



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de química biológica

“Metabolismo del hemo en Trypanosomátidos y aplicación de derivados tetrapirrólicos con fines terapéuticos”

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

VANESA ROCIO PUENTE

Director de Tesis: Dra. Maria Elisa Lombardo

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Cánepa

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias – CIPYP -
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Hospital de
Clínicas “José de San Martín” - Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2022

“Metabolismo del hemo en Trypanosomátidos y aplicación de derivados tetrapirrólicos con fines terapéuticos”

En esta tesis abordaremos el estudio del metabolismo del hemo en *Trypanosoma cruzi*, así como alternativas terapéuticas para la enfermedad de Chagas, la cual afecta a más de 7 millones de personas en el mundo y cuya terapéutica actual es poco eficaz. Se sabe que *Trypanosoma cruzi* es un organismo hemodeficiente, por lo tanto, necesita tomar el hemo necesario de su entorno. El camino metabólico del hemo comienza con la síntesis de un metabolito específico de esta vía, el ácido 5 aminolevúlico (ALA) y su producción es catalizada por una enzima específica llamada ALA Sintetasa (ALA-S), la cual es capaz de producir ALA a partir de succinil-CoA y glicina. A pesar de la probada hemodeficiencia del parásito hemos podido detectar y cuantificar de forma específica la presencia de ALA tanto extracelular como intracelular y una secuencia proteica (TcPHem1), la cual podría codificar para una enzima tipo aminotransferasa clase II, regulada por los niveles de hemo y capaz de tomar succinil-CoA y acetil CoA como sustratos generando ALA o aminoacetona (AA) respectivamente.

Por otro lado, la captación y/o disponibilidad de hemo por parte del parásito ha sido postulada, entre otras, como un posible blanco terapéutico. Los análogos estructurales de estos compuestos son considerados como posibles drogas con efectos tripanocidas. Es por esto que estudiamos la capacidad de la aminoporfirina A4, una porfirina sintética, como posible antichagásico para ser utilizada para tratar la sangre en los bancos de sangre. Otra de las drogas estudiadas en esta tesis es la vitamina C, la cual, estructuralmente no es un análogo del hemo, pero se vio que en combinación con Vitamina B12 y Bnz o sola podía tener efectos anti-*T.cruzi*. Los resultados *in vitro* e *in vivo* para esta droga alientan a considerar su combinación con Benznidazol como alternativa terapéutica para tratar la enfermedad de Chagas

Palabras Claves: *Trypanosoma cruzi*, Ácido 5 aminolevúlico, Vitamina C, Porfirina A4

“Heme metabolism in Trypanosomatids and application of tetrapyrrolic derivatives for purposes therapeutic”

In this thesis we addressed the study of heme metabolism in *Trypanosoma cruzi*, as well as therapeutic alternatives for Chagas disease. that affects more than 7 million people in the world and for which current therapy is ineffective. *Trypanosoma cruzi* is known to be a hemodeficient organism, therefore it needs to take the necessary heme from its environment. The heme metabolic pathway involves the synthesis of a specific metabolite of this pathway, 5-aminolevulinic acid (ALA), and its production is due to the presence of a specific enzyme, the ALA-S enzyme, which is capable of producing ALA from succinyl-CoA and glycine. Despite the proven hemodeficiency, we have been able to specifically detect and quantify the presence of both extracellular and intracellular ALA, as well as a single candidate protein sequence (which we call TcpHem1) that could code for a ligase-type enzyme capable of taking succinyl-CoA and acetyl CoA and producing ALA or aminoacetone, respectively, as well as that it is possible that its regulation is given by the heme levels in the culture medium of the parasite.

On the other hand, the heme uptake and/ or availability to the parasite has been postulated, among others, as a possible therapeutic target. The avidity of the parasite for porphyrin or heme compounds has led to consider their structural analogs as possible drugs with trypanocidal effects. This is why we have studied the capacity of Porphyrin A4, a synthetic porphyrin, as a possible antichagasic agent to be used to treat blood in blood banks. Another of the drugs studied in this thesis is vitamin C, which structurally, is not an analogue of heme, but it was seen that in combination with Vitamin B12 and Bnz or alone it could have anti-*T.cruzi* effects. The *in vitro* and *in vivo* results for this drug encourage us to consider its combination with Benznidazole as a therapeutic alternative to treat Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, 5- aminolevulinic acid, Vitamin C, Porphyrin A4

