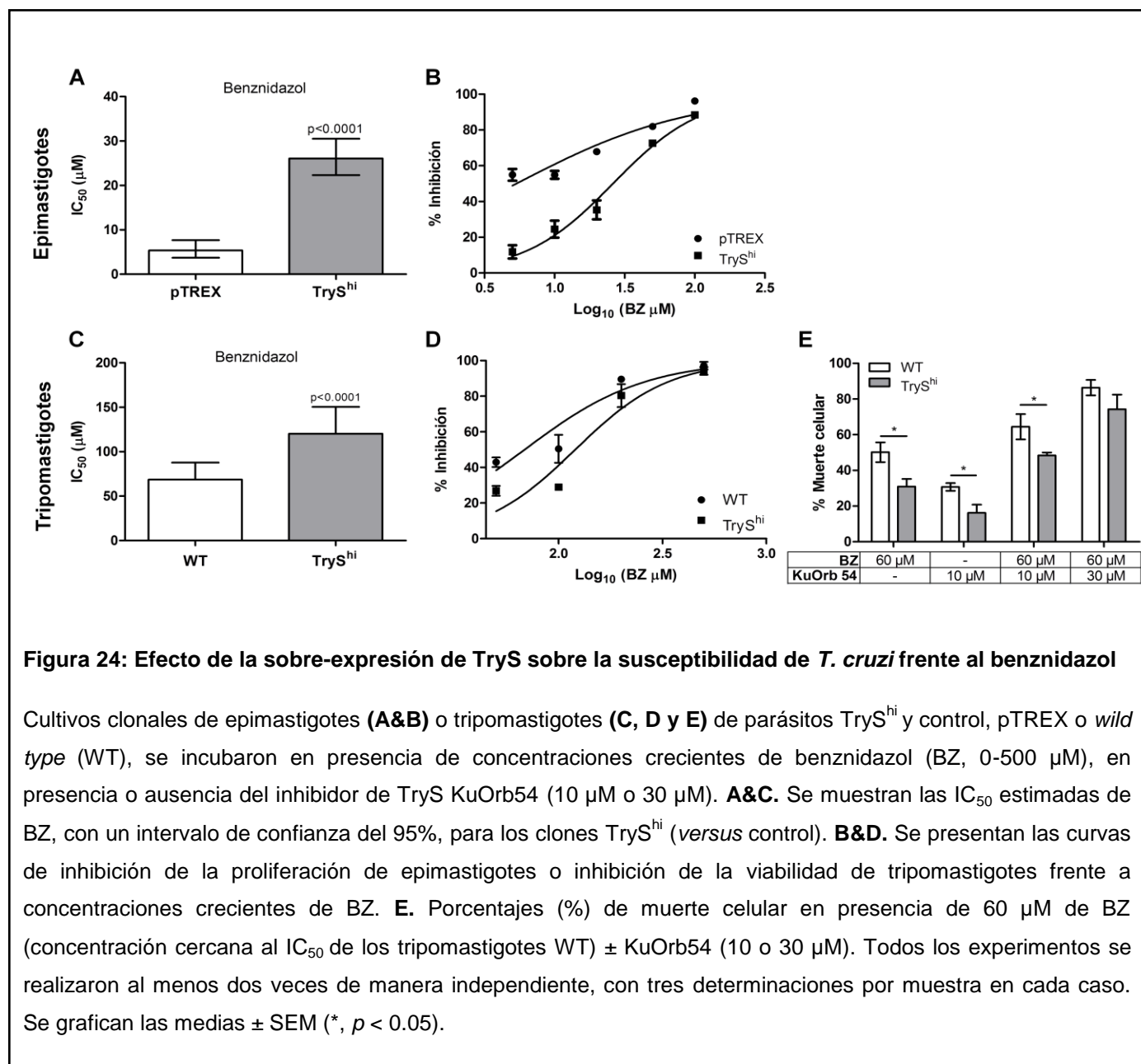
A continuación, y del mismo modo, se evaluó la participación de TryS sobre la resistencia a BZ por parte de *T. cruzi*. Los epimastigotes TryS<sup>hi</sup> mostraron un incremento de >4.5 veces en la tolerancia a BZ, con valores de IC<sub>50</sub> de 26.1 μM y 5.3 μM para TryS<sup>hi</sup> y pTREX, respectivamente (Fig. 24A&B,  $p < 0.001$ ). El mismo perfil, se observó para los tripomastigotes, obteniéndose valores de IC<sub>50</sub> de 120.2 μM y 68.6 μM, para TryS<sup>hi</sup> y parásitos *wild type*, respectivamente (Fig. 24C&D). Además, la co-incubación con el inhibidor KuOrb54 aumentó significativamente la toxicidad del benznidazol frente a los tripomastigotes, independientemente de la base genética de los clones, tal como ocurrió para NFX. Se pudieron observar porcentajes de muerte celular de 31%, 48% y 74% para TryS<sup>hi</sup> y porcentajes de 50%, 64%, y 86% para la población pTREX; bajo la presión de 60 μM BZ, 60 μM BZ junto con 10 μM y 30 μM de KuOrb54, respectivamente (Fig. 24E,  $p < 0.05$ ).

En conjunto, los resultados expuestos en las Figuras 23 y 24, sugieren que la enzima TryS es capaz de conferirle a *T. cruzi* una mayor tolerancia frente a NFX y BZ, tanto en una fase replicativa como en una infectiva de importancia clínica. La utilización de un inhibidor de TryS podría tener un gran potencial administrado como tratamiento adyuvante para aumentar la eficiencia de las drogas tripanocidas.

### **4.5. Los parásitos sobre-expresantes de TryS presentan una menor infectividad y capacidad de replicación en macrófagos *in vitro***

La sobre-expresión de enzimas del sistema antioxidante durante la metacicloogénesis y en estadios infectivos de *T. cruzi* ha sido previamente demostrada mediante estudios proteómicos [156,157]. Esta regulación positiva, estaría asociada a una mayor tolerancia de estas formas parasitarias frente al estrés oxidativo generado por el sistema inmune del hospedador mamífero [155,168]. Por otra parte, los resultados hasta aquí presentados demostraron que parásitos con

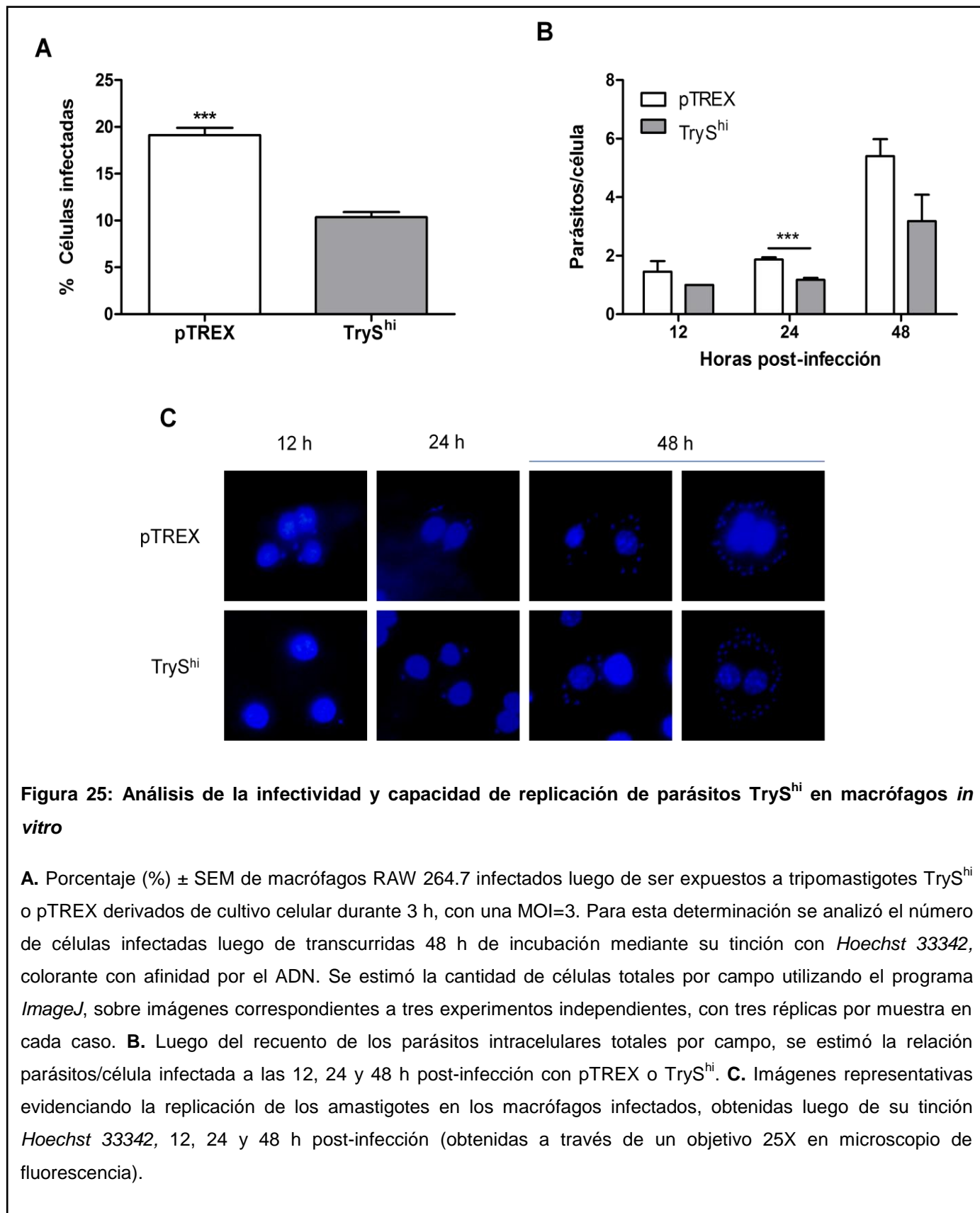
mayores niveles de expresión de TryS resultaron más tolerantes al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uno de los principales oxidantes generados en el contexto del estallido respiratorio de macrófagos. Por estas razones, se propuso evaluar a continuación, si la mayor expresión de TryS en el estadio del tripomastigotes podría representar un mecanismo de patogenicidad, confiriéndole una mayor capacidad de infección y replicación en el ambiente del macrófago.



#### 4. Resultados

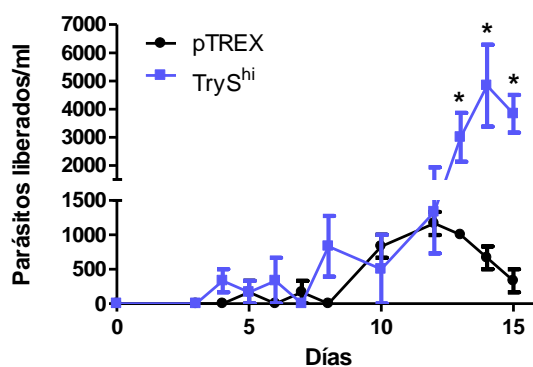
Para estos análisis, se utilizó la línea celular de monocitos murinos RAW 264.7 (obtenida de *Mus musculus* BALB/c), que se infectó con una multiplicidad de infección (MOI) de 3 (relación parásito:célula 3:1), utilizando tripomastigotes derivados de cultivo celular, por un lapso de 3 h. Luego de este tiempo se removieron los parásitos no adheridos, lavando las monocapas de células y se evaluó la presencia de formas parasitarias intracelulares a las 12, 24 y 48 h post-infección mediante su tinción con *Hoechst* 33342 y visualización a través de microscopía de fluorescencia. La cantidad de macrófagos infectados por la línea TryS<sup>hi</sup> resultó significativamente menor a la observada para el control pTREX, de 10% y 19% respectivamente (Fig. 25A,  $p < 0.001$ ). Es posible que este resultado, que a primera vista resultó llamativo, se deba a algún tipo de desbalance producto de la sobre-expresión. Está descrito que el vector pTREX conduce a un fuerte nivel de expresión y la sobre-expresión de TryS conlleva un consumo de ATP, GSH y espermidina por lo que sería posible que su actividad pueda generar un desbalance energético que afecte otras funciones celulares necesarias para la invasión, como el movimiento flagelar o la biosíntesis de proteínas requeridas para la invasión.

Por otra parte, el análisis de la relación parásitos/célula evidenció un menor número de amastigotes TryS<sup>hi</sup> por célula infectada, obteniéndose diferencias significativas a las 24 h post-infección (Fig. 25B&C,  $p < 0.001$ ). Estos resultados indicaron que, además de la infectividad, la sobre-expresión también estaría afectando la replicación intracelular. Este comportamiento resultó contrario a lo observado para el estadio replicativo de epimastigote, donde los parásitos TryS<sup>hi</sup> demostraron tener una ventaja en la proliferación (*versus* epimastigotes pTREX).



#### 4.6. Los parásitos sobre-expresantes de TryS emergen tempranamente de la célula infectada

Luego, se analizó la liberación al medio de cultivo de los tripomastigotes provenientes de los macrófagos infectados. Para esta determinación, se concentró el medio de cultivo mediante centrifugación y se realizó el recuento de parásitos en microscopio óptico diariamente en cámara de Neubauer. A pesar que los clones TryS<sup>hi</sup> produjeron menos cantidad de parásitos intracelulares respecto de los controles pTREX, su liberación hacia el medio extracelular ocurrió a tiempos menores y generando una mayor cantidad de tripomastigotes libres, disponibles para una futura ronda de infección (Fig. 26). Esta observación resultó estadísticamente significativa a partir del día 13 post-infección ( $p < 0.05$ ). Podría especularse que, si esta liberación temprana ocurriera también durante una infección *in vivo*, este hecho favorecería la rápida dispersión del patógeno en el organismo, “*ganando tiempo*” a la generación de una respuesta inmune adaptativa, como un posible mecanismo de evasión inmunológica del patógeno.

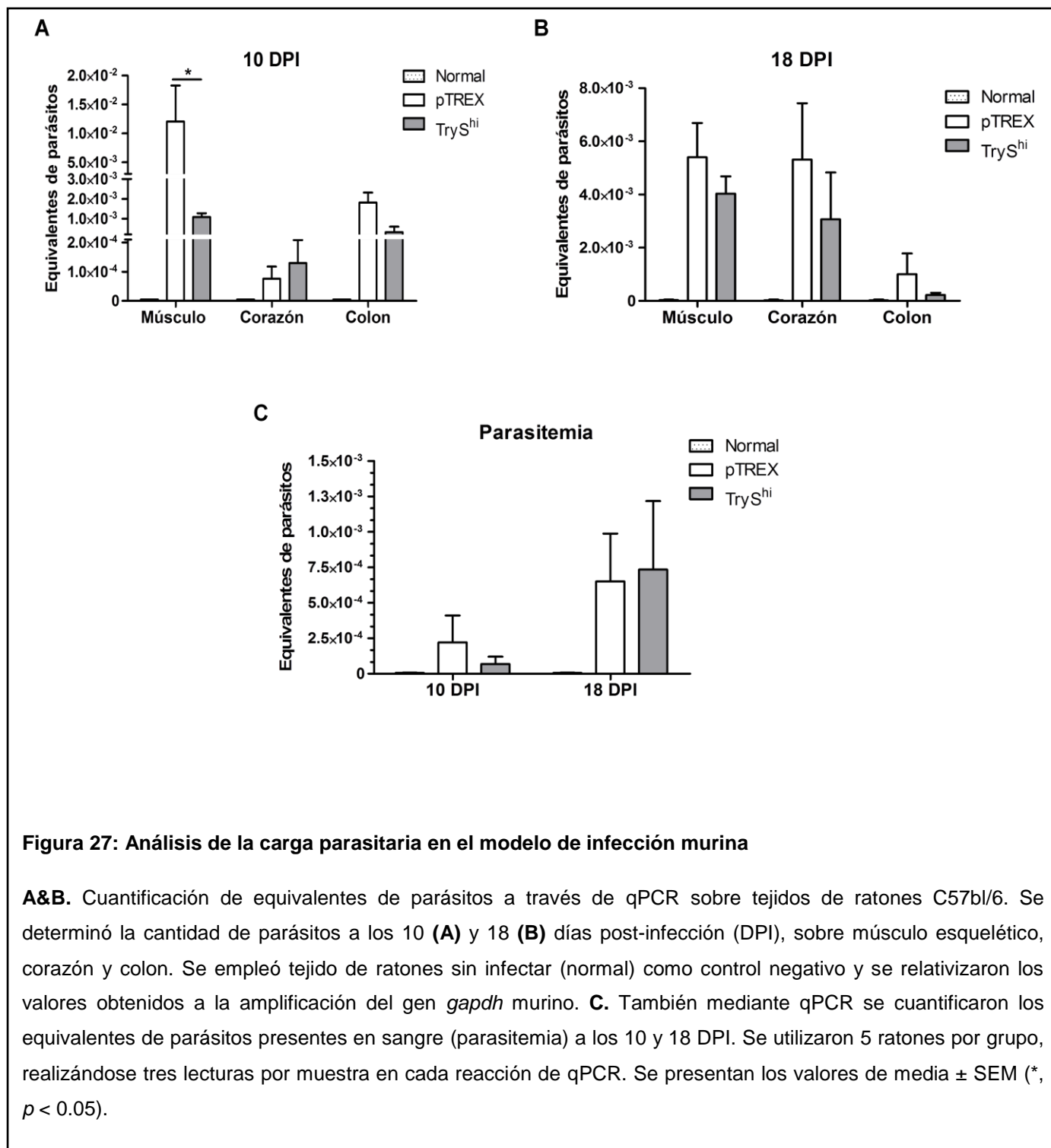


**Figura 26: Determinación del número de tripomastigotes liberados al medio de cultivo**

Luego de realizar la infección de macrófagos RAW 264.7 con parásitos pTREX o TryS<sup>hi</sup> (MOI=3) por 3 h, se realizó el recuento diario de tripomastigotes liberados al medio extracelular. Para esto, se concentró previamente el medio de cultivo mediante centrifugación y se realizó el recuento en cámara de Neubauer mediante microscopía óptica (40X). Se graficó la media de parásitos en 1 ml de medio de cultivo sin concentrar (parásitos/ml)  $\pm$  SEM. Se realizaron dos experimentos independientes, con tres réplicas por cada clon en cada caso. \* corresponde a  $p < 0.05$ .

### 4.7. Los parásitos TryS<sup>hi</sup> resultan también menos replicativos en un modelo *in vivo*

Con el fin de evaluar el comportamiento de los clones transfectantes en un modelo animal, se realizaron infecciones de ratones C57bl/6 con 10,000 parásitos por ratón mediante su inoculación intraperitoneal. Al cabo de 10 y 18 días post-infección (DPI) los animales se sacrificaron para analizar la presencia del parásito en sangre y en diferentes tejidos blanco de infección: músculo esquelético, corazón y colon. Para ello, se determinaron los equivalentes de parásitos en cada grupo experimental (infectado con TryS<sup>hi</sup>, pTREX o sin infectar) mediante qPCR. Se utilizó la amplificación del gen *gapdh* murino para la normalización de los valores obtenidos. Los resultados mostraron que, a los 10 DPI, la carga parasitaria de pTREX fue significativamente mayor respecto de la de TryS<sup>hi</sup> en músculo esquelético (Fig. 27A). Cabe destacar que la carga parasitaria detectada en este tejido resultó varios órdenes mayor a la detectada para tejido cardíaco y colon, donde las diferencias observadas resultaron ser no significativas, tanto a los 10 DPI como a los 18 DPI. Acorde a lo esperado, no se detectó amplificación en las muestras de ratones sin infectar (normales). A los 18 DPI sin embargo, la disparidad observada tempranamente en músculo esquelético se equiparó, y se dejó de observar una diferencia significativa entre la infección por parte de ambos clones. Estos resultados obtenidos para músculo esquelético, fueron consistentes con lo observado en los experimentos *in vitro* realizados en macrófagos. Es decir que, en ambas condiciones experimentales –*in vitro* e *in vivo* a los 10 DPI– la replicación de los amastigotes TryS<sup>hi</sup> fue menor que la observada para los parásitos pTREX (evaluada mediante tinción con *Hoechst* 33342 y recuento, y qPCR, respectivamente).



Por otra parte, surgió el interrogante de si la liberación temprana de tripomastigotes al medio observada en los ensayos *in vitro*, podría tener un correlato con las parasitemias de los ratones infectados, realizada en una fase temprana de la infección. Para evaluar esta posibilidad, se cuantificaron los equivalentes parasitarios en muestras de sangre a través de qPCR. A diferencia de lo observado *in vitro*, los valores obtenidos a los 10 DPI, no reflejaron una mayor presencia de parásitos TryS<sup>hi</sup> respecto de pTREX (Fig. 27C). Mientras que a los 18 DPI, nuevamente los valores de ambos grupos se equipararon, sin presentar diferencias significativas entre ellos para ambos tiempos evaluados. Si bien cada sistema de infección experimental presenta sus características específicas, de acuerdo con la cepa de ratón y de *T. cruzi* utilizados, en base a observaciones previas [169,170] y considerando que estos parásitos fueron mantenidos mediante su cultivo *in vitro* durante un largo período de tiempo, se consideró que el pico de parasitemia se manifestaría después de los 20 DPI. Sobre este supuesto, la determinación en sangre para este experimento particular se realizó a los 10 DPI, considerando que este punto correspondería a una etapa temprana del proceso de infección. Si bien los resultados no evidenciaron diferencias entre los grupos, sería probable que esta hubiera existido a tiempos menores al evaluado, producto del escape temprano de los macrófagos.

### 4.8. Tripomastigotes con una mayor expresión de TryS activan una respuesta apoptótica en macrófagos murinos

Las poliaminas, como la putrescina, la espermidina y la espermina, son moléculas ubicuas en todos los organismos vivos, y a su vez esenciales para la proliferación de células eucariotas. En su forma de policationes, son capaces de interactuar con biomoléculas con carga negativa como el ADN o el ARN y han sido implicadas en muchos procesos biológicos tales como la replicación, la transcripción, la traducción, con un rol regulador de la proliferación y la tumorigénesis [171,172].

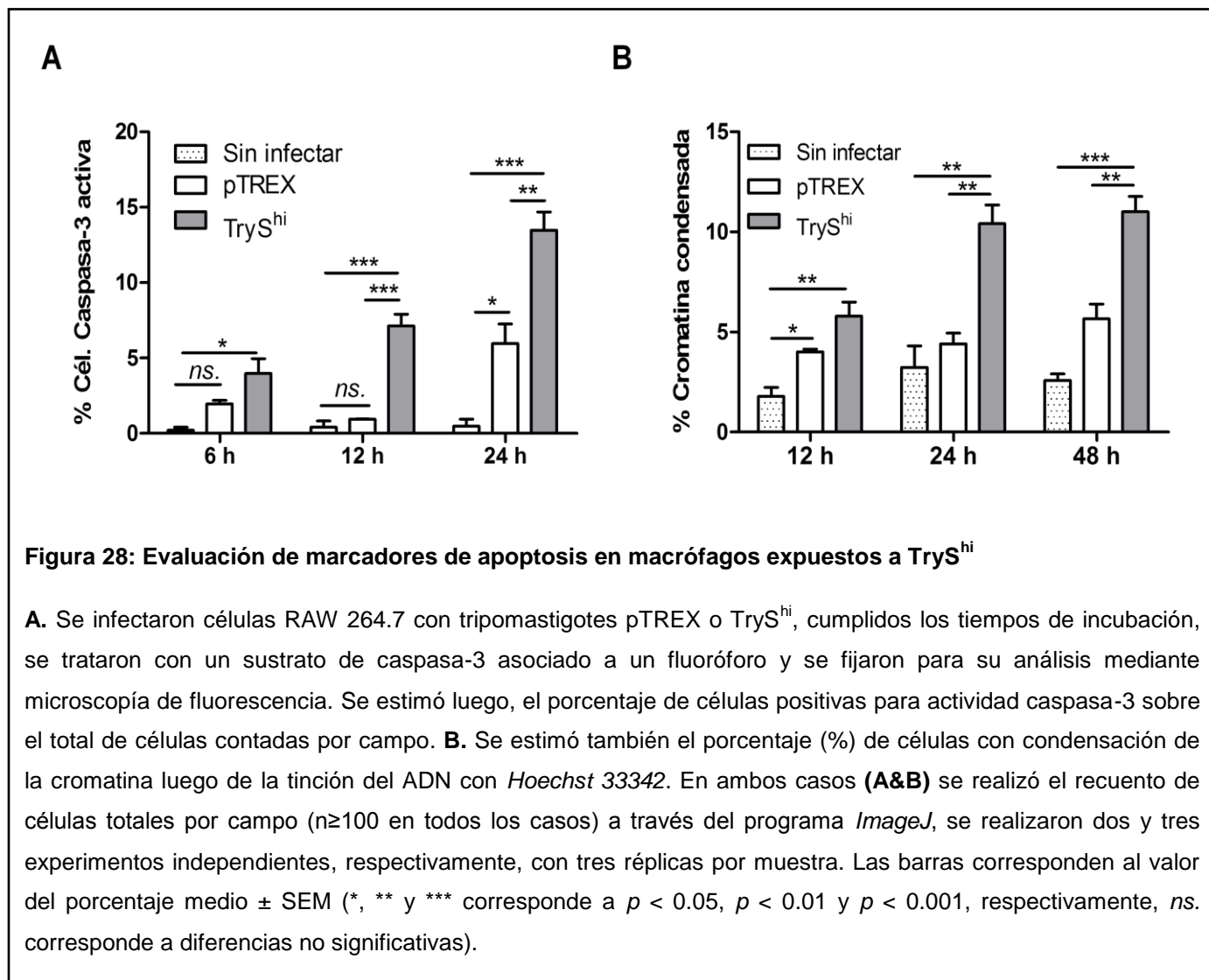


Existen también evidencias que sugieren que el contenido de poliaminas puede regular positiva o negativamente la respuesta apoptótica, dependiendo de cada sistema y sub-tipo celular [173,174]. Considerando que la actividad enzimática de TryS implica el consumo de espermidina proveniente de la célula hospedadora, se planteó evaluar si la infección con parásitos con mayor expresión de TryS podría desencadenar una respuesta diferencial sobre los macrófagos RAW 264.7. Asimismo, durante la evaluación microscópica de las células expuestas a tripomastigotes TryS<sup>hi</sup>, el aspecto de estos cultivos permitía especular sobre un fenómeno de muerte celular.

Para analizar este proceso en las células infectadas con TryS<sup>hi</sup>, se evaluaron la actividad de caspasa-3 y la hipercondensación nuclear como indicadores de la respuesta apoptótica. Las caspasas son cisteín-proteasas que se expresan en forma de zimógenos, que luego de su procesamiento proteolítico son capaces de polimerizar y formar un complejo con actividad enzimática. La caspasa-3 en particular, constituye una variante efectora, que actúa *río abajo* (*downstream*) de una cascada de señalización compleja que conduce a este mecanismo de muerte celular programada. Esta enzima resulta común tanto a la vía intrínseca (o mitocondrial) como a la extrínseca (mediada por señales extracelulares) de la apoptosis. Para la determinación de su actividad, se utilizó el reactivo *CellEvent* (ThermoFisher Scientific), un péptido de cuatro aminoácidos (DEVD) conjugado a una molécula de unión a ácidos nucleicos. Una vez que este sustrato es clivado por la caspasa-3 en forma específica, esta molécula se disocia del péptido que le impedía su unión al ADN, permitiendo la marcación de los núcleos y ADN extranuclear.

Para este ensayo se realizaron infecciones *in vitro* sobre células RAW 264.7 nuevamente con una MOI=3 y se cuantificó el porcentaje (%) de células con actividad de caspasa-3 al cabo de 6, 12 y 24 h luego de realizada la infección (Fig. 28A). Los resultados obtenidos mostraron un porcentaje de células con actividad para caspasa-3 significativamente mayor en aquellas expuestas a tripomastigotes TryS<sup>hi</sup>, respecto de las tratadas con pTREX, a partir de las 12 horas post-infección (7.1% y 0.6%, respectivamente,  $p < 0.001$ ). Esta diferencia se mantuvo también luego de transcurridas 24 h ( $p <$

0.01). En la Figura 29 se presentan imágenes representativas de la mayor proporción de células con señal positiva de *CellEvent* luego de la infección con TryS<sup>hi</sup>.

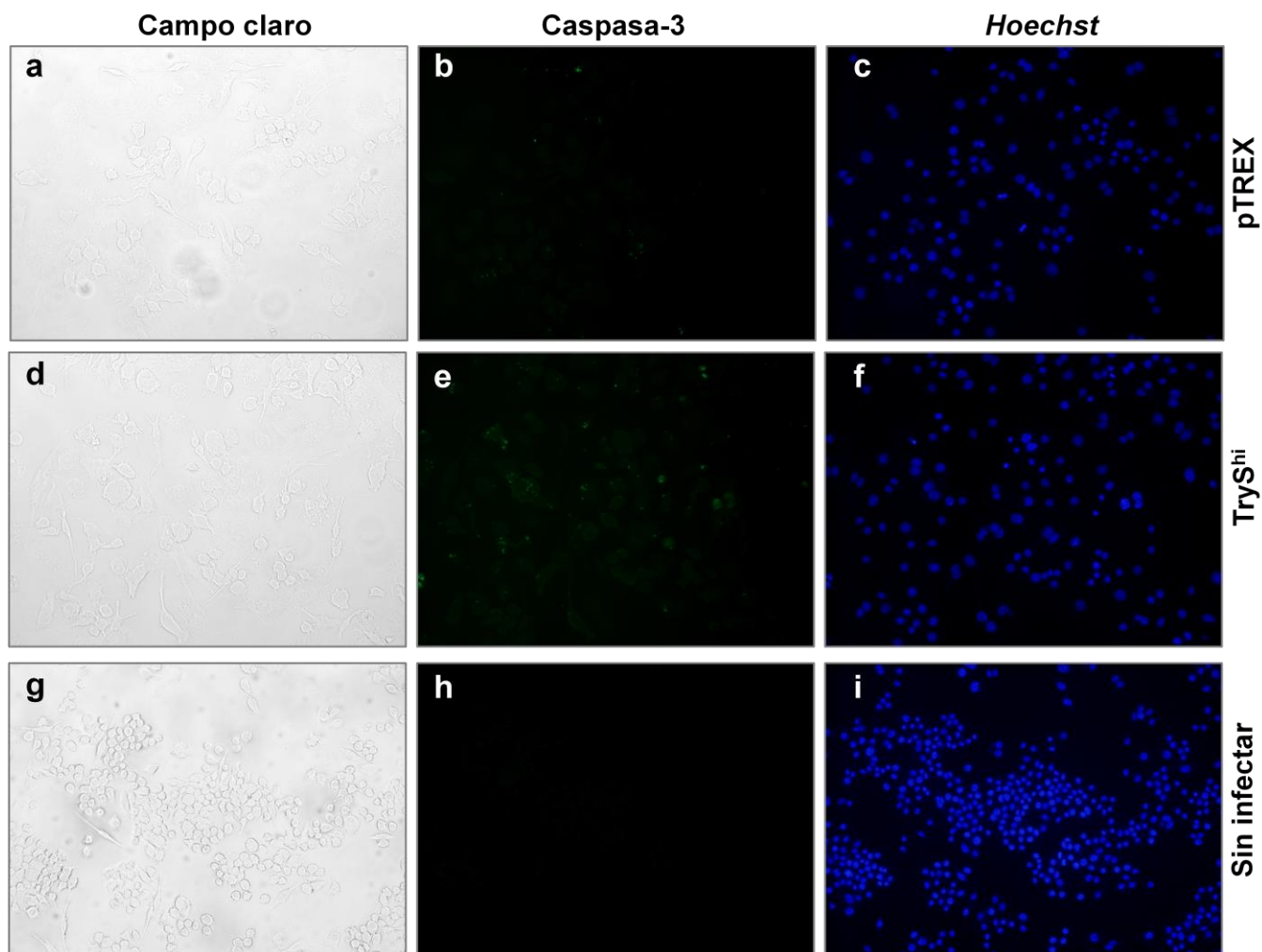


A nivel del ADN, la fragmentación y condensación del ADN genómico constituyen otros indicadores de la apoptosis. Para evaluar la existencia de cambios en la condensación nuclear en respuesta a la infección por TryS<sup>hi</sup> (*versus* pTREX) se tiñó el ADN de los macrófagos infectados y sin

#### 4. Resultados

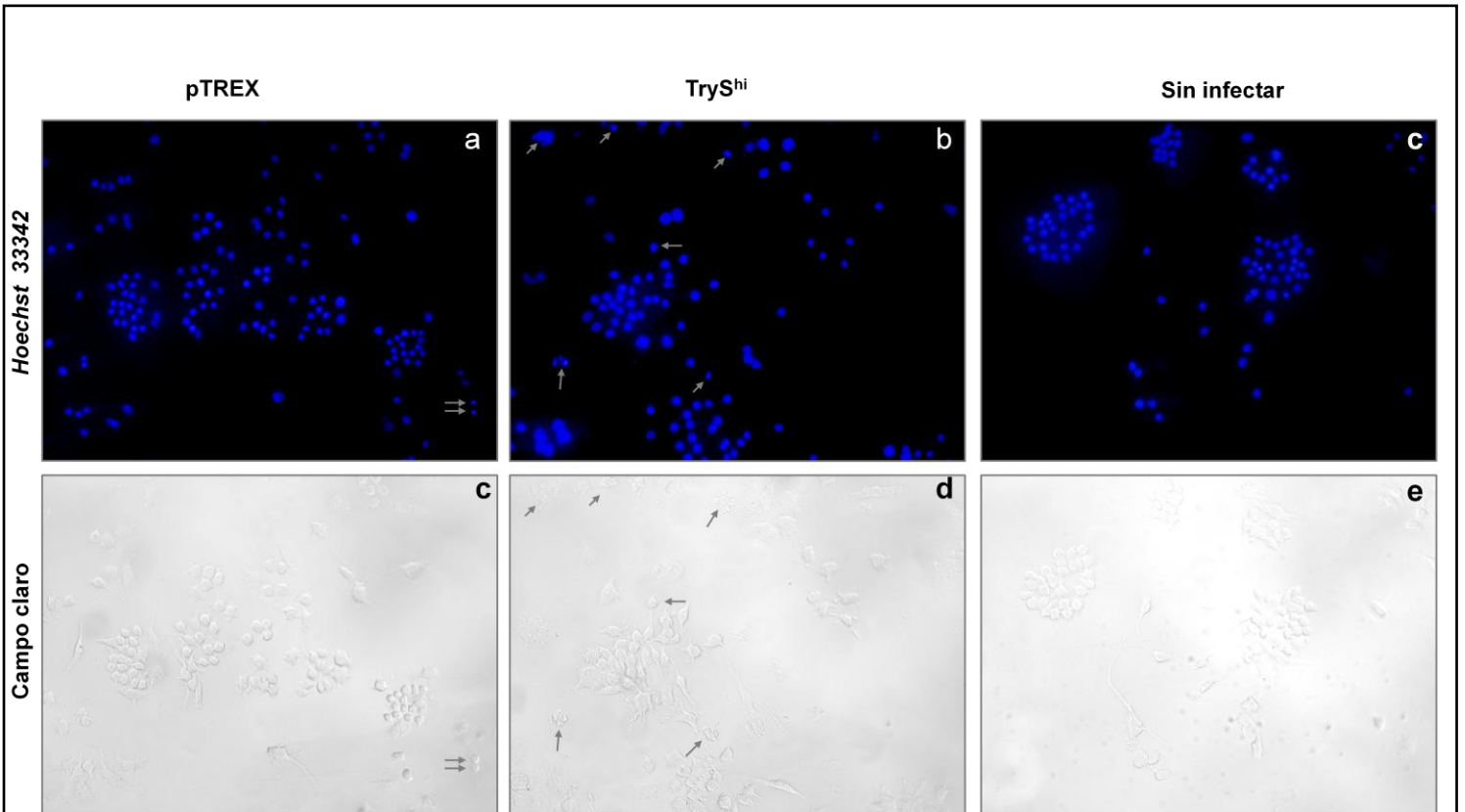
infectar utilizando el colorante de *Hoechst* 33342 y se visualizó luego, a través de microscopía de fluorescencia [175]. Sobre estas imágenes se realizó un recuento total de células por campo utilizando el programa *ImageJ* y luego se contabilizaron aquellos núcleos con un grado evidente de condensación de la cromatina (visualizada en forma de “vesículas nucleares”, “medialunas” o tamaños más pequeños y de mayor intensidad de fluorescencia). Los porcentajes de células con condensación de la cromatina evidenciaron, a las 24 h post-infección, diferencias significativas entre las células infectadas con TryS<sup>hi</sup> y pTREX, de 10.4% y 4.4%, respectivamente (Fig. 28B,  $p < 0.01$ ). Asimismo, el porcentaje observado para pTREX fue similar al de las células sin infectar (4.4% y 3.2%, respectivamente). Y este comportamiento se mantuvo a las 48 h post-infección. En la Figura 30, se presentan imágenes representativas de las células y la condensación nuclear observada luego de los tratamientos (infección con pTREX, TryS<sup>hi</sup> o bien sin infectar).

En conclusión, la observación de un porcentaje mayor de células con actividad caspasa-3 y condensación de la cromatina en macrófagos expuestos a tripomastigotes TryS<sup>hi</sup> (*versus* pTREX) sugiere que la sobre-expresión de TryS puede desencadenar la apoptosis de la célula infectada, y este mecanismo podría ser el responsable de la liberación más temprana de los tripomastigotes al medio de cultivo (Fig. 26). La posibilidad de que el contenido intracelular de poliaminas sea un mecanismo subyacente a la activación de la respuesta apoptótica es una hipótesis que no fue evaluada en el presente trabajo, pero se propone abordar en futuras investigaciones.



**Figura 29: Determinación de la actividad de caspasa-3 en macrófagos expuestos a parásitos sobre-expresantes de TryS**

Se infectaron células RAW 264.7 con tripomastigotes pTRES (a, b, c) o TryS<sup>hi</sup> (d, e, f) durante 3 h en una relación parásitos:célula de 3:1; o bien se incubaron en ausencia de parásitos (control sin infectar) (g, h, i). Luego de 48 h de incubación, las células se fijaron y se trataron con *CellEvent*, un sustrato artificial de caspasa-3 asociado a un fluorocromo que puede visualizarse una vez que el péptido es clivado en forma específica. Posteriormente se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se tiñeron los núcleos con *Hoechst* 33342 para el recuento de células totales por campo, a los fines de normalizar las células positivas para caspasa-3 respecto del número de células totales. Las imágenes son representativas de los resultados observados en cada tratamiento (25X).



**Figura 30: Determinación de la condensación de la cromatina en células RAW 264.7 infectadas con TryS<sup>hi</sup>**

Macrófagos murinos RAW 264.7 se infectaron con tripomastigotes pTREX (**a&c**) o TryS<sup>hi</sup> (**b&d**) durante 3 h. Como control se incluyó la condición de ausencia de parásitos (sin infectar) (**c&e**). Luego de 48 h de incubación, las células se fijaron y se tiñeron con *Hoechst* 33342 para su análisis mediante microscopía de fluorescencia. Las flechas señalan aquellas células con cromatina condensada. Las imágenes presentadas son representativas de los resultados obtenidos en cada tratamiento. La estimación de los porcentajes de células con condensación nuclear se presenta en la Fig. 28B.