Agradecimientos

Agradecer es un acto hermoso y muy difícil. Realmente son muchas las personas que hicieron posible esta tesis. No creo que este trabajo haya sido producto de una sola persona, sino, que, por el contrario, el producto de muchas personas que, mas allá de si estuvieron en la mesada o no, gestaron, con su presencia y sus actos, las condiciones favorables para que esta tesis se materializara. Intentaré, por ende, nombrar a cada una de ellas y espero, poder plasmar en estas palabras un poco de todo el agradecimiento que siento:

Empiezo con mi directora, la increíble Dra Elisa Lombardo. Como ya le he dicho alguna vez, ella fue mi guía en todo este camino y reafirmo en mí el amor que siento por esta hermosa profesión. Ella hizo de mi experiencia doctoral un hermoso momento en mi vida de donde me llevo las mejores enseñanzas, pues estuvo codo a codo conmigo en la mesada procurando que yo aprendiera hasta el más mínimo detalles y además el modelo de profesional que deseo ser.

También agradezco al CIPYP y a sus directivos, pues me abrieron las puertas a la investigación y me permitieron realizar este hermoso proyecto, del cual estoy muy orgullosa. Y a los compañeros que tanto me apoyaron en cada etapa de este hermoso recorrido

Al Dr Esteban Bontempi, del FATALA, quien me guio y ayudó enormemente con toda la parte relacionada al clonado y obtención de la proteína recombinante. Su aporte fue clave para poder terminar esta tesis

Al CONICET, quien me dio la beca doctoral con la cual poder hacer esta tesis, y la posdoc, con la cual podré seguir trabajando de lo que amo.

A Exactas, no puedo dejar de agradecer a aquella institución donde me formé, donde pasé los mejores días de mi vida y que tanto me enseñó, además de los subsidios y apoyos económicos para el desarrollo del trabajo de investigación. Soy una orgullosa egresada de la universidad pública.

A los hermosos amigos y amigas que hice en estos 5 años: Lau, Lubna, Gus, Marie Y Sandri. Fue hermoso compartir con ellos y ellas cada momento. Su apoyo, sus mates y su amor me hicieron llegar hasta acá. Gracias por acompañarme como lo hicieron.

A mis amigas de la vida: Karu y Alu. Ellas me han apoyado desde antes de empezar esta hermosa carrera y han estado conmigo cuando creía que no podía. Me soportaron para que llegara hasta acá y mucho más.

A Vero y Ro: hermosas amigas que me dio la vida y que también estuvieron ahí cuando creí que no podía.

A Carlos, mi gran compañero. No importa de que forma sea, el siempre estuvo y aún está. Agradezco a la vida por haberlo conocido.

A mi mamá, mi ejemplo, mi sostén, mi guía siempre. La persona más importante en mi vida.

A papi y hermano. Ellos siempre acompañaron.

A vos Abu, que de seguro me estas mirando y estas muy orgullosa y feliz por mi, donde sea que estes. La persona que extraño todos los días.

De seguro hay mas gente que no estoy nombrando, pero a todos ellos y ellas también les digo gracias. Hoy me siento feliz, no solo por este trabajo, sino por todas las personas hermosas que estan en mi vida y a quienes dedico esta tesis.

Abreviaturas

AA: Aminoacetona

ABCB10: ATP-binding cassette B10

AA-S: Aminoacetona Sintetasa

ACO: Acetil-CoA

ALA: Ácido 5 aminolevúlico o levulínico

ALA-D: Ácido 5 aminolevúlico dehidrasa.

ALA-S: Ácido 5 aminolevúlico sintetasa

A-Px: Ascorbato peroxidasa

ASB: Albúmina sérica bovina

Bnz: Benizdazol

CC₅₀: Concentración citotóxica 50

COPROgenIII: Coproporfirinógeno III

CPGasa: Coproporfirinógeno oxidasa

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOVA: Ácido 4,5-dioxovalérico

DOVA-T: Ácido 4,5-dioxovalérico transaminasa

DNTB: 5,5dithio-bis ácido2-nitrobenzoico

DTU: Unidades discretas de tipificación

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

FECH: Ferroquelatasa

GSH: Glutation

GSH-Px: Glutación peroxidasa

H₂DCFDA: Diacetato de 2', 7'- diclorodihidrofluoresceina.