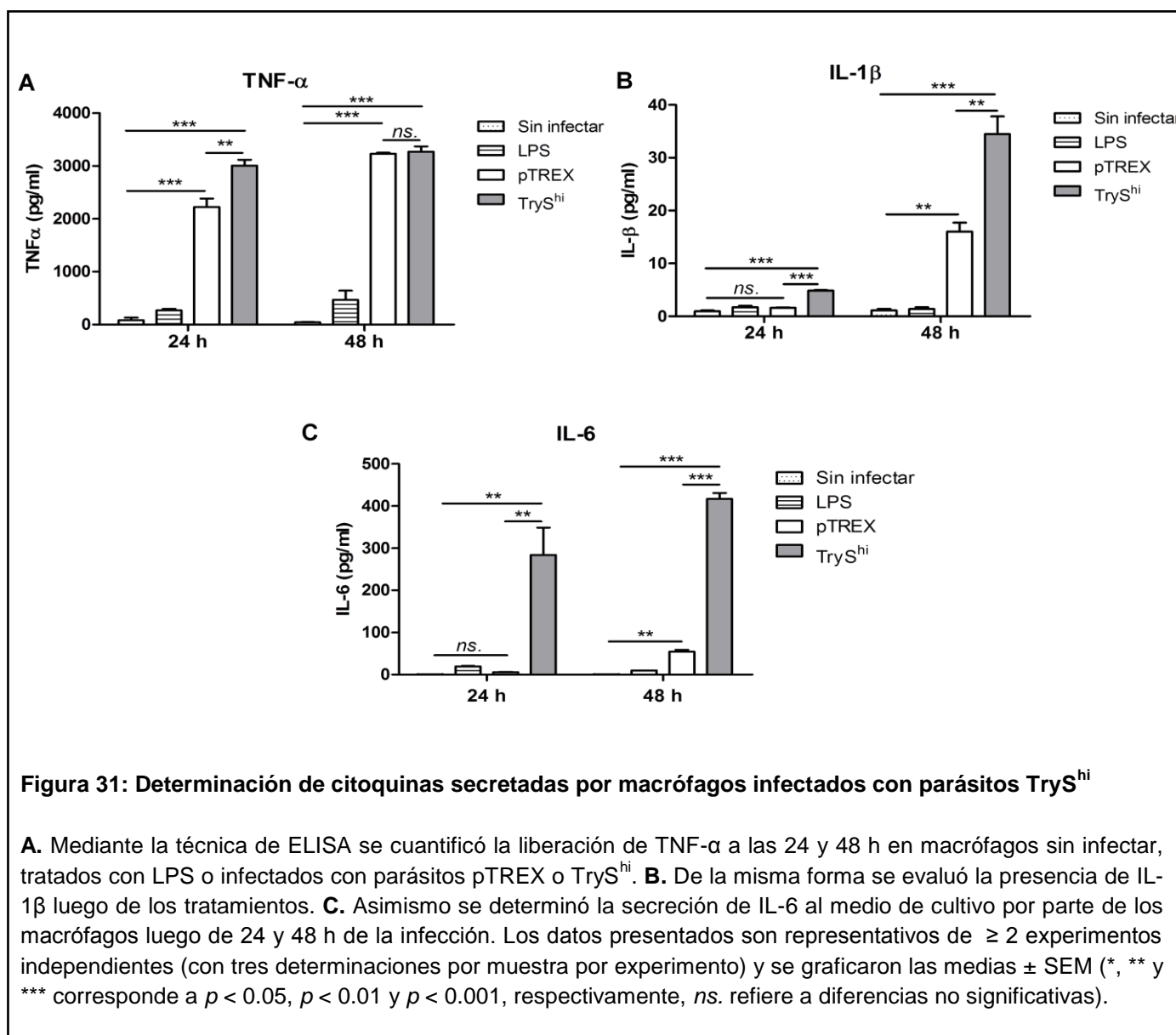
### 4.9. Tripomastigotes sobre-expresantes de TryS activan una respuesta inmune diferencial en macrófagos murinos

De la misma manera que el contenido intracelular de poliaminas podría ser un regulador de funciones celulares tales como la apoptosis, existen otros estudios que sugieren que el contenido intracelular de GSH en el macrófago puede incidir en la diferenciación del mismo hacia un fenotipo M1 o M2 [176,177]. De esta manera, el estado redox una la célula del sistema inmune innato podría influenciar la respuesta adaptativa desarrollada posteriormente.

Para determinar si la exposición de los macrófagos a parásitos TryS<sup>hi</sup> era capaz de inducir una respuesta diferencial, se infectaron células RAW 264.7 con parásitos de una u otra población (TryS<sup>hi</sup> versus pTREX). Luego, se analizó la secreción de citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en el medio de cultivo a las 24 y 48 h post-infección, mediante el método de ELISA. Los resultados mostraron que, aquellas células expuestas a TryS<sup>hi</sup> presentaron una producción 1.35 veces mayor de TNF- $\alpha$  a las 24 h, respecto de las infectadas con tripomastigotes pTREX (Fig. 31A,  $p < 0.01$ ). Mientras que a las 48 h, el efecto de ambas poblaciones parasitarias sobre los macrófagos no evidenció diferencias significativas. Se incluyó la incubación con lipopolisacárido (LPS) bacteriano como control de inducción del perfil M1, a fin de verificar la capacidad de los macrófagos de responder a un estímulo pro-inflamatorio y por lo tanto aumentar los niveles de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 o IL-23. En todos los casos, la inducción generada por el LPS, resultó menor a la observada para la infección por parásitos vivos de *T. cruzi*.

En el caso de IL-1 $\beta$ , se observó nuevamente que el nivel de secreción resultó más de 2 veces mayor a las 48 h post-infección cuando los macrófagos se incubaron en presencia de TryS<sup>hi</sup> (versus pTREX), encontrando una diferencia significativa a partir de las 24 h (Fig. 31B,  $p < 0.001$ ). Finalmente, las mayores diferencias se observaron en los niveles de IL-6 (Fig. 31C), tanto a las 24 h como a las 48

h post-infección ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente), donde el nivel de IL-6 secretado por las células infectadas con parásitos TryS<sup>hi</sup> fue 8 veces mayor al detectado para las células infectadas con pTREX.



Si bien el análisis de tres citoquinas resulta escaso para poder realizar una afirmación concluyente acerca del perfil desarrollado por los macrófagos (M1/M2). Los resultados presentados en la Figura 31 sugieren que la infección con parásitos TryS<sup>hi</sup> *in vitro* promovería una diferenciación hacia el perfil M1, debido a los aumentos observados en las citoquinas pro-inflamatorias evaluadas. Funcionalmente, los macrófagos del tipo M1 participan de la remoción de patógenos durante la infección a través de la activación del sistema NADPH oxidasa y una concomitante mayor generación de ROS. Las ROS generadas en el marco del estallido respiratorio son un elemento clave del sistema inmunológico para eliminar patógenos y controlar su dispersión. Sin embargo, existen evidencias de que las especies reactivas también pueden ser capitalizadas por el parásito, observándose que un aumento de ROS resulta ser beneficioso para la proliferación de parásitos tanto en modelo animal [178], como en el contexto del insecto vector [64,65,179]. La posibilidad de que linajes virulentos de *T. cruzi*, con una mayor expresión de TryS [155,168], utilicen esta enzima para *desregular* o modular la respuesta innata como un mecanismo de patogenicidad, así como también la relación que este comportamiento pudiera tener con el contenido de GSH intracelular, deberá ser evaluada en investigaciones futuras.



## **5.DISCUSIÓN**

A lo largo de este trabajo, se describió la generación de parásitos recombinantes mediante la inserción de una copia extra del gen *trys* en *T. cruzi*. A partir de esta estrategia, se intentó dilucidar el rol que cumple la enzima TryS en el marco de la biología celular de este parásito. Los parásitos sobre-expresantes generados, mencionados como TryS<sup>hi</sup> a lo largo del texto, fueron evaluados rigurosamente a nivel del ADN y de proteína (expresión y actividad enzimática). El estudio se llevó a cabo en dos estadios del desarrollo del parásito: el de epimastigote, replicativo y no infectivo, y el de tripomastigote, no replicativo e infectivo. Asimismo, como parte del sistema de trabajo, se desarrollaron anticuerpos a partir de un péptido N-terminal inmunogénico en conejo y de la proteína recombinante en su forma completa en ratón.

Los clones TryS<sup>hi</sup> presentaron mayores niveles de expresión de la proteína en ambos estadios parasitarios analizados, respecto del control pTREX, correspondiente a los parásitos transfectados con el plásmido vacío. Particularmente, el aumento en la expresión de esta enzima se hizo evidente en el estadio de tripomastigote (derivados de cultivo celular). Este aumento observado del nivel de TryS, se correlacionó con un aumento en la síntesis de T[SH]<sub>2</sub>, a partir de los sustratos espermidina, GSH y ATP [90,143].

TryS es una enzima fundamental en los sistemas de defensa antioxidante de los tripanosomátidos y debido a que constituye una proteína específica de los kinetoplástidos, fue propuesta como un blanco promisorio para el desarrollo racional de nuevos agentes farmacológicos y el reposicionamiento de drogas [47,50,116,119,125]. Por estos motivos, ha sido ampliamente estudiada, principalmente en otros organismos de la familia *Trypanosomatidae* tales como *T. brucei* y el género *Leishmania*, gracias a la posibilidad de utilizar diferentes herramientas moleculares. En estos organismos, en parte, pudo determinarse el rol de TryS sobre la proliferación y resistencia a estrés oxidativo [95,125,180]. Sin embargo para *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, el rol de TryS no había podido ser completamente delineado. El presente trabajo de Tesis, es el primero

en el cual se utilizaron herramientas de sobre-expresión e inhibidores específicos para poner de manifiesto la importancia biológica de TryS para *T. cruzi*.

Los resultados aquí presentados, mostraron que la sobre-expresión de TryS se tradujo en un aumento en la proliferación de epimastigotes y que su actividad es necesaria para la supervivencia del parásito tanto en condiciones fisiológicas de cultivo, como en condiciones de estrés oxidativo proporcionado por dos fuentes alternativas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cadmio. Asimismo, el aumento de la expresión de TryS representó para el parásito, una ventaja en la resistencia frente a las drogas parasiticidas actualmente utilizadas, en epimastigotes y en tripomastigotes, siendo este último el estadio parasitario infectivo de importancia clínica. La estimación de las IC<sub>50</sub> para los clones TryS<sup>hi</sup> y pTREX frente a BZ y NFX, se completó también mediante el uso de inhibidores específicos de TryS [139]. En este caso, el tratamiento de los parásitos con inhibidores (KuOrb39 y Ku Orb54), llevó a un aumento de la eficacia de las drogas BZ y NFX. A partir de nuestros datos, proponemos que los inhibidores de TryS podrían proporcionar una terapia adyuvante combinada con la administración de BZ o NFX. Y de esta manera, podría ser posible disminuir las dosis actualmente utilizadas, que son asociadas a serios efectos adversos [28,36,38] que dificultan la adhesión al tratamiento.

### 5.1. La enzima TryS es esencial para el metabolismo de *T. cruzi*

A lo largo de este proyecto, se utilizaron paulonas, derivadas de las benzazepinas (7,12-dihidroindol [3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-onas) como inhibidores específicos de TryS. Estos compuestos, fueron modificados por Orban y colaboradores para desarrollar derivados con actividad inhibitoria sobre TryS. Para la evaluación de estos compuestos, este grupo de trabajo analizó la capacidad de inhibición de estos compuestos sobre la enzima TryS recombinante de *T. brucei* y *T. cruzi* [139]. En esta Tesis doctoral, se evaluaron sólo dos de aquellas moléculas: KuOrb39 y KuOrb54,

mencionadas en la publicación original como 3d y 3h, respectivamente [139]. Estos compuestos fueron testeados por primera vez contra *T. cruzi* en el presente trabajo y ambos presentaron un efecto citotóxico efectivo tanto sobre la fase replicativa como la fase infectiva del parásito. Sin embargo, el compuesto KuOrb39 resultó ser más efectivo para la inhibición en el estadio de epimastigote, mientras que KuOrb54 lo fue para la forma de tripomastigote (Fig. 19). Cabe destacar que el valor de  $IC_{50}$  observado en nuestros experimentos para KuOrb54 ( $\sim 10 \mu\text{M}$ ) contra *T. cruzi*, resultó similar al obtenido para la inhibición al 50% de la proteína recombinante de este organismo [139]. El mayor efecto observado para las paulonas sobre los tripomastigotes, podría deberse a dos razones: por un lado, el carácter no replicativo de este estadio, y por el otro, la mayor expresión endógena de TryS descrita para esta forma parasitaria, que le conferirían una mayor sensibilidad a su inhibición. Igualmente, no es posible descartar que, la baja eficacia observada sobre los epimastigotes también pueda relacionarse con diferencias en la incorporación de la droga al interior de la célula o a su biodisponibilidad en el organismo patógeno. A pesar de estas diferencias observadas entre los compuestos y su efecto sobre diferentes estadios, KuOrb54 mostró una potente actividad tripanocida sobre los tripomastigotes, en concentraciones menores (50% y 75% de muerte celular en  $10 \mu\text{M}$  y  $30 \mu\text{M}$ , respectivamente) a las observadas para BZ ( $IC_{50}=69 \mu\text{M}$ , Fig. 24CyD). Aunque respecto del NFX ( $IC_{50} = 2 \mu\text{M}$ , Fig. 23CyD), se requerirían concentraciones mayores para lograr un efecto citotóxico similar.

La inhibición farmacológica de TryS como abordaje nos permitió determinar la importancia de esta enzima para la supervivencia del parásito tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones de estrés oxidativo, en ambos estadios estudiados (epimastigote y tripomastigote). Nuestros resultados sugieren que, de la misma manera que lo descrito para *T. brucei* y *Leishmania sp.*, TryS constituye una enzima esencial para *T. cruzi*. Así, se posiciona, sin lugar a dudas, a esta enzima como un excelente blanco molecular para el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de la EdC.

## 5.2. Efecto del sistema TryS/T[SH]<sub>2</sub> en la proliferación y metaciclogénesis

La red antioxidante de *T. cruzi* constituye un sistema robusto, compartimentalizado e interconectado con otras vías metabólicas, ya sea mediante interacciones directas de sus enzimas [106,107,113] o por medio de las ROS como moléculas mensajeras [111,181,182]. Se trata, en verdad, de una red flexible y diversa, que presenta a su vez diferencias en cada estadio de desarrollo del parásito. En el contexto del epimastigote, la forma replicativa capaz de ingresar en el proceso de metaciclogénesis, el T[SH]<sub>2</sub> no sería la principal molécula antioxidante. Arribamos a esta conclusión, en base al hallazgo en este estadio de una menor expresión tanto de TryS (Fig. 14A), como de otras enzimas asociadas a la utilización de T[SH]<sub>2</sub> del sistema antioxidante (*versus* estadios infectivos) [155,156,168]. Asimismo, aun en nuestras condiciones experimentales para esta fase, la sobre-expresión no resultó ser suficiente para generar un aumento en la reserva de T[SH]<sub>2</sub> (Fig. 15B). Por otro lado, el nivel de GSH en este estadio resultó ser >2.5 veces mayor que el observado en la forma infectiva del parásito (Fig. 15C). Todas estas observaciones serían consistentes también con la presencia de mayores niveles de ovotiol A como un antioxidante alternativo en este estadio, reportada en otros trabajos [98]. Los valores de T[SH]<sub>2</sub> hallados en el epimastigote (Fig. 15B), también podrían relacionarse con la posibilidad de que existan otros pasos catalíticos limitantes que afecten la síntesis del antioxidante, como podría ser un mayor requerimiento de otros componentes del sistema tales como los transportadores de poliaminas, un sustrato necesario para la síntesis de T[SH]<sub>2</sub> [183].

Sin embargo, y a pesar de que GSH sería el principal tiol de bajo peso molecular utilizado por el epimastigote, nuestros resultados mostraron que tanto la supervivencia como la división celular son procesos dependientes del sistema TryS/T[SH]<sub>2</sub> (Fig. 16-19). La ventaja observada a nivel de la proliferación en los epimastigotes sobre-expresantes podría deberse a una relación entre el T[SH]<sub>2</sub> reducido y la síntesis de precursores para la replicación y reparación del ADN, tal como fue descrito

para *T. brucei*. En este organismo, como se comentó previamente en los Antecedentes, el T[SH]<sub>2</sub> reducido es capaz de transferir equivalentes de reducción hacia la ribonucleótido reductasa, en un mecanismo mediado por la triparredoxina [95]. Asimismo, es posible que este fenómeno esté relacionado con la replicación del ADNk. La replicación del ADN de minicírculos es un mecanismo dependiente del factor de transcripción UMSBP, caracterizado inicialmente en *Crithidia fasciculata* [184], y más recientemente en *T. cruzi* [132]. Estudios recientes demostraron que la oligomerización y afinidad de la UMSBP por su sitio de unión en el ADNk es sensible al potencial redox en *C. fasciculata* y *L. donovani* [133,134], de modo tal que el estado reducido de la proteína UMSBP activaría su unión al ADN, mientras que su oxidación impediría su función como factor de transcripción. Este mecanismo sería gobernado a través de enzimas del sistema antioxidante, TXN-II y mTXNPx en *C. fasciculata* [136]. Este dispositivo de control no fue demostrado en *T. cruzi* pero sería posible que enzimas de la red antioxidante puedan modular la afinidad de la UMSBP, a partir de los equivalentes de reducción provenientes del T[SH]<sub>2</sub>.

Es interesante destacar, que la mayor tasa de proliferación fue particularmente notoria en las fases tardías de la curva de crecimiento, cuando en el medio de cultivo tiene lugar un cambio en la relación de nutrientes y productos metabólicos generados (Fig. 16). El cambio en las condiciones del medio, tales como la menor disponibilidad de nutrientes o alteración del pH, es capaz de disparar la metacicloogénesis en el tubo digestivo del insecto vector [185,186], y una situación análoga tiene lugar en el contexto del cultivo axénico envejecido de epimastigotes. Es decir que, sería válido especular que un aumento de expresión de TryS *in vivo* podría ser un factor beneficioso para el patógeno para lograr un mayor número de epimastigotes capaces de entrar luego en el proceso de diferenciación, estableciendo un mayor inóculo infectivo.

Además, está descripto que durante la metacicloogénesis se produce un aumento del nivel de expresión de enzimas del sistema antioxidante [156,157]. De hecho, nuestros resultados evidenciaron que los parásitos TryS<sup>hi</sup> exhibieron un mayor porcentaje de diferenciación hacia la forma infectiva,

luego de inducir este proceso mediante el agregado de homogenado intestinal de *T. infestans* al medio de cultivo (Fig. 20). De modo que, la presencia de altos niveles de expresión de TryS, podría predisponer a los epimastigotes a entrar en metaciclogénesis, una vez recibido el estímulo ambiental necesario.

En el caso de los amastigotes, el otro estadio replicativo de *T. cruzi*, la sobre-expresión de TryS no se vio reflejada en una mayor proliferación dentro de la célula hospedadora (Fig. 25B), por lo que los hallazgos no fueron consistentes con lo observado en los epimastigotes. De acuerdo al recuento de parásitos intracelulares realizado a diferentes tiempos, se observó que los clones TryS<sup>hi</sup> resultaron menos proliferativos en este ambiente *in vitro*, respecto de los clones control pTREX, transfectados con el vector vacío. Esto podría significar que los mecanismos capaces de iniciar la replicación no serían los mismos en uno y otro estadio proliferativo, o bien que durante esta fase el parásito resulte más sensible al desbalance que le pudiera generar el sistema de sobre-expresión. Es conocido que pTREX es un vector que permite alcanzar altos niveles de expresión [151] y nuestros resultados demostraron que la enzima TryS sobre-expresada es una enzima activa (Fig. 15), por lo que podría generar un mayor consumo de ATP, GSH y espermidina en la forma intracelular. Por todo ello, un mayor gasto de energía o de estos importantes metabolitos celulares podría afectar otras vías metabólicas requeridas para la mitosis de los amastigotes.