HMB: Hidroximetilbilano

HMB-S: Hidroximetilbilano sintetasa

HO: Hemoxigenasa

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

KBL: 2-amino-3-cetobutirato Coenzima A Ligasa

MFRN1: Mitoferrina 1

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido

Nfx: Nifurtimox

PBG: Porfobilinógeno

PBG-D: Porfobilinógeno deaminasa

PBS: Buffer fosfato salino

PORFIRINA A4: 5,10,15,20-tetra[4-N,N,N-trimetilamoniofenil]porfirina p-tosilato

PPGasa: Protoporfirinógeno oxidasa

PROTO IX: Protoporfirina IX

PROTOgenIX: Protoporfirinógeno IX

PSSM: Matriz de puntuación sitio-específica

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SCA: Succinil-CoA

SOD: Superóxido dismutasa

Tpx-Px: Triparredoxina peroxidasa

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

Try: Tripanotiona.

Try-R: Tripanotiona reductasa

URO-D: Uroporfirinógeno decarboxilasa

UROgenIII: Uroporfirinógeno III

URO-S: Uroporfirinógeno III sintetasa

WHO: World Health Organization

Índice

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1.....	11
Metabolismo del hemo.	11
1.1 Hemo: definición, estructura y función.....	12
1.2 Biosíntesis de hemo	13
1.3 Catabolismo del hemo	16
1.4 Aspectos clínicos del metabolismo del hemo	18
1.5 La enzima 5-aminolevulónico Sintetasa (ALA-S).....	18
1.5.1 Características generales	18
1.5.2 Mecanismo de acción	21
1.5.3 Características genómicas del ALA-S en los distintos organismos	23
1.6 Biosíntesis del hemo en tripanosomátidos.....	28
Capítulo 2.....	31
<i>Trypanosoma cruzi</i> y Enfermedad de Chagas	31
2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
2.1.1 Clasificación	32
2.1.2 Estadios morfológicos y ciclo de vida	33
2.1.3 El genoma de <i>T. cruzi</i>	35
2.2 Enfermedad de Chagas	36
2.2.1 Descripción general y distribución	36
2.2.2 Formas de transmisión.....	37
2.2.3 Signos y síntomas.....	38
2.2.4 Tratamiento	39
2.2.5 Rutas metabólicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> con potencial terapéutico	44
Capítulo 3.....	51
Hipótesis y objetivos.....	51
3.1 Hipótesis	52
3.2 Objetivos	54

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.....	57
Cepas y líneas celulares.....	58
Reactivos	58
Métodos.....	58
4.1 Cultivos y mantenimiento de las cepas y líneas celulares	59
4.2 Expresión heteróloga y caracterización de la proteína codificada por la secuencia TcCLB.511071.140.	60
4.2.1 Estudios bioinformáticos	60
4.2.2 Obtención de la proteína recombinante	61
4.2.3 Caracterización de la proteína recombinante.....	64
4.3 Evaluación de la actividad anti- <i>T. cruzi</i>	66
4.3.1 Ensayos <i>in vitro</i>	66
4.3.2 Ensayos <i>in vivo</i>	70
4.4 Análisis estadístico	71

RESULTADOS

Capítulo 5.....	74
Metabolismo del Hemo en <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
5.1 Análisis bioinformáticos de la secuencia candidata a codificar la enzima ALA-S	75
5.1.1 Búsqueda de una secuencia candidata.....	75
5.1.2 Estudio de la localización celular de la secuencia en estudio.....	78
5.1.3 Identificación de dominios funcionales y estructura secundaria de la proteína TcHem1.....	80
5.1.4 Comparación de la secuencia de la proteína TcHem1 con otras proteínas de la familia.....	83
5.1.5 Docking molecular con succinil-CoA y acetil-CoA.....	84
5.2 Detección y cuantificación de ALA intra y extracelular	87
5.2.3 Cuantificación de ALA en el medio intra y extracelular del parásito	91
5.2.4 Efecto del hemo sobre el contenido de ALA extracelular	92
5.3 Obtención y caracterización de la proteína recombinante TcHem1	94
5.3.1 Actividad de ALA-S y AA-S en la proteína recombinante TcHem1	99
5.4 Conclusiones parciales del Capítulo 5	103
Capítulo 6.....	105
Efecto tripanocida de la Vitamina C y de la Porfirina sintética A4	105