### 5.3. Participación de la enzima TryS en la resistencia a estrés oxidativo

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* se enfrenta a múltiples fuentes de estrés oxidativo. Dentro del insecto vector, está expuesto a grandes cantidades de hemo, derivado del procesamiento de la hemoglobina, principal proteína presente en la sangre [187]. También, debe sobrevivir a la respuesta humoral y celular del sistema inmunológico del vector, activado en respuesta a la presencia del

parásito, que es reconocida a través de sus patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [59]. Enzimas como la NOS [188], DUOX y NOX contribuyen a la generación de  $O_2^{\bullet-}$ , que luego puede dismutar en  $H_2O_2$  o reaccionar con NO para producir  $ONOO^-$  [59]. También la profenoloxidasas (pPO) presente en los hemocitos de algunos invertebrados, incluyendo triatominos, se activa hacia la forma fenoloxidasas en respuesta a la infección [189]. Todo este contexto, demuestra que aún incluso dentro del vector, *T. cruzi* debe enfrentar una respuesta inmune y un ambiente oxidante que constituyen una importante condición de estrés [61–63].

Para el caso de los epimastigotes, una de las formas parasitaria presentes en el insecto, la sobre-expresión de TryS le confirió una tolerancia 1.7 y 6 veces mayor a los parásitos TryS<sup>hi</sup> frente a  $H_2O_2$  y cadmio ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 21-22). Como se describió en la sección de Resultados, el cadmio se utilizó como fuente alternativa de estrés oxidativo, debido a su capacidad de depletar a la célula de antioxidantes tiólicos [162,163]. Estos resultados, sugieren que si bien la dupla TryS/T[SH]<sub>2</sub> no es el principal mecanismo antioxidante en este estadio, como se discutió previamente, la mayor expresión de TryS se tradujo igualmente en un incremento significativo en la tolerancia al estrés de esta fase parasitaria.

Ahora bien, en el estadio de tripomastigote, el parásito debe sobrevivir en el medio extracelular el tiempo suficiente, hasta alcanzar una nueva célula para invadir. El macrófago es una de las células blanco que *T. cruzi* debe superar como una de las primeras barreras de defensa impuestas por el hospedador vertebrado en su camino para establecer la infección [49,69,70]. En el interior del macrófago, el tripomastigote se enfrenta a un mecanismo microbicida denominado “estallido respiratorio”, por la gran producción de especies derivadas del oxígeno y del nitrógeno. Es probable que la mayor expresión de TryS y el contenido elevado de T[SH]<sub>2</sub> en este estadio (Fig. 15B) sean una respuesta a esta condición [155]. Además, el T[SH]<sub>2</sub> ha sido descrito como una molécula fundamental para el metabolismo de hidroperóxidos en este patógeno [190], por lo que es esperable que una mayor expresión de TryS, confiera tanto a epimastigotes como a tripomastigotes de una



mayor capacidad para detoxificar el  $H_2O_2$ , un ubicuo oxidante fisiológico producido por el macrófago. En este sentido, en este trabajo se reportó, una diferencia en la tolerancia de los tripomastigotes TryS<sup>hi</sup>, respecto de los tripomastigotes pTREX frente a  $H_2O_2$  ( $IC_{50}$  de 87.8  $\mu M$  versus 64.6  $\mu M$ , respectivamente,  $p < 0.001$ , Fig. 21). Esta diferencia pequeña aunque significativa, podría deberse al hecho de que existan otros pasos limitantes, *rio abajo (downstream)* a la síntesis de T[SH]<sub>2</sub>, en la neutralización del peróxido de hidrógeno y reparación de los daños producidos, mencionados a continuación.

Algunos estudios metabólicos realizados en *T. cruzi*, mostraron que además de la propia TryS, la GshA (primera enzima en la vía de síntesis del GSH), y la TXN constituyen pasos limitantes dentro de la red detoxificante [191]. A su vez, el T[SH]<sub>2</sub> es mantenido en su estado reducido por la TR, una flavoenzima dependiente de NADPH [115]. Así, en esta forma reducida, puede transferirle electrones a la TXN, otra enzima clave dentro de la red antioxidante, por ser una oxidoreductasa capaz de reducir una gran variedad de blancos, entre ellos diferentes enzimas peroxidasas [48]. Es decir que, a pesar de que los tripomastigotes TryS<sup>hi</sup> tengan un mayor contenido de TryS/T[SH]<sub>2</sub>, otros pasos enzimáticos pueden limitar el efecto de un mayor contenido antioxidante.

### 5.4. La actividad de TryS confiere resistencia a las drogas de tratamiento actuales benznidazol y nifurtimox

Acorde a los descrito en los Antecedentes y en la sección de Resultados, el mecanismo de acción de las drogas anti-parasitarias actualmente utilizadas para el tratamiento de la EdC implica la depleción de tioles de bajo peso molecular en el patógeno [41,43,167]. La participación del T[SH]<sub>2</sub>, en la neutralización de drogas con un grupo nitro se ha demostrado anteriormente en diferentes especies de tripanosomátidos. En *T. brucei*, empleando estrategias de ARNi, se observó que la disminución de

la expresión de TryS se asoció a una mayor sensibilidad frente a la acción de NFX [118]. Por su parte, ensayos de tratamiento para *T. cruzi*, utilizando butionina sulfoximina, compuesto inhibidor de la enzima GshA, potenciaron el efecto tóxico de NFX y BZ *in vivo* e *in vitro* ([93] y datos sin publicar del Dr. Comini).

Los epimastigotes sobre-expresantes TryS<sup>hi</sup> presentaron una tolerancia ~5 veces mayor a la obtenida para los clones pTREX frente a la exposición a concentraciones crecientes de BZ ( $p < 0.001$ , Fig. 24A&B). Mientras que en los tripomastigotes derivados de cultivo celular TryS<sup>hi</sup> se observó una resistencia  $\geq 1.7$  veces mayor, respecto de los clones pTREX, frente a este compuesto ( $p < 0.001$ , Fig. 24C&D). La participación de TryS en la detoxificación fue particularmente notable para el NFX, en este caso el valor de IC<sub>50</sub> estimado para tripomastigotes TryS<sup>hi</sup> fue ~7.5 veces mayor al observado para los parásitos pTREX ( $p < 0.001$ ). Y por otra parte, la inhibición farmacológica de TryS logró aumentar la sensibilidad de los parásitos frente a NFX y BZ (Fig. 23-24).

Nuestros resultados, apoyaron todas las evidencias citadas sobre implicancia del sistema TryS/T[SH]<sub>2</sub> en el manejo del estrés producido por BZ y NFX sobre *T. cruzi*. Asimismo, nuestros resultados en conjunto, sugieren que *trys* podría constituir un gen asociado a la resistencia frente a los fármacos de primera línea administrados para el control de la EdC aguda. Por lo tanto, la sobre-expresión endógena de TryS, observada en algunas cepas virulentas [155], podría relacionarse con casos de falla terapéutica.

### 5.5. La participación de TryS en la interacción patógeno-hospedador

A fin de evaluar la participación de TryS en la interacción parásito-hospedador, se realizaron ensayos de infección *in vitro* e *in vivo*, utilizando como modelo a las células RAW 264.7 y ratones C57bl/6, respectivamente. La primera observación que surgió al comparar los resultados obtenidos *in vitro* para los clones TryS<sup>hi</sup> y pTREX, es que tanto la capacidad de infección como la de replicación, en el contexto de las células RAW 264.7, se vio afectada en los parásitos sobre-expresantes TryS<sup>hi</sup>. Esto se reflejó en un menor porcentaje de células infectadas y una menor relación parásitos/célula a lo largo de todos los experimentos *in vitro* (Fig. 25) que se correlacionó a su vez, con la menor carga parasitaria observada en músculo esquelético de ratones infectados con TryS<sup>hi</sup> (Fig. 27A), mientras que en los otros tejidos analizados las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Proponemos como una posible explicación para estas observaciones, que TryS<sup>hi</sup> estaría experimentando un desbalance metabólico producto de la sobre-expresión utilizada como herramienta molecular para la caracterización de esta enzima. Si este fuera el caso, este inconveniente podría remediarse mediante la utilización de un vector inducible, como pTcINDEX [192], que permitiría un mayor control sobre los niveles de expresión sin afectar otras funciones del parásito. De todas formas, la utilización de este tipo de vectores implica la utilización de una segunda droga para el mantenimiento y regulación de los parásitos recombinantes, lo que a su vez podría representar también un factor adicional de estrés para *T. cruzi*.

Sin embargo, y a pesar de la menor capacidad replicativa de los amastigotes TryS<sup>hi</sup>, fue destacable que la segunda generación de tripomastigotes fue liberada al medio de cultivo más tempranamente respecto de lo observado para los clones pTREX. Este resultado es sumamente relevante, ya que si este comportamiento también tuviera lugar durante la infección en el modelo animal, podría representar un mecanismo de patogenicidad que permitiera una diseminación más rápida del patógeno en el organismo infectado. Sin embargo, a partir del análisis de las parasitemias (obtenidas por qPCR, Fig. 27C) en los experimentos realizados en modelo murino, no se logró apoyar la existencia de este mecanismo. No obstante, no es posible descartarlo, ya que consideramos que

nuestra imposibilidad de validar esta hipótesis pudo responder al tiempo de toma de muestra para evaluar la carga parasitaria. Aún cabría la posibilidad de visualizar este fenómeno, si efectivamente tuviera lugar, realizando parasitemias a tiempos más cortos (<10 DPI) y/o con inóculos infectivos menores.

### 5.5.1. Efecto de la infección con parásitos sobre-expresantes de TryS sobre la apoptosis de los macrófagos

Conjuntamente con el temprano egreso de los tripomastigotes TryS<sup>hi</sup> de las células infectadas, se observó un incremento significativo de marcadores evidenciando un proceso de apoptosis en las células expuestas a esta población de parásitos (Fig. 28). Entre los evaluados, la condensación de la cromatina, constituye un rasgo morfológico y temprano de la respuesta apoptótica que se cuantificó mediante microscopía de fluorescencia, a través de una molécula de unión al ADN tal como el *Hoechst* 33342 [175]. Mientras que la caspasa-3, el otro parámetro determinado en este trabajo, es una enzima ejecutora y específica de la apoptosis, y que resulta común a las vías intrínseca y extrínseca de señalización [193]. Para ambos marcadores, nuestros resultados evidenciaron un mayor porcentaje de células positivas (RAW 264.7) luego de su exposición con los clones sobre-expresantes (Fig. 28).

La apoptosis es un importante mecanismo efector del sistema inmune innato y adaptativo en respuesta al patógeno [194], así como también en el mantenimiento de la homeostasis de órganos y tejidos. Se sabe que patógenos de diferente naturaleza –virus, bacterias o parásitos– utilizan la modulación positiva o negativa de este mecanismo en su favor [195–198]. Incluso se ha observado en patógenos intracelulares, que un mismo organismo puede utilizar diferentes estrategias para desencadenar la muerte de la célula hospedadora de acuerdo a su estadio en el ciclo de vida y condiciones ambientales [197]. En el caso particular de *T. cruzi*, existen también evidencias de la

inducción de la respuesta apoptótica en neutrófilos por parte de algunas cepas [199], y de la inhibición de la transcripción de genes pro-apoptóticos en fibroblastos [200] como posible mecanismo de persistencia parasitaria. Mientras que otras líneas de evidencias sugieren que la inducción o no de la apoptosis dependería del tipo celular. Así por ejemplo, los fibroblastos se postularon como refractarios a este proceso, los miocardiocitos sufrirían una apoptosis moderada y los macrófagos serían altamente sensibles a la inducción de la apoptosis por parte del parásito [201]. A partir de estos resultados, postulamos que una mayor expresión y/o actividad de TryS podría desencadenar la respuesta apoptótica en macrófagos y que la rápida liberación de tripomastigotes al medio extracelular, podría ser un modo rápido de diseminación silenciosa en las primeras etapas de infección.

El mecanismo subyacente a la generación de la apoptosis es un punto que queda todavía por ser dilucidado. Es posible que un menor contenido de poliaminas en el citoplasma de la célula hospedadora, producto del mayor consumo por parte del parásito, pueda estimular la respuesta de muerte celular [171–173]. Esta respuesta podría ser impulsada por la enzima TryS *per se* o bien involucrar otros factores solubles capaces de actuar en *trans* como intermediarios. Ya que, el porcentaje de células apoptóticas de acuerdo al marcador caspasa-3 (~15%, Fig.28A) resultó mayor al de células infectadas por TryS<sup>hi</sup> (~10%, Fig. 25A), es posible especular con la existencia de algún factor intermediario secretado capaz de desencadenar esta respuesta. Sin embargo, el análisis de correlación entre células infectadas y células apoptóticas, no fue realizado en este trabajo. Son muchas las preguntas aún por responder en próximos experimentos.

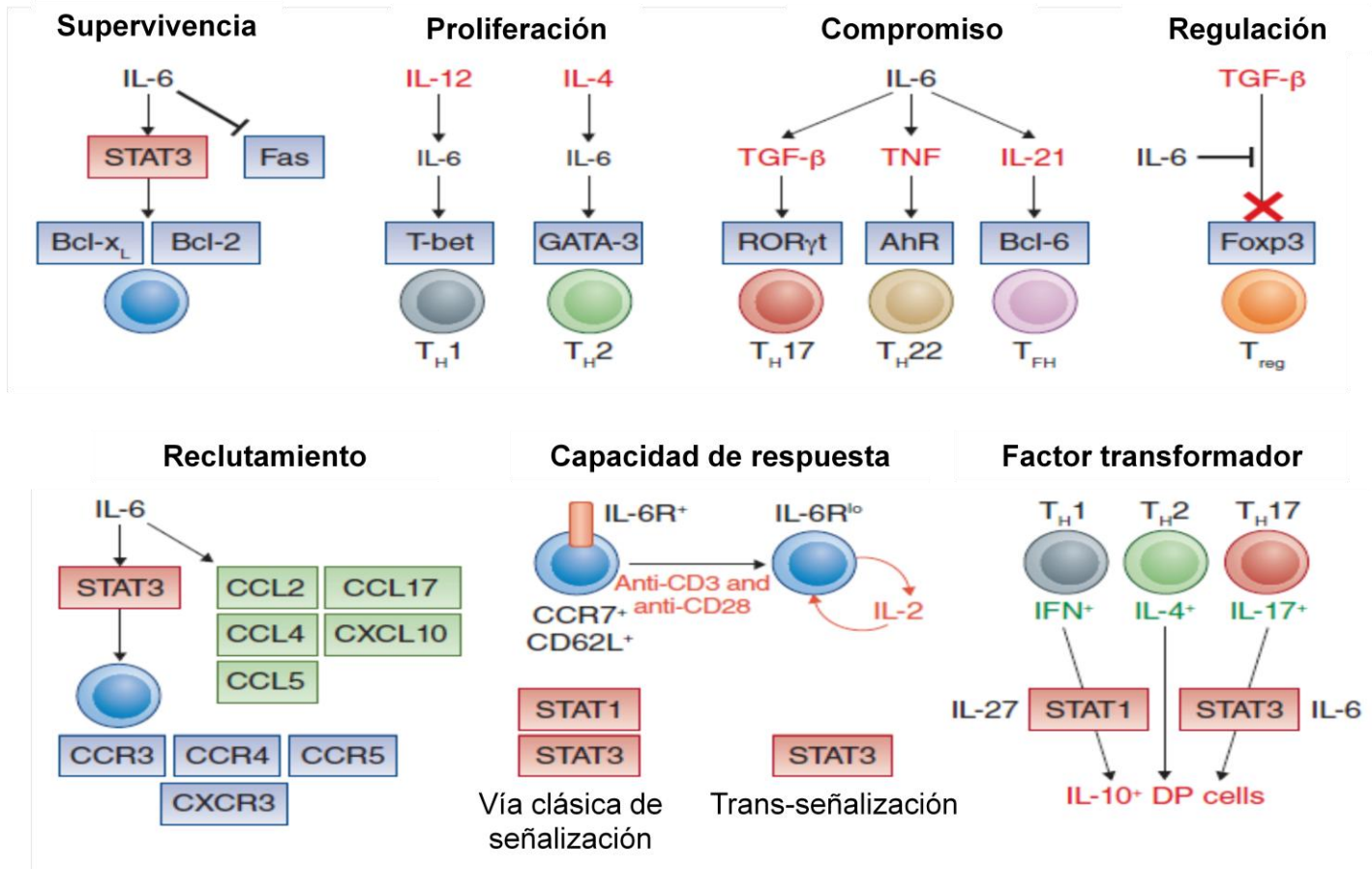
### 5.5.2. Macrófagos infectados con parásitos TryS<sup>hi</sup> presentaron un perfil diferencial de citoquinas

Por otra parte, nuestros resultados revelaron que los macrófagos incubados con tripomastigotes TryS<sup>hi</sup>, liberaron mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6,

al medio de cultivo (Fig. 31). Esta observación fue particularmente llamativa para el caso de IL-6. Esta última es una citoquina de efecto pleiotrópico, que juega un rol tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. Incluso se ha propuesto que podría tener una función similar a la de una hormona sobre procesos homeostáticos [202]. La señalización de esta citoquina puede tener lugar en una forma clásica, es decir a través de su receptor IL-6R o mediante *trans*-señalización a través de un receptor soluble, que una vez unido al ligando, puede interactuar con el receptor de membrana gp130 [203]. En la actualidad, existen diferentes tratamientos para enfermedades inflamatorias basados en el bloqueo del receptor IL-6R mediante anticuerpos, tal como Tocilizumab (utilizado para la artritis reumatoidea) [204]. Es conocido también, que la señalización producida por una citoquina es un fenómeno que depende de la co-expresión de otras. Debido a esto, IL-6 puede asociarse a una multiplicidad de efectos diferentes. Dependiendo del entorno de citoquinas, IL-6 puede promover la expansión de células  $T_H1$  o  $T_H2$  o bien definir el compromiso hacia perfiles tipo  $T_H17$ ,  $T_H22$  o  $T_{FH}$  (Fig. 33, tomada de [202]). Como un ejemplo de esto, se sabe que la administración de IL-6 en combinación con TGF- $\beta$  lleva a las células no comprometidas a diferenciarse a un fenotipo  $T_H17$  [205], caracterizado por la producción de IL-17. Las células  $T_H17$  se relacionan con el reclutamiento de neutrófilos, resultando relevantes en la patogenicidad de diferentes enfermedades inflamatorias. Sin embargo, IL-6 también promueve la producción de IL-10 por parte de las células T, y esto llevaría al proceso antagónico, es decir a restringir procesos inflamatorios [206,207], poniendo de manifiesto el rol multifuncional que esta citoquina puede tomar en la respuesta inmunológica. En conclusión, para poder formular alguna hipótesis acerca de las consecuencias del aumento exacerbado de la producción de IL-6 en los macrófagos infectados con TryS<sup>hi</sup>, sería necesario tener una caracterización amplia del perfil de citoquinas co-expresadas en nuestras condiciones experimentales. No obstante, sí sería posible especular que, un aumento de la expresión de esta enzima antioxidante *in vivo*, podría directa o indirectamente conllevar a la modificación del perfil de la respuesta T, a través de la modulación del perfil de citoquinas expresado por el macrófago infectado. Mientras que el aumento en

la producción de citoquinas tales como TNF- $\alpha$  podría relacionarse con la mayor proporción de células apoptóticas observada entre los macrófagos infectados con TryS<sup>hi</sup> [208–210].

Además, existe evidencia acerca del rol que tendría el sistema inmune innato sobre el tipo de respuesta desarrollada por el sistema inmune adaptativo, y este paradigma fue propuesto en base a la presencia de heterogeneidad funcional de macrófagos [211,212]. Como se describió previamente en la sección de Resultados, existen pruebas que sugieren que el contenido intracelular de GSH podría modular el perfil desarrollado por el macrófago (M1/M2) [176]. En este sentido, Murata y colaboradores propusieron una discriminación funcional entre macrófagos de tipo reductores, con un alto contenido de GSH, y macrófagos oxidativos, con bajos niveles de GSH intracelular. Asimismo sugirieron que, el balance entre una respuesta de tipo T<sub>H</sub>1 o T<sub>H</sub>2 estaría dado parcialmente por la relación entre estos dos tipos de macrófagos, y mediado por la producción de IL-12, o bien IL-10 e IL-6 [177]. En base a esto, la modulación del contenido de GSH dentro una célula del sistema innato podría determinar el éxito de la respuesta adaptativa desarrollada. La presencia de una modificación en el contenido intracelular de GSH en el macrófago en respuesta a la infección con TryS<sup>hi</sup> no ha sido evaluada aún, pero está propuesta para futuros experimentos junto a la determinación de si tal condición conllevaría a un aumento en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias.