Vitamina C	106
6.1 Ensayos <i>in vitro</i>	106
6.1.1 Evaluación de la actividad anti- <i>T.cruzi</i> de la Vitamina C	106
6.1.3 Evaluación del estado redox del parásito en presencia de Vit C + Bnz.....	109
6.2 Ensayos <i>in vivo</i> de la Vitamina C	111
6.2.1 Evaluación de la actividad tripanocida de la Vitamina C	111
6.2.2 Evaluación de la citotoxicidad del Bnz <i>in vivo</i>	113
Porfirina A4	114
6.3 Ensayos <i>in vitro</i>	114
6.3.1 Evaluación de la actividad anti- <i>T.cruzi</i>	114
6.3.2 Comportamiento espectral de A4	116
6.4.2 Agregado de A4 en sangre	118
6.5 Conclusiones parciales del Capítulo 6	120
Conclusiones Finales	121
Referencias	124

Introducción

Capítulo 1

Metabolismo del hemo

	Página
1.1 Hemo: definición, estructura y función.....	12
1.2 Biosíntesis de hemo.....	13
1.3 Catabolismo del hemo.....	15
1.4 Aspectos clínicos del metabolismo del hemo.....	17
1.5 La enzima 5-aminolevúlico sintetasa (ALA-S).....	18
1.6 Biosíntesis del hemo en tripanosomátidos.....	27

En este capítulo haremos una descripción estructural y funcional del grupo hemo, se detallará la secuencia de reacciones involucradas en su síntesis y degradación, y las patologías originadas por alteraciones en esta vía metabólica. Luego se llevará a cabo una descripción de la enzima 5-aminolevúlico sintetasa, que es la responsable de regular la formación de hemo, finalizando con una descripción de los conocimientos que se tiene acerca de la funcionalidad de esta vía en tripanosomátidos.

1.1 Hemo: definición, estructura y función

El hemo pertenece a un grupo de compuestos tetrapirrólicos cíclicos conocidos con el nombre genérico de “porfirinas”. La estructura del hemo (Figura 1.1) es planar, rígida y aromática y está formada por cuatro anillos pirrólicos (A, B, C y D) unidos entre sí por cuatro enlaces meteno ($=CH-$), que además contienen cadenas laterales sustituyentes en los carbonos de cada pirrol. En el centro del anillo se ubica un átomo de hierro ferroso (Fe^{2+}), que se une a los cuatro nitrógenos apicales de los cuatro pirroles. En el caso de tener en su cavidad central al hierro férrico (Fe^{3+}), la estructura corresponde a la metahemoglobina.

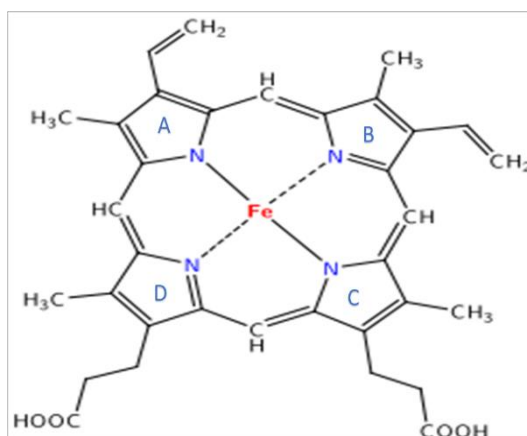


Figura 1.1: Estructura del hemo.

En cuanto a sus funciones, el hemo forma parte de hemoproteínas fundamentales para el metabolismo celular. El grupo hemo puede actuar como transportador de electrones, en los citocromos, como transportador de oxígeno, en la hemoglobina y mioglobina y constituyendo enzimas de vital importancia como catalasa y peroxidasa. Esto sólo representa una parte de un papel mucho más amplio y complejo. Se ha descrito que el hemo actúa como regulador de la expresión de varios factores de transcripción. Se le ha relacionado también con el control en canales iónicos de potasio activados por calcio (Tang *et al.*, 2003) y en la regulación del ciclo circadiano (Imaizumi *et al.*, 2007). Recientemente, se le ha adjudicado un papel preponderante en la enfermedad de Alzheimer, aunque

aún no se sabe si la deficiencia del hemo puede ser una causa del síndrome (Chernova *et al.*, 2011) o si es consecuencia de los cambios dramáticos que se suscitan con la enfermedad.

El hemo desarrolla un rol regulatorio en la síntesis de algunas proteínas como ser los citocromos, la mieloperoxidasa, la hemooxigenasa-1, el receptor de transferrina y la primera enzima de su propia síntesis denominada 5-aminolevulónico sintetasa – ALA-S (Kuhl & Imhof, 2014). Sin embargo, contrariamente al importante papel que desempeña el hemo para la supervivencia de la célula, altas concentraciones del mismo manifiestan un notable efecto citotóxico (Kumar & Bandyopadhyay, 2005). Los efectos tóxicos del hemo están dados por la oxidación, formación de uniones cruzadas y agregación de las proteínas y su ruptura en pequeños péptidos. Por otro lado, produce degradación de lípidos por peroxidación y daña el ADN mediante estrés oxidativo. Al presentar propiedades lipofílicas, puede insertarse en las bicapas lipídicas de las membranas celulares y organelas, como la mitocondria o el núcleo, y desorganizar el citoesqueleto (Gafer-Gvili *et al.*, 2013).