Tomado de Hunter *et al*, 2015

**Figura 32: Efecto de IL-6 sobre las células T**

IL-6 gobierna la proliferación, la supervivencia y el compromiso de las células T, modulando la producción de citoquinas efectoras que ellas producen. Esta citoquina cumple un importante rol en el mantenimiento de células T, mediante la regulación de la proliferación y supervivencia de células T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2, y también resulta crítica para el desarrollo de poblaciones efectoras tipo T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>22, T<sub>FH</sub> o la inhibición de la población regulatoria T<sub>reg</sub>. Asimismo, IL-6 controla la infiltración de células T, i) regulando la expresión de receptores de quemoquinas y ii) a través de la *trans*-señalización regula diferentes quemoquinas inflamatorias responsables del reclutamiento. A su vez, IL-6 también modifica las características efectoras de células T ya definidas. Por ejemplo, la interrelación de IL-6 con IL-27 (involucrando la activación de los factores de transcripción STAT1 y STAT3) promueve la secreción de IL-10. De manera análoga, IL-6 colabora en la adquisición de la expresión de T-bet y RORγt por parte de células T<sub>reg</sub> (Tomado de [202]).



### 5.6. TryS como elemento clave de una red con influencia sobre otras vías metabólicas

Como fue ampliamente expuesto a lo largo de este manuscrito, *T. cruzi* enfrenta diferentes fuentes de ROS y RNS, tanto de origen exógeno como endógeno durante todo su ciclo de vida [49,64,185]. Por ello, el parásito debe ser capaz de coordinar finamente una respuesta que le permita mantener la homeostasis redox y reparar los daños producidos por el estrés oxidativo [88]. Esta acción debe ser lo suficientemente precisa para controlar los efectos deletéreos del estrés oxidativo, sin alterar el ambiente intracelular, ya que un desbalance redox puede afectar otras vías metabólicas relevantes para el parásito [64,111,179,213,214]. La forma en que este fino ajuste es coordinado por los tripanosomátidos aún no fue dilucidada. Lo que sí se conoce es que deben involucrarse diferentes niveles de regulación estadio-específicos y de respuesta a estrés tales como: modificación de cromatina a nivel epigenético [215,216], vida media de ARNm o represión de la traducción mediante la interacción con de proteínas de unión al ARN (RBPs) o formación de gránulos de ARN [217–222], e inclusive modificaciones post-traduccionales [223,224], por mencionar algunos. Algunas de estas formas de regulación afectarían directamente la expresión y actividad de TryS, como su modificación post-traduccional por adición de grupos acetilos o fosforilación, y la unión de su ARNm a RBPs represoras de la traducción [223–225]. El estudio de la regulación de la expresión de TryS, y otros componentes de esta red en *T. cruzi*, tiene mucho por ser explorado ya que todavía resultan enigmáticos los mecanismos utilizados por el patógeno para responder con precisión frente a un estímulo oxidativo. Estos mecanismos de regulación podrían, a su vez, constituir un blanco de tratamiento *per se*, considerando las grandes diferencias que este organismo presenta en este aspecto con el hospedador.

En base a todos los resultados aquí expuestos, reafirmamos que la inhibición de TryS puede constituir una alternativa para el tratamiento de la EdC, ya que su actividad resulta esencial para el patógeno tanto en condiciones fisiológicas como de estrés oxidativo. Este postulado se basa en su

función específica como enzima clave del sistema de defensa antioxidante, y adicionalmente, su inhibición podría incidir sobre otras funciones vitales del parásito dependientes del entorno redox. Proponemos, que la combinación de diferentes abordajes terapéuticos tales como algunos de los utilizadas en este trabajo de Tesis doctoral: i) la inhibición de TryS, ii) la administración de drogas pro-oxidantes; junto con otros tales como, iii) la inhibición de los mecanismos de reparación del ADN, o iv) la manipulación de los mecanismos de regulación del sistema antioxidante, podrían ser una buena estrategia para controlar al parásito desde un enfoque terapéutico multi-componente. Un tratamiento tripanocida de este tipo, evitaría la selección de parásitos resistentes.

## **6. CONCLUSIONES FINALES**

## 6. Conclusiones finales

A través de un enfoque combinado de genética reversa y el uso de inhibidores específicos, se estudió el rol de la enzima TryS para *T. cruzi*. Los resultados aquí presentados, evidenciaron que una mayor expresión de TryS se tradujo en una importante ventaja para el parásito al conferirle una mayor tolerancia frente al estrés oxidativo generado por diferentes fuentes. Esto pudo observarse tanto para el estadio replicativo de epimastigote como para el estadio infectivo de tripomastigote. Asimismo, fue evidenciado en este trabajo, un nuevo rol de TryS en relación a la proliferación. La actividad de TryS se vio asociada a una mayor tasa de división celular en la forma parasitaria replicativa de epimastigote, particularmente bajo condiciones nutricionales limitantes. Esto, podría implicar que cepas con un mayor nivel de expresión endógeno de TryS, podrían generar un mayor número de parásitos disponibles para ingresar al proceso de metaciclologénesis a medida que progresan por el sistema digestivo del vector y las fuentes nutricionales se tornan limitadas. De hecho, observamos que los epimastigotes TryS<sup>hi</sup>, incubados en presencia de homogenado intestinal de *T. infestans*, experimentaron una mayor tasa de diferenciación. Por lo tanto, la combinación de estos dos fenómenos podría permitirle al patógeno, alcanzar un mayor inóculo de formas parasitarias infectivas en el insecto vector.

Además quedó demostrado que, una mayor expresión de TryS le otorgó al parásito una mayor tolerancia frente a las drogas anti-parasitarias, BZ y NFX, sugiriendo que esta enzima podría involucrarse en los fenómenos de fallas terapéuticas observados habitualmente. Esta observación se vio reforzada por el uso de inhibidores específicos de TryS de la familia de las paulonas, que logró aumentar la sensibilidad del parásito frente a estos fármacos tripanocidas. Este hallazgo fundamenta la necesidad de dirigir los esfuerzos futuros al desarrollo, evaluación, e implementación de esquemas terapéuticos combinados.

En el estudio de la interacción parásito-hospedador, observamos que los parásitos sobre-expresantes de TryS fueron capaces de escapar rápidamente del macrófago infectado, para continuar con la diseminación de la infección. Asimismo, los parásitos TryS<sup>hi</sup> generaron un aumento en la

## 6. Conclusiones finales

apoptosis y secreción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) en macrófagos cultivados *in vitro*. El ingreso del macrófago en apoptosis podría representar para el parásito una vía de evasión del sistema inmune innato, “*ganando tiempo*” frente a la generación de la respuesta inmune adaptativa. Aún así, son muchos los interrogantes por responder acerca del rol de TryS en la relación patógeno-hospedador.

En conjunto nuestros resultados, resaltan aún más el carácter esencial postulado para esta enzima en otros miembros de la familia *Trypanosomatidae*. Los hallazgos presentados, confirmaron la participación de TryS en la resistencia frente a los desafíos oxidativos que el parásito debe enfrentar a lo largo de su ciclo de vida. Asimismo, le confirieron a TryS un rol en procesos cruciales como la proliferación y la supervivencia en sus distintos estadios, poniendo de manifiesto el carácter esencial que tiene esta enzima para *T. cruzi*. Vislumbramos también su posible participación en mecanismos de evasión inmune, por medio de la activación de la apoptosis en macrófagos *in vitro*, lo cual favorecería el establecimiento de la infección.

Por último, se evidenció claramente la participación de TryS en la resistencia a las drogas de primera línea utilizadas para el tratamiento de la EdC. Profundizar en el diseño e implementación de drogas inhibitoras de TryS solas o combinadas con BZ o NFX, sería una buena estrategia a considerar para el tratamiento de la EdC permitiendo quizás reducir las dosis actualmente empleadas, asociadas a graves efectos adversos para los pacientes.

## **7. PERSPECTIVAS**

A medida que se profundizaba en el estudio de TryS y los roles que esta enzima desempeña en diferentes aspectos de la biología de *T.cruzi*, surgieron nuevos interrogantes. Esperamos poder responder algunos de ellos prontamente, a través de las herramientas generadas. Mientras que otros, posiblemente requieran ser atendidos por nuevas investigaciones y abordajes. Algunas de las perspectivas que surgen de esta Tesis, se mencionan a continuación:

- Determinar el mecanismo subyacente al aumento de marcadores apoptóticos en macrófagos infectados con parásitos sobre-expresantes de TryS y evaluar la existencia de este fenómeno *in vivo*. Esto nos permitiría establecer si la inducción de la apoptosis por parte de líneas de mayor expresión de TryS, podría efectivamente ser un mecanismo que contribuya a la diseminación temprana del patógeno en el organismo.
- Caracterizar los mecanismos que regulan la actividad de TryS. Se ha descrito recientemente que al menos dos modificaciones post-traduccionales, acetilación y fosforilación [223,224], podrían modular su actividad. Sin embargo aun no ha podido definirse de qué manera estas PTMs podrían activar o inhibir cada dominio funcional de la enzima. El análisis mediante herramientas tales como *MS-MS* (espectrometría de masa en tándem) o *Western blot* de estas modificaciones en condiciones fisiológicas y de estrés oxidativo, podría arrojar importante información acerca de la regulación enzimática de TryS.
- En virtud de la propuesta de TryS como un promisorio blanco terapéutico, sería fundamental conocer su relevancia para el parásito durante la fase crónica de la EdC. Se ha demostrado que para esta fase de la enfermedad, las drogas actuales no son efectivas, y por lo tanto un nuevo blanco farmacológico debería permitir dar respuesta a los pacientes en condición crónica.

- Por último, resulta indispensable lograr la purificación y cristalización de la enzima recombinante de *T. cruzi*, seguido de su análisis tridimensional. Ello, podría representar una ventaja en el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos o análisis de reposicionamiento de drogas a partir de un conocimiento más preciso de su estructura, considerando que sólo la TryS de *L. donovani* fue caracterizada y se encuentra disponible en la base de datos PDB.



## **8. DIFUSIÓN DE RESULTADOS**

### Publicación de resultados en revistas científicas

“Trypanothione synthetase confers growth and survival advantage and resistance to anti-protozoal drugs in *Trypanosoma cruzi*”.

Mesías AC, Sasoni N, Arias DG, Pérez Brandán C, Orban OCF, Kunick C, Robello C, Comini MA, Garg NJ, Zago MP.

Free Radical Biology and Medicine, 2018. PMID:30359758.

### Trabajos enviados o en preparación

“Antioxidant network and redox-dependent processes in *Trypanosoma cruzi*: roles and regulation of cellular redox homeostasis”

Mesías AC, Garg NJ, Zago MP (*Review* enviado para su publicación).

Free Radical Biology and Medicine, 2019.

“Trypanothione synthetase triggers apoptosis and pro-inflammatory cytokines release in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages”

Mesías AC, Garg NJ, Zago MP (Manuscrito en preparación).

### Presentaciones en reuniones científicas

XXXIV Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/XLIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas disease, Caxambu, Minas Gerais, BRASIL. Mesías AC, Sasoni N, Arias DG, Pérez Brandán C, Orban OCF, Kunick C, Robello C, Comini MA, Garg NJ, Zago MP. “Trypanothione synthetase contributes to parasite survival towards oxidative stress and trypanocidal drugs benznidazol and nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*”.

Noviembre de 2018.

IHII/McLaughlin Colloquium on Infection and Immunity, Galveston, Texas, EEUU. Mesías AC, Sasoni N, Arias DG, Zago MP, Garg NJ. “Dissecting the role and pathogen benefits of trypanothione synthetase overexpression in *Trypanosoma cruzi*”.

Marzo de 2018.

XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias - SIMPOSIO Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas. Santa Fe, ARGENTINA. Mesías AC, Piñeyro MD, Robello C, Zago MP. “Efectos de la sobre-expresión de la tripanotión sintetasa para *Trypanosoma cruzi*”.

Noviembre de 2016

## 8. Difusión de resultados

IV Simposio Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas. Santiago de Chile, CHILE. Mesías AC, Piñeyro MD, Robello C, Zago MP. “Estudio funcional y caracterización de la tripanotión sintetasa (TryS) de *Trypanosoma cruzi* como factor de virulencia y patogenicidad”.

Noviembre de 2015

X Congreso de Protozoología y enfermedades parasitarias. Mar del Plata, ARGENTINA.

Mesías AC, Piñeyro MD, Robello C, Zago MP. “Development of molecular tools for the characterization and functional analysis of trypanothione synthetase (TryS) in *Trypanosoma cruzi*”.

Noviembre de 2014

## **9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. Referencias bibliográficas

- [1] R. Lewinsohn, Carlos Chagas (1879-1934): the discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American trypanosomiasis (foot-notes to the history of Chagas's disease), *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73 (1979) 513–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/119337> (accessed January 13, 2019).
- [2] M.P. Barrett, R.J. Burchmore, A. Stich, J.O. Lazzari, A.C. Frasch, J.J. Cazzulo, S. Krishna, The trypanosomiases, *Lancet.* 362 (2003) 1469–1480. doi:10.1016/S0140-6736(03)14694-6.
- [3] J.R. Coura, The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - a comprehensive review, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 110 (2014) 277–282. doi:10.1590/0074-0276140362.
- [4] J. Breilh, La epidemiología crítica: una nueva forma de mirar la salud en el espacio urbano, *Salud Colect.* 6 (2010) 83–101. doi:dx.doi.org/10.1590/S1851-82652010000100007.
- [5] A. Boischio, A. Sánchez, Z. Orosz, D. Charron, Health and sustainable development: challenges and opportunities of ecosystem approaches in the prevention and control of dengue and Chagas disease, *Cad. Saude Publica.* 25 Suppl 1 (2009) S149-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287859> (accessed December 3, 2018).
- [6] P.J. Hotez, M.T. Ferris, The antipoverty vaccines, *Vaccine.* 24 (2006) 5787–5799. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.008.
- [7] G.A. Schmunis, Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102 (2007) 75–85. doi:10.1590/S0074-02762007005000093.
- [8] C. Bern, S. Kjos, M.J. Yabsley, S.P. Montgomery, *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States, *Clin Microbiol Rev.* (4): 655–6 (2011). doi:10.1128/CMR.00005-11.
- [9] R. Curtis-Robles, K.F. Snowden, B. Dominguez, L. Dinges, S. Rodgers, G. Mays, S.A. Hamer, Epidemiology and molecular typing of *Trypanosoma cruzi* in naturally-infected hound dogs and associated triatomine vectors in Texas, USA, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) e0005298. doi:10.1371/journal.pntd.0005298.
- [10] R. Curtis-Robles, A.C. Meyers, L.D. Auckland, I.B. Zecca, R. Skiles, S.A. Hamer, Parasitic interactions among *Trypanosoma cruzi*, triatomine vectors, domestic animals, and wildlife in Big Bend National Park along the Texas-Mexico border, *Acta Trop.* 188 (2018) 225–233. doi:10.1016/j.actatropica.2018.09.002.

## 9. Referencias bibliográficas

- [11] M.N. Garcia, H. Burroughs, R. Gorchakov, S.M. Gunter, E. Dumonteil, K.O. Murray, C.P. Herrera, Molecular identification and genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in autochthonous Chagas disease patients from Texas, USA, *Infect. Genet. Evol.* 49 (2017) 151–156. doi:10.1016/j.meegid.2017.01.016.
- [12] M.C.P. Nunes, W. Dones, C.A. Morillo, J.J. Encina, A.L. Ribeiro, Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects, *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (2013) 767–776. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.046.
- [13] K.M. Bonney, D.J. Luthringer, S.A. Kim, N.J. Garg, D.M. Engman, Pathology and pathogenesis of Chagas heart disease, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 14 (2019) 020117–043711. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043711.
- [14] S. Jabari, E.C. de Oliveira, A. Brehmer, A.B.M. da Silveira, Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures, *Histochem. Cell Biol.* 142 (2014) 235–244. doi:10.1007/s00418-014-1250-x.
- [15] B. Zingales, *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity, *Acta Trop.* 184 (2018) 38–52. doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.017.
- [16] É.C. Borges, J.-P. Dujardin, C.J. Schofield, A.J. Romanha, L. Diotaiuti, Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: *Reduviidae*) in Ceará State, Northeastern Brazil, *Acta Trop.* 93 (2005) 119–126. doi:10.1016/j.actatropica.2004.10.002.
- [17] A.L.R. Roque, S.C.C. Xavier, M.G. Da Rocha, A.C.M. Duarte, P.S. D’Andrea, A.M. Jansen, *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted chagas disease outbreaks, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79 (2008) 742–749. doi:10.4269/ajtmh.2008.79.742.
- [18] A.R.L. Teixeira, C. Gomes, S.P. Lozzi, M.M. Hecht, A.D.C. Rosa, P.S. Monteiro, A.C. Bussacos, N. Nitz, C. McManus, Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health, *Cad. Saude Publica Minist. Da Saude Fund. Oswaldo Cruz.* 25 Suppl 1 (2009) S32–S44. doi:10.1590/S0102-311X2009001300004.
- [19] S. Wendel, Transfusion transmitted Chagas disease: is it really under control?, *Acta Trop.* 115 (2010) 28–34. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2009.12.006.

## 9. Referencias bibliográficas

- [20] I.A. Sherlock, Epidemiology and dynamics of the vectorial transmission of Chagas disease, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94 Suppl 1 (1999) 385–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677761> (accessed December 3, 2018).
- [21] A.A. Nóbrega, M.H. Garcia, E. Tatto, M.T. Obara, E. Costa, J. Sobel, W.N. Araujo, Oral transmission of Chagas Disease by consumption of açai palm fruit, Brazil, Emerg Infect Dis. 15(4): 653 (2009). doi:10.3201/eid1504.081450.
- [22] C.J.C. Bastos, R. Aras, G. Mota, F.R. Juarez Pereira Dias, R. Silva de Jesus, M.S. Freire, E.G. de Araújo, J. Prazeres, M.F. Rios Grassi, Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas Disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil, PLoS Negl Trop Dis. 4(6): e711 (2010). doi:10.1371/journal.pntd.0000711.
- [23] Y. Carlier, S. Sosa-Estani, A.O. Luquetti, P. Buekens, Congenital Chagas disease: an update, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 110 (2015) 363–368. doi:10.1590/0074-02760140405.
- [24] F. Torrico, M. Castro, M. Solano, P. Rodriguez, M.-C. Torrico, C. Truyens, Y. Carlier, Effects of maternal infection with *Trypanosoma cruzi* in pregnancy development and in the newborn infant, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38 Suppl 2 (2005) 73–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482820> (accessed December 3, 2018).
- [25] Y. Carlier, Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38 Suppl 2 (2005) 105–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482827> (accessed December 3, 2018).
- [26] F. Althabe, B. López, O. Graiff, M.J. Ramírez-Sierra, S. Sosa-Estani, D.M. Wesson, N. Bustamante, J. Alger, C. Zúniga, L.S. Lara, L. Gibbons, M.L. Matute, C. Valladares, J.M. Belizán, M.L. Cafferata, E. Howard, A. Ciganda, R. Gamboa-León, J.A. García, C. Truyens, J.G. Maldonado, P. Buekens, M.C. Robles, C. Herrera, Y. Carlier, J.H. del Cid, E. Dumonteil, for the C.C.W. Group, Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: an observational prospective study, Am. J. Trop. Med. Hyg. 98 (2018) 478–485. doi:10.4269/ajtmh.17-0516.
- [27] J.D. Maya, B.K. Cassels, P. Iturriaga-Vásquez, J. Ferreira, M. Faúndez, N. Galanti, A. Ferreira, A. Morello, Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host, Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 146 (2007) 601–620. doi:10.1016/J.CBPA.2006.03.004.