1.2 Biosíntesis de hemo

La síntesis de las porfirinas ocurre prácticamente en todo tipo de organismos vivos (Batlle *et al.*, 1997). Sólo unos pocos microorganismos, bacterias del género *Haemophilus* y protozoos parásitos de la sangre como *Trypanosoma cruzi*, no son capaces de sintetizarlo y requieren de hemo o un derivado del mismo para su crecimiento (Madigan *et al.*, 2015).

El camino biosintético del hemo (Figura 1.2) transcurre entre la mitocondria y el citosol, e involucra ocho pasos; el primero y los tres últimos ocurren en la mitocondria, mientras que los cuatro restantes se llevan a cabo en el citoplasma. La biosíntesis comienza con la formación del ácido 5-aminolevulínico (ALA), para lo cual existen dos vías de síntesis diferentes la del ALA-sintetasa (ALA-S) y la vía de 5 átomos de carbono (vía de 5-C). En la reacción catalizada por el ALA-S, el ALA se origina por condensación de una molécula de glicina con una de succinil-CoA; mientras que en la vía de 5-C, se parte de glutamato el cual, previo pasaje a glutamil-tRNA y luego a glutamato-1-semialdehído, se convierte por acción de la glutamato-1-semialdehído aminotransferasa en ALA (Wu *et al.*, 2019). La secuencia de reacciones de la vía de 5-C se caracteriza por mantener la integridad del

esqueleto de 5 átomos de C que posee el glutamato. Mientras que el ALA-S se detecta en tejidos animales y bacterias no fotosintéticas, ambas vías coexistirían en plantas y microorganismos fotosintéticos donde la vía de 5-C sería dominante (Wu *et al.*, 2019).

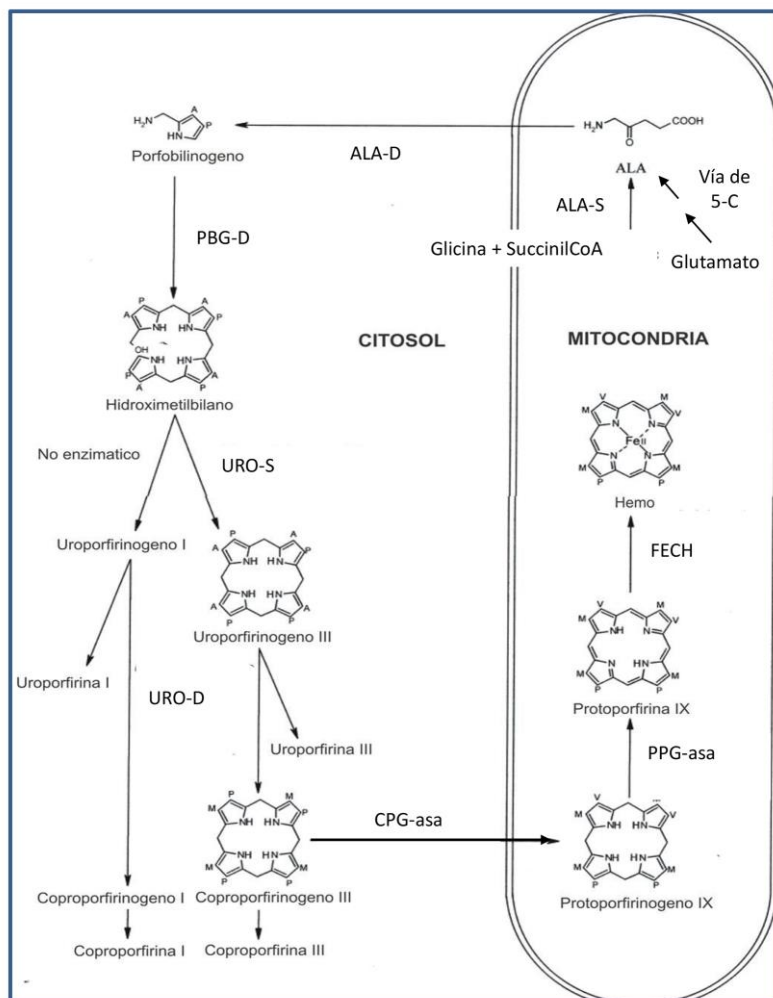


Figura 1.2: Camino biosintético del hemo. El esquema representa las enzimas involucradas, su localización celular y sus respectivos sustratos y productos (Adaptado de Wu *et al.*, 2019)

Posteriormente, el ALA sale de la mitocondria y una vez en el citosol, dos moléculas de ALA se condensan, en una reacción catalizada por la enzima ALA dehidratasa (ALA-D), para formar el monopirrol porfobilinógeno (PBG). A continuación, cuatro moléculas de PBG se polimerizan mediante la acción de la hidroximetilbilano sintetasa (HMB-S) o PBG deaminasa (PBG-D), formando un tetrapirrol no cíclico, inestable, denominado hidroximetilbilano (HMB). El HMB es el sustrato de la uroporfirinógeno III sintetasa (URO-S) que lo transforma, invirtiendo, lo que va a ser el anillo D, y

ciclando el tetrapirrol, en uroporfirinógeno III (UROgen III). El HMB también puede ciclarse no enzimáticamente formando el isómero I (UROgen I). Luego, El UROgen III se convierte en coproporfirinógeno III (COPROgen III) por la eliminación secuencial de los cuatro grupos carboxílicos de las cadenas laterales de ácido acético, en una reacción catalizada por la uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D).

La siguiente modificación es la decarboxilación oxidativa de los grupos propionato de los anillos pirrólicos A y B del COPROgen III para formar protoporfirinógeno IX (PROTOgen IX). Esta reacción es catalizada por la coproporfirinógeno oxidasa (CPGasa), una enzima localizada en el espacio intermembrana mitocondrial. El UROgen I también puede ser decarboxilado generando COPROgen I, pero sólo el COPROgen III puede ser convertido en protoporfirina IX. El PROTOgen IX se oxida a protoporfirina IX (PROTO IX) por la enzima protoporfirinógeno oxidasa (PPGasa), localizada en la cara externa de la membrana interna mitocondrial. Esta oxidación de seis electrones requiere oxígeno como aceptor terminal de electrones. El paso final en la vía biosintética ocurre en la superficie interna de la membrana mitocondrial, donde un ión Fe^{2+} se incorpora a la PROTO IX por acción de la ferroquelatasa (FECH) dando lugar a ferroprotoporfirina IX o hemo. La FECH forma parte de un complejo multienzimático compuesto por el importador de hierro mitocondrial mitoferrina 1 (MFRN1) y el transportador ABCB10 (del inglés ATP-binding cassette B10) permitiendo el acoplamiento de la importación de hierro a la mitocondria y su incorporación a la PROTO IX (Chen *et al.*, 2010). Un mínimo porcentaje de las hemoproteínas son de localización intramitocondrial, por lo que mayoritariamente el hemo sale de la mitocondria.

En condiciones normales, la biosíntesis del grupo hemo es extremadamente eficiente, con un uso casi total de los intermediarios de porfirina. Salvo casos patológicos, no se detectan porfirinas libres en las células. La síntesis del hemo, se regula a nivel del ALA-S que es la enzima limitante de la vía. En levaduras, existen evidencias experimentales que postulan al ALA-D, más que al ALA-S, como enzima regulatoria del camino biosintético del hemo (Araujo *et al.*, 1998).

1.3 Catabolismo del hemo

La principal vía de degradación del hemo (Figura 1.3) es catalizada por la enzima Hemo-oxigenasa (HO). Esta enzima es limitante en el catabolismo del hemo y tiene un rol crítico en la homeostasis del hierro, la defensa antioxidante y en los caminos de señalización que emplean al monóxido de carbono (CO) como segundo mensajero (Weng *et al*, 2003). Existen tres isoformas de esta enzima en mamíferos HO-1, HO-2 y HO-3. La HO-1 es inducible y su función principal es la degradación de hemo. HO-2 es constitutiva, se encuentra en concentraciones elevadas en encéfalo donde, además de degradar el hemo, actúa manteniendo la autorregulación del flujo sanguíneo y como mecanismo de defensa antioxidante previniendo la muerte celular causada por estrés oxidativo. La HO-3 no tiene asignado aún un rol fisiológico y su actividad catalítica es baja (Kikuchi *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2006).