## 9. Referencias bibliográficas

- [28] J.A. Castro, M.M. de Mecca, L.C. Bartel, Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis), *Hum. Exp. Toxicol.* 25 (2006) 471–9. doi:10.1191/0960327106het653oa.
- [29] A.L. Bittencourt, Congenital Chagas disease, *Am. J. Dis. Child.* 130 (1976) 97–103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/813519> (accessed December 3, 2018).
- [30] A.M. Altemani, A.L. Bittencourt, A.M.A. Lana, Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: A qualitative and quantitative analysis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62 (2000) 319–324. doi:10.4269/ajtmh.2000.62.319.
- [31] S.H. Shippey, C.M. Zahn, M.M. Cisar, T.J. Wu, A.J. Satin, Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192 (2005) 586–591. doi:10.1016/j.ajog.2004.07.079.
- [32] A.G. Schijman, Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*, *Acta Trop.* 184 (2018) 59–66. doi:10.1016/j.actatropica.2018.02.019.
- [33] K. Nagamine, T. Hase, T. Notomi, Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers, *Mol. Cell. Probes.* 16 (2002) 223–229. doi:10.1006/mcpr.2002.0415.
- [34] O.M.M. Thekiso, C. V. Rodriguez, F. Rivas, A.M. Coronel-Servian, S. Fukumoto, C. Sugimoto, S.I. Kawazu, N. Inoue, Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82 (2010) 855–860. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0533.
- [35] S.A. Besuschio, M. Llano Murcia, A.F. Benatar, S. Monnerat, I. Cruz, A. Picado, M. de los Á. Curto, Y. Kubota, D.P. Wehrendt, P. Pavia, Y. Mori, C. Puerta, J.M. Ndung'u, A.G. Schijman, Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) e0005779. doi:10.1371/journal.pntd.0005779.
- [36] J.R. Coura, S.L. De Castro, A critical review on chagas disease chemotherapy, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97 (2002) 3–24. doi:10.1590/S0074-02762002000100001.
- [37] C.A. Morillo, J.A. Marin-Neto, A. Avezum, S. Sosa-Estani, A. Rassi, F. Rosas, E. Villena, R. Quiroz, R. Bonilla, C. Britto, F. Guhl, E. Velazquez, L. Bonilla, B. Meeks, P. Rao-Melacini, J.

## 9. Referencias bibliográficas

- Pogue, A. Mattos, J. Lazdins, A. Rassi, S.J. Connolly, S. Yusuf, Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 1295–1306. doi:10.1056/NEJMoa1507574.
- [38] B. Carrilero, L. Murcia, L. Martínez-Lage, M. Segovia, Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country, *Rev. Esp. Quimioter.* 24 (2011) 123–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21947093> (accessed August 29, 2018).
- [39] S.R. Wilkinson, C. Bot, J.M. Kelly, B.S. Hall, Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 2072–2084. doi:10.2174/156802611796575894.
- [40] S. Patterson, S. Wyllie, Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects, *Trends Parasitol.* 30 (2014) 289–298. doi:10.1016/j.pt.2014.04.003.
- [41] J.D. Maya, Y. Repetto, M. Agosín, J.M. Ojeda, R. Tellez, C. Gaule, A. Morello, Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 86 (1997) 101–106. doi:10.1016/S0166-6851(96)02837-X.
- [42] J.D. Maya, A. Rodríguez, L. Pino, A. Pabón, J. Ferreira, M. Pavani, Y. Repetto, A. Morello, Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*, *Biol. Res.* 37 (2004) 61–69. doi:10.4067/S0716-97602004000100007.
- [43] A. Trochine, D.J. Creek, P. Faral-Tello, M.P. Barrett, C. Robello, Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014). doi:10.1371/journal.pntd.0002844.
- [44] L.P. Quebrada Palacio, M.N. González, Y. Hernandez-Vasquez, A.E. Perrone, A. Parodi-Talice, J. Bua, M. Postan, Phenotypic diversity and drug susceptibility of *Trypanosoma cruzi* TcV clinical isolates, *PLoS One.* 13 (2018) e0203462. doi:10.1371/journal.pone.0203462.
- [45] A.P.M. Teston, W.M. Monteiro, D. Reis, G.D.P. Bossolani, M.L. Gomes, S.M. de Araújo, M.T. Bahia, M.G. V. Barbosa, M.J.O. Toledo, *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon, *Trop. Med. Int. Heal.* 18 (2013) 85–95. doi:10.1111/tmi.12014.

## 9. Referencias bibliográficas

- [46] A.M. Mejía-Jaramillo, G.J. Fernández, M. Montilla, R.S. Nicholls, O. Triana-Chávez, *Trypanosoma cruzi* strains resistant to benznidazole occurring in Colombia, *Biomedica*. 32 (2012) 196–205. doi:10.1590/S0120-41572012000300007.
- [47] L. Flohé, The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases, *Int. J. Med. Microbiol.* 302 (2012) 216–220. doi:10.1016/j.ijmm.2012.07.008.
- [48] F. Irigoín, L. Cibils, M.A. Comini, S.R. Wilkinson, L. Flohé, R. Radi, Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 733–742. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.028.
- [49] L. Piacenza, M.N.M. Alvarez, G. Peluffo, R. Radi, Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection, *Curr Opin Microbiol.* 12 (2009) 415–421. doi:10.1016/j.mib.2009.06.011.
- [50] A. Talevi, C. Carrillo, M.A. Comini, The thiol-polyamine metabolism of *Trypanosoma cruzi*: molecular targets and drug repurposing strategies, *Curr. Med. Chem.* 25 (2018). doi:10.2174/0929867325666180926151059.
- [51] O. Rodríguez-Morales, V. Monteón-Padilla, S.C. Carrillo-Sánchez, M. Rios-Castro, M. Martínez-Cruz, A. Carabarin-Lima, M. Arce-Fonseca, Experimental vaccines against Chagas Disease: a journey through history, *J. Immunol. Res.* 2015 (2015) 1–8. doi:10.1155/2015/489758.
- [52] N.R. Sturm, D.A. Campbell, Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*, *Acta Trop.* 115 (2010) 35–43. doi:10.1016/j.actatropica.2009.08.018.
- [53] J.M. Burgos, M. Diez, C. Vigliano, M. Bisio, M. Risso, T. Duffy, C. Cura, B. Brusses, L. Favaloro, M.S. Leguizamon, R.H. Lucero, R. Laguens, M.J. Levin, R. Favaloro, A.G. Schijman, Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation, *Clin. Infect. Dis.* 51 (2010) 485–495. doi:10.1086/655680.
- [54] M.A. Miles, M.S. Llewellyn, M.D. Lewis, M. Yeo, R. Baleela, S. Fitzpatrick, M.W. Gaunt, I.L. Mauricio, The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: Looking back and to the future, *Parasitology*. 136 (2009) 1509–1528. doi:10.1017/S0031182009990977.
- [55] M.D. Lewis, J. Ma, M. Yeo, H.J. Carrasco, M.S. Llewellyn, M.A. Miles, Genotyping of

## 9. Referencias bibliográficas

- Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81 (2009) 1041–1049. doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0305.
- [56] C. Muñoz-San Martín, I. Zulantay, M. Saavedra, C. Fuentealba, G. Muñoz, W. Apt, Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* detected by real-time PCR in Chilean patients with chronic Chagas cardiomyopathy, *Acta Trop.* 185 (2018) 280–284. doi:10.1016/j.actatropica.2018.05.004.
- [57] A. Abras, M. Gállego, C. Muñoz, N.A. Juiz, J.C. Ramírez, C.I. Cura, S. Tebar, A. Fernández-Arévalo, M.-J. Pinazo, L. de la Torre, E. Posada, F. Navarro, P. Espinal, C. Ballart, M. Portús, J. Gascón, A.G. Schijman, Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain), *Parasitol. Int.* 66 (2017) 83–88. doi:10.1016/j.parint.2016.12.003.
- [58] C.I. Cura, R.H. Lucero, M. Bisio, E. Oshiro, L.B. Formichelli, J.M. Burgos, S. Lejona, B.L. Brusés, D.O. Hernández, G. V. Severini, E. Velazquez, T. Duffy, E. Anchart, R. Lattes, J. Altcheh, H. Freilij, M. Diez, C. Nagel, C. Vigliano, L. Favalaro, R.R. Favalaro, D.E. Merino, S. Sosa-Estani, A.G. Schijman, *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina, *Parasitology.* 139 (2012) 516–521. doi:10.1017/S0031182011002186.
- [59] P. Azambuja, E.S. Garcia, P.J. Waniek, C.S. Vieira, M.B. Figueiredo, M.S. Gonzalez, C.B. Mello, D.P. Castro, N.A. Ratcliffe, *Rhodnius prolixus*: from physiology by Wigglesworth to recent studies of immune system modulation by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*, *J. Insect Physiol.* (2016). doi:10.1016/j.jinsphys.2016.11.006.
- [60] R.J. Ursic-Bedoya, C.A. Lowenberger, *Rhodnius prolixus*: identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization, *Dev. Comp. Immunol.* 31 (2007) 109–120. doi:10.1016/j.dci.2006.05.008.
- [61] E. MacLeod, I. Maudlin, A. Darby, S. Welburn, Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse, *Parasitology.* 134 (2007) 827–31. doi:10.1017/S0031182007002247.
- [62] A.C. Bahia, J.H.M. Oliveira, M.S. Kubota, H.R.C. Araújo, J.B.P. Lima, C.M. Ríos-Velásquez, M.V.G. Lacerda, P.L. Oliveira, Y.M. Traub-Csekö, P.F.P. Pimenta, The role of Reactive Oxygen Species in *Anopheles aquasalis* response to *Plasmodium vivax* infection, *PLoS One.* 8 (2013) 1–

10. doi:10.1371/journal.pone.0057014.
- [63] D. Cosentino-Gomes, N. Rocco-Machado, J.R. Meyer-Fernandes, *Rhodnius prolixus*: modulation of antioxidant defenses by *Trypanosoma rangeli*, *Exp. Parasitol.* 145 (2014) 118–124. doi:10.1016/j.exppara.2014.08.002.
- [64] N.P. Nogueira, F.M.S. Saraiva, P.E. Sultano, P.R.B.B. Cunha, G.A.T. Laranja, G.A. Justo, K.C.C. Sabino, M.G.P. Coelho, A. Rossini, G.C. Atella, M.C. Paes, Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status, *PLoS One.* 10 (2015) 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0116712.
- [65] N.P. Nogueira, F.M.S. Saraiva, M.P. Oliveira, A.P.M. Mendonça, J.D.F. Inacio, E.E. Almeida-Amaral, R.F. Menna-Barreto, G.A.T. Laranja, E.J.L. Torres, M.F. Oliveira, M.C. Paes, Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production, *Free Radic. Biol. Med.* 108 (2017) 183–191. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.027.
- [66] C. Junqueira, B. Caetano, D. Bartholomeu, M. Melo, C. Ropert, M. Rodrigues, R. Gazzinelli, The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease, *Expert Rev Mol Med.* 12 (2010). doi:10.1017/S146239941000156.
- [67] F. Cardillo, R.T. De Pinho, P.R.Z. Antas, J. Mengel, Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection, *Pathog. Dis.* 73 (2015) ftv082. doi:10.1093/femspd/ftv082.
- [68] F.S. Machado, W.O. Dutra, L. Esper, K.J. Gollob, M.M. Teixeira, S.M. Factor, L.M. Weiss, F. Nagajyothi, H.B. Tanowitz, N.J. Garg, Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease, *Semin. Immunopathol.* 34 (2012) 753–770. doi:10.1007/s00281-012-0351-7.
- [69] M. Lopez, H.B. Tanowitz, N.J. Garg, Pathogenesis of chronic Chagas Disease: macrophages, mitochondria, and oxidative stress, *Curr. Clin. Microbiol. Reports.* 5 (2018) 45–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29868332> (accessed October 30, 2018).
- [70] M.N. Alvarez, G. Peluffo, L. Piacenza, R. Radi, Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 6627–6640. doi:10.1074/jbc.M110.167247.
- [71] L.M. de Pablos Torró, L. Retana Moreira, A. Osuna, Extracellular vesicles in Chagas Disease: a

## 9. Referencias bibliográficas

- new passenger for an old disease, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1190. doi:10.3389/fmicb.2018.01190.
- [72] T.M. Silva, E.F. Peloso, S.C. Vitor, L.H.G. Ribeiro, F.R. Gadelha, O<sub>2</sub> consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain, *J. Bioenerg. Biomembr.* 43 (2011) 409–17. doi:10.1007/s10863-011-9369-0.
- [73] X. Wang, C. Hai, Novel insights into redox system and the mechanism of redox regulation, *Mol. Biol. Rep.* 43 (2016) 607–628. doi:10.1007/s11033-016-4022-y.
- [74] E. Cunha-Neto, V.J. Dzau, P.D. Allen, D. Stamatiou, L. Benvenuti, M.L. Higuchi, N.S. Koyama, J.S. Silva, J. Kalil, C.-C. Liew, Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' Disease cardiomyopathy, *Am. J. Pathol.* 167 (2005) 305–313. doi:10.1016/S0002-9440(10)62976-8.
- [75] J.-J. Wen, N. Garg, Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma cruzi* infection, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 2072–2081. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.011.
- [76] S. Mukherjee, T.J. Belbin, D.C. Spray, D.A. Iacobas, L.M. Weiss, R.N. Kitsis, M. Wittner, L.A. Jelicks, P.E. Scherer, A. Ding, H.B. Tanowitz, Microarray analysis of changes in gene expression in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy, *Parasitol. Res.* 91 (2003) 187–196. doi:10.1007/s00436-003-0937-z.
- [77] G. Vyatkina, V. Bhatia, A. Gerstner, J. Papaconstantinou, N. Garg, Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1689 (2004) 162–173. doi:10.1016/j.bbadis.2004.03.005.
- [78] S. Gupta, V. Bhatia, J. Wen, Y. Wu, M.-H. Huang, N.J. Garg, *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 1414–1421. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.008.
- [79] R. Pérez-Fuentes, J.-F. Guégan, C. Barnabé, A. López-Colombo, H. Salgado-Rosas, E. Torres-Rasgado, B. Briones, M. Romero-Díaz, J. Ramos-Jiménez, M. del C. Sánchez-Guillén, Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals, *Int. J. Parasitol.* 33 (2003) 293–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12670514> (accessed September 27, 2018).

## 9. Referencias bibliográficas

- [80] T.B. de Oliveira, R.C. Pedrosa, D.W. Filho, Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease, *Int. J. Cardiol.* 116 (2007) 357–63. doi:10.1016/j.ijcard.2006.04.046.
- [81] J. Wen, P.C. Yachelini, A. Sembaj, R.E. Manzur, N.J. Garg, Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 270–276. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.009.
- [82] X. Wan, S. Gupta, M.P. Zago, M.M. Davidson, P. Dousset, A. Amoroso, N.J. Garg, Defects of mtDNA replication impaired mitochondrial biogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection in human cardiomyocytes and chagasic patients: the role of Nrf1/2 and antioxidant response, *J. Am. Heart Assoc.* 1 (2012) e003855. doi:10.1161/JAHA.112.003855.
- [83] F. Bringaud, L. Rivière, V. Coustou, Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources, *Mol. Biochem. Parasitol.* 149 (2006) 1–9. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.03.017.
- [84] R.M.B.M. Girard, M. Crispim, M.B. Alencar, A.M. Silber, R. Burchmore, A. Schnauffer, R. Docampo, Uptake of L-Alanine and its distinct roles in the bioenergetics of *Trypanosoma cruzi*, *MSphere.* 3 (2018) e00338-18. doi:10.1128/mSphereDirect.00338-18.
- [85] J.C. Engel, B.M. Franke de Cazzulo, A.O. Stoppani, J.J. Cannata, J.J. Cazzulo, Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes, *Mol. Biochem. Parasitol.* 26 (1987) 1–10.
- [86] A.M. Silber, R.R. Tonelli, C.G. Lopes, N. Cunha-e-silva, A.C.T. Torrecilhas, R.I. Schumacher, W. Colli, M.J.M. Alves, A. Cláudia, T. Torrecilhas, R.I. Schumacher, W. Colli, M. Júlia, M.J.M. Alves, Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 168 (2009) 102–108. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.07.006.
- [87] S. Shah-Simpson, G. Lentini, P.C. Dumoulin, B.A. Burleigh, Modulation of host central carbon metabolism and in situ glucose uptake by intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes, *PLoS Pathog.* 13 (2017) e1006747. doi:10.1371/journal.ppat.1006747.
- [88] A. Machado-silva, P.G. Cerqueira, V. Grazielle-silva, F.R. Gadelha, E. de F. Peloso, S.M.R. Teixeira, C.R. Machado, P. Gonçalves, V. Grazielle-silva, F. Ramos, E. De Figueiredo, S. Maria, R. Teixeira, C. Renato, How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: antioxidant defence and DNA repair pathways, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 767 (2016) 8–22. doi:10.1016/j.mrrev.2015.12.003.

## 9. Referencias bibliográficas

- [89] B. Manta, M. Comini, A. Medeiros, M. Hugo, M. Trujillo, R. Radi, Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 3199–3216. doi:10.1016/j.bbagen.2013.01.013.
- [90] S.L. Oza, E. Tetaud, M.R. Ariyanayagam, S.S. Warnon, A.H. Fairlamb, A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 35853–35861. doi:10.1074/jbc.M204403200.
- [91] M. Dhiman, Y.A. Coronado, C.K. Vallejo, J.R. Petersen, A. Ejilemele, S. Nuñez, M.P. Zago, H. Spratt, N.J. Garg, Innate immune responses and antioxidant/oxidant imbalance are major determinants of human Chagas Disease, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e2364. doi:10.1371/journal.pntd.0002364.
- [92] V. Olin-Sandoval, Z. González-Chávez, M. Berzunza-Cruz, I. Martínez, R. Jasso-Chávez, I. Becker, B. Espinoza, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling, *FEBS J.* 279 (2012). doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08557.x.
- [93] C. Vázquez, M. Mejia-Tlachi, Z. González-Chávez, A. Silva, J.S. Rodríguez-Zavala, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*, *FEBS Lett.* 591 (2017) 3881–3894. doi:10.1002/1873-3468.12904.
- [94] M. Moutiez, M. Aumercier, E. Teissier, B. Parmentier, A. Tartar, C. Sergheraert, Reduction of a trisulfide derivative of glutathione by glutathione reductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994) 1380–1386. doi:10.1006/bbrc.1994.2083.
- [95] M. Dormeyer, N. Reckenfelderbäumer, H. Lüdemann, R.L. Krauth-Siegel, Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 10602–10606. doi:10.1074/jbc.M010352200.
- [96] S.R. Wilkinson, S.R. Prathalingam, M.C. Taylor, D. Horn, J.M. Kelly, Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 11645–11650. doi:10.1073/pnas.0504251102.
- [97] S. Wilkinson, S. Obado, I. Mauricio, J. Kelly, *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (2002) 13453–13458.



## 9. Referencias bibliográficas

- [98] M.R. Ariyanayagam, A.H. Fairlamb, Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids, *Mol. Biochem. Parasitol.* 115 (2001) 189–198. doi:10.1016/S0166-6851(01)00285-7.
- [99] S.O. Ismail, W. Paramchuk, Y.A.W. Skeiky, S.G. Reed, A. Bhatia, L. Gedamu, Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 86 (1997) 187–197. doi:10.1016/S0166-6851(97)00032-7.
- [100] I.Q.H. Phan, D.R. Davies, N.S. Moretti, D. Shanmugam, I. Cestari, A. Anupama, J.W. Fairman, T.E. Edwards, K. Stuart, S. Schenkman, P.J. Myler, Iron superoxide dismutases in eukaryotic pathogens: new insights from Apicomplexa and *Trypanosoma* structures, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 71 (2015) 615–621. doi:10.1107/S2053230X15004185.
- [101] M.D. Piñeyro, T. Arcari, C. Robello, R. Radi, M. Trujillo, Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite, *Arch. Biochem. Biophys.* 507 (2011) 287–295. doi:10.1016/j.abb.2010.12.014.
- [102] J.D. Malhotra, R.J. Kaufman, Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?, *Antioxid. Redox Signal.* 9 (2007) 2277–93. doi:10.1089/ars.2007.1782.
- [103] J.R. Haanstra, E.B. González-Marcano, M. Gualdrón-López, P.A.M. Michels, Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites, *Biochim. Biophys. Acta.* 1863 (2016) 1038–48. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.015.
- [104] L. Piacenza, G. Peluffo, M.N. Alvarez, A. Martínez, R. Radi, *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas Disease, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 723–734. doi:10.1089/ars.2012.4618.
- [105] E. De Figueiredo Peloso, S.C. Vitor, L.H.G. Ribeiro, M.D. Piñeyro, C. Robello, F.R. Gadelha, Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics, *J. Bioenerg. Biomembr.* 43 (2011) 419–424. doi:10.1007/s10863-011-9365-4.
- [106] M. Dolores, A. Parodi-talice, M. Portela, D.G. Arias, S.A. Guerrero, C. Robello, M.D. Piñeyro, A. Parodi-talice, M. Portela, D.G. Arias, S.A. Guerrero, C. Robello, Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* Tryparedoxin 1, *J. Proteomics.* 74 (2011) 1683–1692. doi:10.1016/j.jprot.2011.04.006.

## 9. Referencias bibliográficas

- [107] D.G. Arias, M.D. Piñeyro, A.A. Iglesias, S.A. Guerrero, C. Robello, Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* trypanredoxin II, *J. Proteomics*. 120 (2015) 95–104. doi:10.1016/j.jprot.2015.03.001.
- [108] A.R. Hughes, J. Putney Jr., Metabolism and functions of inositol phosphates, *Biofactors*. 1 (1988) 117–121. doi:10.1146/annurev.mi.46.100192.003403.
- [109] J.P. Richie, L. Skowronski, P. Abraham, Y. Leutzinger, Blood glutathione concentrations in a large-scale human study, *Clin. Chem.* 42 (1996) 64–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565235> (accessed December 28, 2017).
- [110] D. Montero, C. Tachibana, J.R. Winther, C. Appenzeller-Herzog, Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated, *Redox Biol.* 1 (2013) 508–513. doi:10.1016/j.redox.2013.10.005.
- [111] L. Piacenza, F. Irigoín, M.N. Alvarez, G. Peluffo, M.C. Taylor, J.M. Kelly, S.R. Wilkinson, R. Radi, Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression, *Biochem. J.* 403 (2007) 323–334. doi:10.1042/BJ20061281.
- [112] M.R. Ariyanayagam, S.L. Oza, A. Mehlert, A.H. Fairlamb, Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27612–27619. doi:10.1074/jbc.M302750200.
- [113] L. Dias, E.F. Peloso, A.F.P. Leme, C.M. Carnielli, C.N. Pereira, C.C. Werneck, S. Guerrero, F.R. Gadelha, *Trypanosoma cruzi* trypanredoxin II interacts with different peroxiredoxins under physiological and oxidative stress conditions, *Exp. Parasitol.* 184 (2018) 1–10. doi:10.1016/j.exppara.2017.10.015.
- [114] N.M. El-Sayed, P.J. Myler, D.C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A.N. Tran, E. Ghedin, E.A. Worthey, A.L. Delcher, G. Blandin, S.J. Westenberger, E. Caler, G.C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Åslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D.A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J.F. Da Silveira, P. De Jong, K. Edwards, P.T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A.C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M.J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C.R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J.C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J.L.

## 9. Referencias bibliográficas

- Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S.L. Salzberg, D.O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A.J. Simpson, E. Sisk, M.T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P.N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C.M. Fraser, K.D. Stuart, B. Andersson, The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease, *Science* (80-. ). 309 (2005). doi:10.1126/science.1112631.
- [115] R.L. Krauth-Siegel, M.A. Comini, Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1780 (2008) 1236–1248. doi:10.1016/J.BBAGEN.2008.03.006.
- [116] A.F. Sousa, A.G. Gomes-Alves, D. Benítez, M.A. Comini, L. Flohé, T. Jaeger, J. Passos, F. Stuhlmann, A.M. Tomás, H. Castro, Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*, *Free Radic. Biol. Med.* 73 (2014) 229–238. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.007.
- [117] A.N. Tran, B. Andersson, U. Pettersson, L. Aslund, Trypanothione synthetase locus in *Trypanosoma cruzi* CL Brener strain shows an extensive allelic divergence, *Acta Trop.* 87 (2003) 269–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826302> (accessed January 13, 2019).
- [118] M.R. Ariyanayagam, S.L. Oza, M.L.S. Guther, A.H. Fairlamb, Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome, *Biochem. J.* 391 (2005) 425–432. doi:10.1042/BJ20050911.
- [119] S. Wyllie, S.L. Oza, S. Patterson, D. Spinks, S. Thompson, A.H. Fairlamb, Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods, *Mol. Microbiol.* 74 (2009) 529–540. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06761.x.
- [120] A.R. Phull, B. Nasir, I. ul Haq, S.J. Kim, Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis, *Chem. Biol. Interact.* 281 (2018) 121–136. doi:10.1016/j.cbi.2017.12.024.
- [121] A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 (2014) 360438. doi:10.1155/2014/360438.
- [122] F.J. Gonzalez-Gonzalez, N.S. Chandel, M. Jain, G.R.S. Budinger, Reactive oxygen species as signaling molecules in the development of lung fibrosis, *Transl. Res.* 190 (2017) 61–68.

doi:10.1016/j.trsl.2017.09.005.

- [123] I. Lorenzen, L. Mullen, S. Bekeschus, E.-M. Hanschmann, Redox regulation of inflammatory processes is enzymatically controlled, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017 (2017) 8459402. doi:10.1155/2017/8459402.
- [124] A.E. Leroux, J.R. Haanstra, B.M. Bakker, R.L. Krauth-Siegel, Dissecting the catalytic mechanism of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase by kinetic analysis and computational modeling., *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 23751–64. doi:10.1074/jbc.M113.483289.
- [125] M.A. Comini, S.A. Guerrero, S. Haile, U. Menge, H. Lünsdorf, L. Flohé, Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 1289–1302. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.008.
- [126] M. Comini, U. Menge, J. Wissing, L. Flohé, Trypanothione synthesis in *Crithidia* revisited, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 6850–6860. doi:10.1074/jbc.M404486200.
- [127] S.L. Oza, M.R. Ariyanayagam, N. Aitchison, A.H. Fairlamb, Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 131 (2003) 25–33. doi:10.1016/S0166-6851(03)00176-2.
- [128] K. Smith, A.H. Fairlamb, K. Nadeau, M. Bradley, C. Walsh, Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*, *Protein Sci.* 1 (1992) 874–883. doi:10.1002/pro.5560010705.
- [129] K.J. Hunter, S.A.L. Quesne, A.H. Fairlamb, Identification and biosynthesis of N1,N9-Bis(Glutathionyl)Aminopropylcadaverine (Homotrypanothione) in *Trypanosoma cruzi*, *Eur. J. Biochem.* 226 (1994) 1019–1027. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.t01-1-01019.x.
- [130] V. Jimenez, R. Paredes, M.A.M. Sosa, N. Galanti, Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures, *J Cell Biochem.* 105 (2008) 688–98. doi:10.1002/jcb.21864.
- [131] M. Laverriere, J. Cazzulo, V. Alvarez, Antagonic activities of *Trypanosoma cruzi* metacaspases affect the balance between cell proliferation, death and differentiation, *Cell Death Differ.* 19 (2012) 1358–1369. doi:10.1038/cdd.2012.12.
- [132] E.R. Coelho, T.P. Ürményi, J.F. Da Silveira, E. Rondinelli, R. Silva, Identification of PDZ5, a candidate universal minicircle sequence binding protein of *Trypanosoma cruzi*, *Int. J. Parasitol.*

- 33 (2003) 853–858. doi:10.1016/S0020-7519(03)00107-3.
- [133] I. Onn, N. Milman-shtepel, J. Shlomai, Redox potential regulates binding of universal minicircle sequence binding protein at the kinetoplast DNA replication origin, *Eukaryot Cell*. 3 (2004) 277–287. doi:10.1128/EC.3.2.277.
- [134] R. Singh, B. Purkait, K. Abhishek, S. Saini, S. Das, S. Verma, A. Mandal, A.K. Ghosh, Y. Ansari, A. Kumar, A.H. Sardar, A. Kumar, P. Parrack, Universal minicircle sequence binding protein of *Leishmania donovani* regulates pathogenicity by controlling expression of cytochrome - b, *Cell Biosci.* (2016) 1–17. doi:10.1186/s13578-016-0072-z.
- [135] H. Castro, C. Sousa, M. Santos, A. Cordeiro-da-Silva, L. Flohé, A. Tomás, Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*, *Free Radic Biol Med.* 33 (2012) 1552–62.
- [136] D. Sela, N. Yaffe, J. Shlomai, Enzymatic mechanism controls redox-mediated protein-DNA interactions at the replication origin of kinetoplast DNA minicircles, *J Biol Chem.* 283 (2008) 32034–44. doi:10.1074/jbc.M804417200.
- [137] K. Augustyns, K. Amssoms, A. Yamani, P.K. Rajan, A. Haemers, Trypanothione as a target in the design of antitrypanosomal and antileishmanial agents, *Curr. Pharm. Des.* 7 (2001) 1117–41. doi:10.2174/1381612013397564.
- [138] F.B. Nogueira, J.C. Ruiz, C. Robello, A.J. Romanha, S.M.F. Murta, Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole, *Parasitol. Res.* 104 (2009) 835–844. doi:10.1007/s00436-008-1264-1.
- [139] O.C.F. Orban, R.S. Korn, D. Benítez, A. Medeiros, L. Preu, N. Loaëc, L. Meijer, O. Koch, M.A. Comini, C. Kunick, 5-Substituted 3-chlorokenpauillone derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms, *Bioorganic Med. Chem.* 24 (2016) 3790–3800. doi:10.1016/j.bmc.2016.06.023.
- [140] D. Benítez, A. Medeiros, L. Fiestas, E.A. Panozzo-Zenere, F. Maiwald, K.C. Prousis, M. Roussaki, T. Calogeropoulou, A. Detsi, T. Jaeger, J. Šarlauskas, L. Peterlin Mašič, C. Kunick, G.R. Labadie, L. Flohé, M.A. Comini, Identification of novel chemical scaffolds inhibiting trypanothione synthetase from pathogenic trypanosomatids, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) e0004617. doi:10.1371/journal.pntd.0004617.

## 9. Referencias bibliográficas

- [141] P.K. Fyfe, S.L. Oza, A.H. Fairlamb, W.N. Hunter, *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 17672–80. doi:10.1074/jbc.M801850200.
- [142] O. Koch, D. Cappel, M. Nocker, T. Jäger, L. Flohé, C.A. Sotriffer, P.M. Selzer, Molecular dynamics reveal binding mode of glutathionylspermidine by trypanothione synthetase, *PLoS One.* 8 (2013) e56788. doi:10.1371/journal.pone.0056788.
- [143] S.L. Oza, M.R. Ariyanayagam, A.H. Fairlamb, Characterization of recombinant glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Crithidia fasciculata*, *Biochem. J.* 364 (2002) 679–86. doi:10.1042/BJ20011370.
- [144] A. Volkamer, D. Kuhn, F. Rippmann, M. Rarey, *DoGSiteScorer*: a web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment, *Bioinformatics.* 28 (2012) 2074–2075. doi:10.1093/bioinformatics/bts310.
- [145] B. Kumar, S. Singh, I. Skvortsova, V. Kumar, Promising targets in anti-cancer drug development: recent updates, *Curr. Med. Chem.* 24 (2018) 4729–4752. doi:10.2174/0929867324666170331123648.
- [146] C. Gentile, A. Martorana, A. Lauria, R. Bonsignore, Kinase inhibitors in multitargeted cancer therapy, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 1671–1686. doi:10.2174/0929867324666170112112734.
- [147] M. García-Aranda, M. Redondo, Protein kinase targets in breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2543. doi:10.3390/ijms18122543.
- [148] A. Volkamer, S. Eid, S. Turk, S. Jaeger, F. Rippmann, S. Fulle, Pocketome of human kinases: prioritizing the ATP binding sites of (yet) untapped protein kinases for drug discovery, *J. Chem. Inf. Model.* 55 (2015) 538–549. doi:10.1021/ci500624s.
- [149] A.S. Kolaskar, P.C. Tongaonkar, A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens, *FEBS Lett.* 276 (1990) 172–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1702393> (accessed January 31, 2019).
- [150] J.M. Walker, ed., *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa, NJ, 1996. doi:10.1007/978-1-60327-259-9.
- [151] M.P. Vazquez, M.J. Levin, Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 $\beta$  gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector, *Gene.* 239

## 9. Referencias bibliográficas

- (1999) 217–225. doi:10.1016/S0378-1119(99)00386-8.
- [152] H.A. Lorenzi, M.P. Vazquez, M.J. Levin, Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*, *Gene*. 310 (2003) 91–99. doi:10.1016/S0378-1119(03)00502-X.
- [153] C. Fusari, A.M. Demonte, C.M. Figueroa, M. Aleanzi, A.A. Iglesias, A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase, *Anal. Biochem.* 352 (2006) 11–13. doi:10.1016/j.ab.2006.01.024.
- [154] D.G. Arias, V.E. Marquez, M.L. Chiribao, F.R. Gadelha, C. Robello, A.A. Iglesias, S.A. Guerrero, Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization of tryparedoxins revisited, *Free Radic. Biol. Med.* 63 (2013) 65–77. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.036.
- [155] L. Piacenza, M.P. Zago, G. Peluffo, M.N. Alvarez, M.A. Basombrio, R. Radi, Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence, *Int. J. Parasitol.* 39 (2009) 1455–1464. doi:10.1016/j.ijpara.2009.05.010.
- [156] J.A. Atwood, D.B. Weatherly, T.A. Minning, B. Bundy, C. Cavola, F.R. Opperdoes, R. Orlando, R.L. Tarleton, The *Trypanosoma cruzi* proteome, *Science*. 309 (2005) 473–6. doi:10.1126/science.1110289.
- [157] A. Parodi-Talice, V. Monteiro-Goes, N. Arrambide, A.R. Avila, R. Duran, A. Correa, B. Dallagiovanna, A. Cayota, M. Krieger, S. Goldenberg, C. Robello, Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1422–1432. doi:10.1002/jms.1267.
- [158] V.E. Alvarez, G. Kosec, C. Sant’Anna, V. Turk, J.J. Cazzulo, B. Turk, Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 3454–64. doi:10.1074/jbc.M708474200.
- [159] E.L. Isola, E.M. Lammel, S.M. González Cappa, *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate, *Exp. Parasitol.* 62 (1986) 329–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3023131> (accessed September 17, 2018).
- [160] F.A. Zumaya-Estrada, J. Martínez-Barnette, A. Lavore, R. Rivera-Pomar, M.H. Rodríguez, Comparative genomics analysis of triatomines reveals common first line and inducible immunity-related genes and the absence of Imd canonical components among hemimetabolous arthropods, *Parasit. Vectors.* 11 (2018) 48. doi:10.1186/s13071-017-2561-2.

## 9. Referencias bibliográficas

- [161] M. Sánchez, L. Sabio, N. Gálvez, M. Capdevila, J.M. Dominguez-Vera, Iron chemistry at the service of life, *IUBMB Life*. 69 (2017) 382–388. doi:10.1002/iub.1602.
- [162] M. Valko, K. Jomova, C.J. Rhodes, K. Kuča, K. Musílek, Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease, *Arch. Toxicol.* 90 (2016) 1–37. doi:10.1007/s00204-015-1579-5.
- [163] N. Ercal, H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns, Toxic metals and oxidative stress Part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage, *Curr Top Med Chem.* 1 (2001) 529–39. doi:10.2174/1568026013394831.
- [164] L.P. de Carvalho, E.J.T. de Melo, Life and death of *Trypanosoma cruzi* in presence of metals, *BioMetals.* 30 (2017) 955–974. doi:10.1007/s10534-017-0064-4.
- [165] W.E. Winter, L.A.L. Bazydlo, N.S. Harris, The molecular biology of human iron metabolism, *Lab. Med.* 45 (2014) 92–102. doi:10.1309/LMF28S2GIMXNWHMM.
- [166] B.S. Hall, C. Bot, S.R. Wilkinson, Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 13088–13095. doi:10.1074/jbc.M111.230847.
- [167] M. Boiani, L. Piacenza, P. Hernández, L. Boiani, H. Cerecetto, M. González, A. Denicola, Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved?, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 1736–1745. doi:10.1016/j.bcp.2010.02.009.
- [168] M.P. Zago, Y.M. Hosakote, S. Koo, M. Dhiman, M.D. Piñeyro, A. Parodi-Talice, M.A. Basombrio, C. Robello, N.J. Garg, TcI isolates of *Trypanosoma cruzi* exploit the antioxidant network for enhanced intracellular survival in macrophages and virulence in mice, *Infect. Immun.* 84 (2016) 1842–1856. doi:10.1128/IAI.00193-16.
- [169] C.P. Brandán, A.C. Mesías, C. Parodi, R.O. Cimino, C. Pérez Brandán, P. Diosque, M. Basombrió, Effects of IFN- $\gamma$  coding plasmid supplementation in the immune response and protection elicited by *Trypanosoma cruzi* attenuated parasites, *BMC Infect. Dis.* 17 (2017). doi:10.1186/s12879-017-2834-6.
- [170] F.J. Sánchez-Valdéz, C. Pérez Brandán, G. Ramírez, A.D. Uncos, M.P. Zago, R.O. Cimino, R.M. Cardozo, J.D. Marco, A. Ferreira, M.Á. Basombrió, A monoallelic deletion of the TcCRT gene



## 9. Referencias bibliográficas

increases the attenuation of a cultured *Trypanosoma cruzi* strain, protecting against an in vivo virulent challenge, PLoS Negl. Trop. Dis. 8 (2014) e2696. doi:10.1371/journal.pntd.0002696.

- [171] K. Igarashi, K. Kashiwagi, Polyamines: mysterious modulators of cellular functions, Biochem. Biophys. Res. Commun. 271 (2000) 559–564. doi:10.1006/bbrc.2000.2601.
- [172] K. Igarashi, K. Kashiwagi, The functional role of polyamines in eukaryotic cells, Int. J. Biochem. Cell Biol. 107 (2019) 104–115. doi:10.1016/j.biocel.2018.12.012.
- [173] N. Seiler, F. Raul, Polyamines and apoptosis, J. Cell. Mol. Med. 9 (2005) 623–642. doi:10.1021/jp0652749.
- [174] S. Mandal, A. Mandal, H.E. Johansson, A. V. Orjalo, M.H. Park, Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 110 (2013) 2169–2174. doi:10.1073/pnas.1219002110.
- [175] E. Hollville, S.J. Martin, Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry, Curr. Protoc. Immunol. 2016 (2016) 14.38.1-14.38.24. doi:10.1002/0471142735.im1438s112.
- [176] K. Dobashi, M. Aihara, T. Araki, Y. Shimizu, M. Utsugi, K. Iizuka, Y. Murata, J. Hamuro, T. Nakazawa, M. Mori, Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN- $\gamma$  and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages, Clin. Exp. Immunol. 124 (2001) 290–296. doi:10.1046/j.1365-2249.2001.01535.x.
- [177] Y. Murata, T. Shimamura, J. Hamuro, The polarization of Th1/Th2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production, Int. Immunol. 14 (2002) 201–212. doi:10.1093/intimm/14.2.201.
- [178] C.N. Paiva, D.F. Feijó, F.F. Dutra, V.C. Carneiro, G.B. Freitas, L.S. Alves, J. Mesquita, G.B. Fortes, R.T. Figueiredo, H.S.P. Souza, M.R. Fantappiè, J. Lannes-Vieira, M.T. Bozza, Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice, J. Clin. Invest. 122 (2012) 2531–42. doi:10.1172/JCI58525DS1.
- [179] M.C. Paes, D. Cosentino-Gomes, C.F. de Souza, N.P. de A. Nogueira, J.R. Meyer-Fernandes, The role of heme and reactive oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*, J. Parasitol. Res. (2011) 174614. doi:10.1155/2011/174614.
- [180] R. Mukhopadhyay, S. Dey, N. Xut, D. Gaget, J. Lightbody, M. Ouellette, B.P. Rosen, Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*, Proc.