El primer paso que experimenta el hemo en su catabolismo es la separación de la apoproteína que lo acompaña, que posteriormente se hidroliza en sus aminoácidos constituyentes. El hemo es liberado al citoplasma de la célula reticuloendotelial donde es degradado por la HO microsomal. Esta reacción requiere de oxígeno molecular y NADPH. La HO produce la apertura del anillo tetrapirrólico del hemo. Como producto de este paso de oxidación el hierro es liberado como hierro férrico (Fe^{3+}), se obtiene un tetrapirrol lineal denominado biliverdina y uno de los carbonos del puente meteno se convierte en monóxido de carbono (Sato *et al*, 2007). El segundo paso implica la reducción de la biliverdina dando lugar a la formación de bilirrubina (bilirrubina indirecta). Esta reacción es catalizada por la enzima citosólica biliverdina reductasa. Una vez formada la bilirrubina, la misma se asocia a la albúmina, debido a su poca solubilidad en soluciones acuosas a pH fisiológico, y es transportada al hígado donde tienen lugar el resto de las reacciones catabólicas. Bajo condiciones normales, el 98-99 % de la bilirrubina es conjugada por la UDP glucuronil transferasa. Esta enzima, ubicada en el retículo endoplasmático de los hepatocitos, es responsable de la detoxificación de un amplio grupo de xenobióticos. La misma adiciona dos equivalentes de ácido glucurónico al tetrapirrol, para producir mayor solubilidad en agua y así facilitar su excreción por la bilis, formando parte del pigmento biliar.

A esta bilirrubina se la conoce como bilirrubina directa (Tomaro & Batlle, 2002; Vitek & Schwertner, 2007).

Las enzimas bacterianas ubicadas en el tracto intestinal, hidrolizan el grupo glucurónico y convierten la bilirrubina en urobilinógeno. Algo de éste se absorbe en el intestino y se transporta al riñón, donde se transforma en urobilina y se excreta, dando el color característico a la orina. Sin embargo, la mayor parte del urobilinógeno es convertido en estercobilina, pigmento mayoritario de las heces. Los productos de degradación del hemo muestran efectos diferentes, el CO puede modular las funciones neuronales y cardiovasculares (Kim *et al*, 2006), mientras que la bilirrubina y biliverdina tienen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Tomaro & Batlle, 2002; Shibahara, 2003; Maines & Gibbs, 2005).

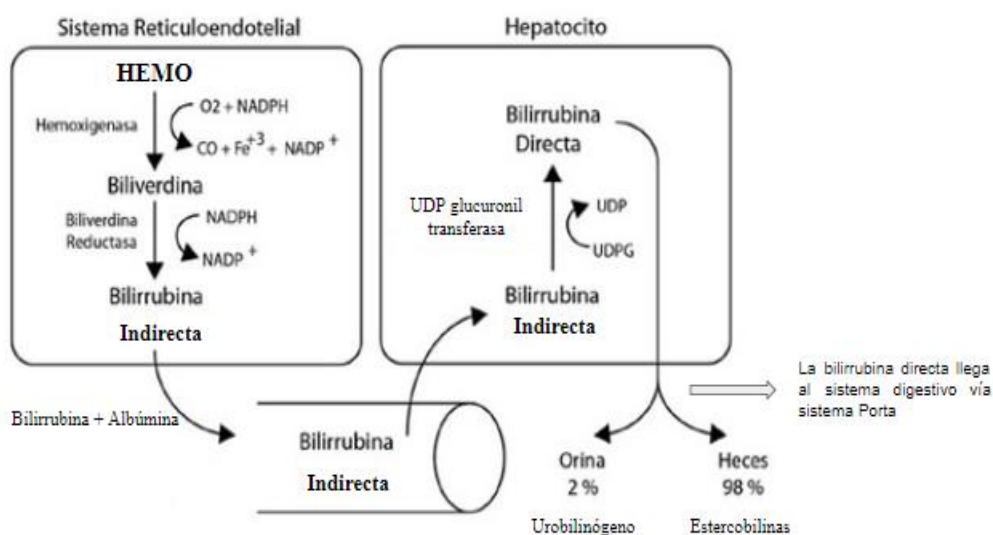


Figura 1.3: Catabolismo del hemo. Formación de urobilina a partir de hemo. (Kim *et al*, 2006)

Resumiendo, en el catabolismo del hemo se requieren dos procesos: uno que sea capaz de alterar la hidrofobicidad de las moléculas que se producen al romperse el núcleo del anillo porfirínico y otro que sea capaz de retener y almacenar el hierro para su reutilización en la síntesis de nuevo hemo.