## 9. Referencias bibliográficas

- Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1996) 10383–10387. doi:10.1073/pnas.93.19.10383.
- [181] R. Article, Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms, 464 (2012) 453–464. doi:10.1042/BJ20111752.
- [182] A.-R. Phull, B. Nasir, I.U. Haq, S.J. Kim, Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis, Chem. Biol. Interact. 281 (2018) 121–136. doi:10.1016/j.cbi.2017.12.024.
- [183] C. Reigada, M. Sayé, E.V. Vera, D. Balcazar, L. Fraccaroli, C. Carrillo, M.R. Miranda, C.A. Pereira, *Trypanosoma cruzi* polyamine transporter: its role on parasite growth and survival under stress conditions, J. Membr. Biol. 249 (2016) 475–481. doi:10.1007/s00232-016-9888-z.
- [184] Y. Tzfati, H. Abeliovich, I. Kapeller, J. Shlomai, A single-stranded DNA-binding protein from *Crithidia fasciculata* recognizes the nucleotide sequence at the origin of replication of kinetoplast DNA minicircles., Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 6891–6895. doi:10.1073/pnas.89.15.6891.
- [185] V. Jimenez, Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*, Res. Microbiol. 6 (2008) 2166–2171. doi:10.1021/nl061786n.Core-Shell.
- [186] A. Hamed, L. Botelho, C. Britto, S.P. Fragoso, A.C.S. Umaki, S. Goldenberg, G. Bottu, D. Salmon, In vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression, Mol. Biochem. Parasitol. 200 (2015) 9–18. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.04.002.
- [187] A. V. Graça-Souza, C. Maya-Monteiro, G.O. Paiva-Silva, G.R.C. Braz, M.C. Paes, M.H.F. Sorgine, M.F. Oliveira, P.L. Oliveira, Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods, Insect Biochem. Mol. Biol. 36 (2006) 322–335. doi:10.1016/j.ibmb.2006.01.009.
- [188] M.M. Whitten, C.B. Mello, S.A. Gomes, Y. Nigam, P. Azambuja, E.S. Garcia, N.A. Ratcliffe, Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (*Reduviidae*)/*Trypanosoma rangeli* interactions, Exp. Parasitol. 98 (2001) 44–57. doi:10.1006/expr.2001.4615.
- [189] D.P. Castro, C.S. Moraes, M.S. Gonzalez, N.A. Ratcliffe, P. Azambuja, E.S. Garcia, *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development, PLoS One. 7 (2012) e36591.

doi:10.1371/journal.pone.0036591.

- [190] E.G.S.S. Carnieri, S.N.J.J. Moreno, R. Docampo, Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages, *Mol. Biochem. Parasitol.* 61 (1993) 79–86. doi:10.1016/0166-6851(93)90160-Y.
- [191] Z. González-Chávez, V. Olin-Sandoval, J.S. Rodríguez-Zavala, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, Metabolic control analysis of the *Trypanosoma cruzi* peroxide detoxification pathway identifies tryparedoxin as a suitable drug target, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850 (2015) 263–273. doi:10.1016/j.bbagen.2014.10.029.
- [192] M.C. Taylor, J.M. Kelly, pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*, *BMC Biotechnol.* 6 (2006) 32. doi:10.1186/1472-6750-6-32.
- [193] M.M. Salazar, Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud Techniques for detecting in vitro apoptosis and cell senescence and their importance in health biotechnology, *Rev. Colomb. Biotecnol.* XI (2009) 152–166.
- [194] S. Nagata, M. Tanaka, Programmed cell death and the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 17 (2017) 333–340. doi:10.1038/nri.2016.153.
- [195] M. Lamkanfi, V.M. Dixit, Manipulation of host cell death pathways during microbial infections, *Cell Host Microbe.* 8 (2010) 44–54. doi:10.1016/j.chom.2010.06.007.
- [196] K. Mohareer, S. Asalla, S. Banerjee, Cell death at the cross roads of host-pathogen interaction in *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Tuberculosis.* 113 (2018) 99–121. doi:10.1016/j.tube.2018.09.007.
- [197] A. Flieger, F. Frischknecht, G. Haecker, M.W. Hornef, G. Pradel, Pathways of host cell exit by intracellular pathogens, *Microb. Cell.* 5 (2018) 525–544. doi:10.15698/mic2018.12.659.
- [198] F. Schaumburg, D. Hippe, P. Vutova, C.G.K. Lüder, Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites, *Parasitology.* 132 (2006) S69. doi:10.1017/S0031182006000874.
- [199] L.M.D.D. Magalhães, A. Viana, A.C. de Jesus, E. Chiari, L. Galvão, J.A. Gomes, K.J. Gollob, W.O. Dutra, Distinct *Trypanosoma cruzi* isolates induce activation and apoptosis of human neutrophils, *PLoS One.* 12 (2017) 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0188083.

## 9. Referencias bibliográficas

- [200] D. Moore-Lai, E. Rowland, Microarray data demonstrate that *Trypanosoma cruzi* downregulates the expression of apoptotic genes in BALB/c fibroblasts, *J. Parasitol.* 90 (2004) 893–895. doi:10.1645/GE-146R.
- [201] E.M. de Souza, T.C. Araújo-Jorge, C. Bailly, A. Lansiaux, M.M. Batista, G.M. Oliveira, M.N.C. Soeiro, Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models, *Cell Tissue Res.* 314 (2003) 223–235. doi:10.1007/s00441-003-0782-5.
- [202] C.A. Hunter, S.A. Jones, IL-6 as a keystone cytokine in health and disease, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 448–457. doi:10.1038/ni.3153.
- [203] S. Rose-John, K. Winthrop, L. Calabrese, The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications, *Nat. Rev. Rheumatol.* 13 (2017) 399–409. doi:10.1038/nrrheum.2017.83.
- [204] L.J. Scott, Tocilizumab: a review in rheumatoid arthritis, *Drugs.* 77 (2017) 1865–1879. doi:10.1007/s40265-017-0829-7.
- [205] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, V.K. Kuchroo, IL-17 and Th17 Cells, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 485–517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
- [206] J.S. Stumhofer, J.S. Silver, A. Laurence, P.M. Porrett, T.H. Harris, L.A. Turka, M. Ernst, C.J.M. Saris, J.J. O’Shea, C.A. Hunter, Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 1363–71. doi:10.1038/ni1537.
- [207] M.J. McGeachy, K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, D.J. Cua, TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 1390–1397. doi:10.1038/ni1539.
- [208] Q. Qian, X. Cao, B. Wang, Y. Qu, Q. Qian, Z. Sun, F. Feng, TNF- $\alpha$ -TNFR signal pathway inhibits autophagy and promotes apoptosis of alveolar macrophages in coal worker’s pneumoconiosis, *J. Cell. Physiol.* (2018). doi:10.1002/jcp.27061.
- [209] N.K. Saini, R. Sinha, P. Singh, M. Sharma, R. Pathak, N. Rathor, M. Varma-Basil, M. Bose, Mce4A protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces pro inflammatory cytokine response leading to macrophage apoptosis in a TNF- $\alpha$  dependent manner, *Microb. Pathog.* 100 (2016) 43–50. doi:10.1016/j.micpath.2016.08.038.
- [210] G.D. Kalliolias, L.B. Ivashkiv, TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic

## 9. Referencias bibliográficas

- strategies, *Nat. Rev. Rheumatol.* 12 (2016) 49–62. doi:10.1038/nrrheum.2015.169.
- [211] J.D. Shearer, J.R. Richards, C.D. Mills, M.D. Caldwell, Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing, *Am. J. Physiol. Metab.* 272 (1997) E181–E190. doi:10.1152/ajpendo.1997.272.2.E181.
- [212] M. Munder, K. Eichmann, M. Modolell, Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4<sup>+</sup> T cells correlates with Th1/Th2 phenotype, *J. Immunol.* 160 (1998) 5347–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605134> (accessed January 9, 2019).
- [213] E.S. Garcia, M.S. Gonzalez, P. de Azambuja, F.E. Baralle, D. Fraidenraich, H.N. Torres, M.M. Flawia, Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the gut of the hematophagous insect vector, *Rhodnius prolixus*, by hemoglobin and peptides carrying  $\alpha$ D-globin sequences, *Exp. Parasitol.* 81 (1995) 255–261. doi:10.1006/expr.1995.1116.
- [214] M.C. Vanrell, A.D. Losinno, J.A. Cueto, D. Balcazar, L.V. Fraccaroli, C. Carrillo, P.S. Romano, The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) e0006049. doi:10.1371/journal.pntd.0006049.
- [215] T.C.L. De Jesus, V.S. Nunes, M.D.C. Lopes, D.E. Martil, L.K. Iwai, N.S. Moretti, F.C. Machado, M.L. De Lima-Stein, O.H. Thiemann, M.C. Elias, C. Janzen, S. Schenkman, J.P.C. Da Cunha, Chromatin proteomics reveals variable histone modifications during the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, *J. Proteome Res.* 15 (2016) 2039–2051. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00208.
- [216] G.F.A. Picchi, V. Zulkievicz, M.A. Krieger, N.T. Zanchin, S. Goldenberg, L.M.F. De Godoy, Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* canonical and variant histones, *J. Proteome Res.* 16 (2017) 1167–1179. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00655.
- [217] M. Fritz, J. Vanselow, N. Sauer, S. Lamer, C. Goos, T.N. Siegel, I. Subota, A. Schlosser, M. Carrington, S. Kramer, Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 8013–8032. doi:10.1093/nar/gkv731.
- [218] A. Cassola, J.G. De Gaudenzi, A.C. Frasch, Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes, *Mol. Microbiol.* 65 (2007) 655–670. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05833.x.

## 9. Referencias bibliográficas

- [219] M.A. Romaniuk, G. Cervini, A. Cassola, Regulation of RNA binding proteins in trypanosomatid protozoan parasites, *World J. Biol. Chem.* 7 (2016) 146–57. doi:10.4331/wjbc.v7.i1.146.
- [220] H.H. Wippel, J.S. Malgarin, S. de T. Martins, N.M. Vidal, B.H. Marcon, H.T. Miot, F.K. Marchini, S. Goldenberg, L.R. Alves, The nuclear RNA-binding protein RBSR1 interactome in *Trypanosoma cruzi*, *J. Eukaryot. Microbiol.* (2018). doi:10.1111/jeu.12666.
- [221] F.B. Holetz, A. Correa, A.R. Ávila, C.V. Nakamura, M.A. Krieger, S. Goldenberg, Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356 (2007) 1062–1067. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.104.
- [222] C. Oliveira, P.C. Carvalho, L.R. Alves, S. Goldenberg, The role of the *Trypanosoma cruzi* TcNRBD1 protein in translation, *PLoS One.* 11 (2016) e0164650. doi:10.1371/journal.pone.0164650.
- [223] N.S. Moretti, I. Cestari, A. Anupama, K. Stuart, S. Schenkman, Comparative proteomic analysis of lysine acetylation in trypanosomes, *J. Proteome Res.* 17 (2018) 374–385. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00603.
- [224] F.K. Marchini, L.M.F. de Godoy, R.C.P. Rampazzo, D.P. Pavoni, C.M. Probst, F. Gnad, M. Mann, M.A. Krieger, Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome, *PLoS One.* 6 (2011) e25381. doi:10.1371/journal.pone.0025381.
- [225] F.B. Holetz, L.R. Alves, C.M. Probst, B. Dallagiovanna, F.K. Marchini, P. Manque, G. Buck, M.A. Krieger, A. Correa, S. Goldenberg, Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*, *FEBS J.* 277 (2010) 3415–3426. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07747.x.
- [226] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning*, 2001. doi:10.1074/jbc.270.23.13757.
- [227] D.B. Evans, D. Godfrey, S. Lanham, F. Lanotte, Geneviève, Modabber, *Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania geneva*: World Health Organization, 1989. <http://www.who.int/iris/handle/10665/60795>.
- [228] V.T. Contreras, T.C. Araujo-Jorge, M.C. Bonaldo, N. Thomaz, H.S. Barbosa, M.N. Meirelles, S. Goldenberg, Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83 (1988) 123–133. doi:S0074-02761988000100016 [pii].

## ANEXO A

Secuencia codificante y UTRs (resaltadas en gris) del gen *trys* de *T. cruzi*. (GenBank: AF311782, 3106 pb [90]).

1 gtcgacgatc aaccctggcc gcaccgcgct gtaccctggt ctgcctctc caagaacact  
61 gctggaggcg gacggttggg tcggcaaacg ccgcgagtta gttgaggcca ttgagacgga  
121 gggacgtagt ttgatgcgtg ggacgcaacg tgcgttgac gggagtgcca tcacaccgag  
181 ggaggactc acagatattc gtgtcttgg tcgtgagcgg gagctgaaga agatgctcga  
241 gggggagcgg gcaacggcag cgcaggagg atataacaca accggcggca gcagtaatcc  
301 gtcggcgaat gtatcgttc gtccaggcat caatcagttg tgaggggagt cgtgtctgcc  
361 tgccgcgtga atcaaacaaa caaacaaaaa aaacaaaaaa cgcaaatgag tcctgcctt  
421 ttttctgcc gacttatggc ttgcccatt acctcgttg atttctgtt tattattatt  
481 attatattt tttttgtt ttgcgctgg cttctctgg gctctctt gttgtgctg  
541 ttgctgtgt tgctgtcgg caaacacgag cgccgagcac cagtcggta gagttttat  
601 cagcaacgga gggaagagga ttatttttag gaagcatcaa ggcaagtcgt aaatataagc  
661 ggcaacgaa aaacaacagc aacgacaaaa attaaccgaa aggggaaata ataaaaaaaa  
721 aaaaaacgaa aaaaagcact cagcgtggca gggagaaatt gtgacagtt tgccatttg  
781 gaagtgaaaa cgaaataaa ttataattt tacgataaaa ataaaataaa attcaaatt  
841 tttttggtc tttttttc ttatagcatt aaaaaaaaaa aaaagaagag ggggaaaaag  
901 aaaaaggaag aaggagggga gataaaaatt ttaatacaag acaaaaacta taaaaggaga  
961 aggcaacaaa tgacgactc aaagtcttg gcggtacat ttggctgtg gcaaggctat  
1021 gccctggcg gtattcctgc gtacagtaac aagcatgaat cgtactttc tggggagcga  
1081 agcattgatg gaaattgtt ttgtgggtc aagtaccagt gcgtggagtt tgcgcccga  
1141 tggttgttg agcgtgaagc ttggttctt cccgatgtg actgggctgt gcacatctt

## 9. Referencias bibliográficas

1201 aatttaaagg aggtttcgga tgcgcgcacg ggacaacctg ttcgttgcgt ggcgattcgt  
1261 aatggtaccg cggcgaaacc cgtggtcgac tcgcttcta tttaccctc cgacgattat  
1321 agcccagtgg gccatgtcgc tgccattacg gaggttgggg acaagtgggt gcgcattgcc  
1381 gatcaaaacc atcggtttca caagtgggat gctaattatg cggcagagct gccgctgatt  
1441 cacgagaagg gcgtctggac gattttggat ccgttggagg atgaagtgct gaagcctctc  
1501 ggggtgggtga ctttccgga gacaccgat cgcaaccga atgagccgct ggttctacac  
1561 gagtcgcttc acttcaaacg gggggaagtg ccaacgctgc gtcgtctgac atttacacca  
1621 aattcgcggg aaaaggattg gctggatctc acgaatgaag ccgaggcgta cttcgcgggt  
1681 gtctgtgta tcgattgaa gaatccgaaa gtggaaaaag ccagttacta tcagatgaac  
1741 cgggagcttt attggactg ctcaaatac ggcaatcaac ttcatacaat gttttggag  
1801 gccaccaagt tcgtcattgg aagtgcgaa cagctaagac ttttcacat tccagaggag  
1861 tactggccgc gtctcgata tttgtgggag acacaaccgc atgccatcac gggacgcttt  
1921 gatttgcct ttgacgagga tacgcagcaa ttaagtgc ttgagtacaa cgctgatag  
1981 gcctcaacac tgctggagt cggcggtatt caacaaaagt gggcgagatc agttggtctc  
2041 gatgacggga cgacgtacag ttctgggagt ttgatttct cactgactgca attggcatgg  
2101 gaaatggcag gagtcaccg acgtgtacac ttcttatcg acaaggatga tgaggagat  
2161 tacaccgct tnatgttat gcagcagct tctgcggcag gattggagac aaaactgtgc  
2221 gttctttcg atgaattca tttgatgag aatggcgtc ttgtggactc cgatggcgtc  
2281 gccgtcaca cgggtggaa gacatggatg tgggagactg ccatcgaga tcatcagaag  
2341 gcccggtgc agcgcgggaa tgattggcg ccaacgcaa aggatgaggt tcggctttgt  
2401 gacattctc ttggccgaa ctgggacatg cgtgtgttg agccatgtg gaaaattatt  
2461 tccagcaaca aggctatct acccattatt tacaacaagc acccagacca tccagcgtg  
2521 ctgcgggcca gctatgaact cacgattgag ctgcagcga ccggttacgt gaagaagccc  
2581 atcgttggc gtgtcgtcg aatgtcacc gtcacagagg catctggtga cattgccg  
2641 aatcggatg gaaattttt ggatcgcgac atggtctacc aagagcttt tcgctgccc



## 9. Referencias bibliográficas

2701 gagagggatg gctactacgc catactcggc ggctgggtga ttggcgatgt ctactgcggc

2761 actggtgtcc gcgaggacac gacaatcatt acgggactcg agtcaccatt cagagccctt

2821 cgagtgtatc agggcgccca gcgacgtcca ctgacccacg aagatcttga caacgcggaa

2881 gccgcggccg tcggtggtgg cttgaaaacg tgagaatgaa aggtggggga aaagtaccag

2941 acgcccctct caccaagccg gttcaccagc aaattggcga agggaaacgc aattcttga

3001 ggggtttcgt acctcatag ttatattta gaaactgtaa atgcaatfff gttgcatccc

3061 cgcacaaaga gaaagacgaa atgattcggg ctctatctct ggtacc

## ANEXO B

Oligonucleótidos utilizados en este trabajo				
N°	Nombre	Secuencia	<i>T<sub>m</sub></i> (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
1	Tctrys-F	5'-GCGAATTCACATGACGACTCTAAAGTCTTTG-3'	61	1940
2	Tctrys-R	5'-GACAAGCTTTCACGTTTTCAAGCCACCACC-3'	66	1940
3	trys Amid-R	5'-AAGCTTTCAACCACAGACATCCGCGA-3'	65	N/A
4	trys Syn-F	5'-GGATCCATCGATGTGAAGAATCCGAA-3'	61	N/A
5	neo-F	5'-ATCTGGACGAAGAGCATCAGG-3'	59	320
6	neo-R	5'-AGAACTCGTCAAGAAGGCGA-3'	58	320
7	T7-F	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	49	900
8	RIB-R	5'-GTGTGTACTTGTGCGCAT-3'	55	900
9	Tc18S F	5'-TAGTCATATGCTTGTTTC-3'	44	N/A
10	Tc18S R	5'-GCAACAGCATTAAATATACGC-3'	51	N/A
11	gapdh F	5'-TGTGATGGGTGTGAACCACGAGA-3'	63	N/A
12	gapdh R	5'-GAGCCCTTCCACAATGCCAAAGT-3'	63	N/A

## ANEXO C

Esquema del vector pTREX.TryS