1.4 Aspectos clínicos del metabolismo del hemo

Teniendo en cuenta las funciones y efectos del hemo en el organismo, las alteraciones en su síntesis, acumulación y/o degradación pueden conducir a diversas patologías, que pueden ser de origen adquirido o hereditario. Particularmente, los defectos enzimáticos de origen genético en alguno de los pasos de la biosíntesis de hemo conducen a enfermedades conocidas con el nombre de Porfirias. Las porfirias se producen por desórdenes en la actividad de alguna de las enzimas de este camino biosintético después del primer enzima, el ALA-S. (Batlle *et al.*, 1997; Anderson, 2001). Dicha alteración genera un patrón específico de acumulación y excreción de precursores de la síntesis de hemo, que son los causantes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, como ser cuadros de fotosensibilización, hepatopatías o síndrome neuroabdominal. La alteración en la actividad de alguna de las enzimas de la biosíntesis de hemo lleva a su bloqueo con la consiguiente disminución del pool de hemo libre y la desregulación del ALA-S. Alteraciones en la biosíntesis del hemo también pueden darse bajo circunstancias adquiridas como la intoxicación con plomo, la cual produce inhibición de la enzima ALA-D (Batlle *et al.*, 1997).

Otras situaciones patológicas como la anemia Hemolítica, la anemia Falciforme, la Malaria o la Rabdomiolisis, también pueden alterar la homeostasis del hemo generando un aumento de su forma libre, con su consecuente citotoxicidad (Corwin & Krantz 2000).

1.5 La enzima 5-aminolevúlico Sintetasa (ALA-S)

1.5.1 Características generales

La enzima ALA-S se clasifica como transferasa, es dependiente de fosfato de piridoxal y su actividad inicia con la condensación de una molécula de glicina y una de succinil-CoA para formar una molécula de ácido 5-aminolevulínico (ALA). Se encuentra presente en todos los organismos eucariotas no vegetales y en algunas proteobacterias, y fue identificada por primera vez en *Rhodopseudomonas spheroides* (Batlle *et al.*, 1997). Esta enzima responde a gran cantidad de mecanismos de regulación entre ellos represión/inhibición por hemo, control por glicina, inhibición

por ALA e inducción por drogas porfirinogénicas. En mamíferos, levaduras y el grupo de las α -proteobacterias, el ALA-S es una enzima homodimérica (Hunter & Ferreira, 2009). Su vida media *in vivo* es de alrededor de 60 minutos para el ALA-S mitocondrial de mamíferos y 34 minutos en el hígado fetal de ratas. Su corta vida media es una característica importante relacionada con su regulación (Batlle *et al.*, 1997).

Los valores de la constante de afinidad (K_m) para succinil CoA, glicina y fosfato de piridoxal, obtenidos con la enzima mitocondrial hepática parcialmente purificada, son del orden de 50 a 200 μ M, 5 a 20 mM y 1 a 10 μ M respectivamente (Batlle & Magnin, 1988).

En eucariotas, el ARNm de ALA-S se traduce en una proteína precursora que contiene una secuencia señal N-terminal que dirige la importación a través de las membranas mitocondriales y hacia la matriz mitocondrial interna, donde se elimina la secuencia señal y el succinil-CoA, proveniente del ciclo del ácido cítrico, está disponible para actuar como sustrato (Hunter & Ferreira, 2009). Los genomas de los vertebrados contienen dos genes ALA-S altamente conservados pero expresados diferencialmente, uno para la isoforma *housekeeping* expresada de forma ubicua (ALA-S1) y el otro para la isoforma específica de eritroides (ALA-S2) (Hunter, & Ferreira, 2009). Las mutaciones en el gen humano ALA-S2 pueden provocar anemia sideroblástica ligada al cromosoma X, que se caracteriza fenotípicamente por la acumulación de hierro dentro de las mitocondrias de los eritroblastos (Furuyama & Sassa, 2002).

El ALA-S se clasifica como miembro de la familia α de enzimas dependientes de fosfato de piridoxal (PLP). Estas enzimas requieren PLP como cofactor obligatorio y catalizan transformaciones de aminoácidos en las que los reordenamientos de unión ocurren en el átomo de carbono adyacente a la amina, que forma un enlace aldimina con el cofactor (Alexander *et al.*, 1994). Sobre la base de los datos de la secuencia de aminoácidos, el ALA-S se clasificó inicialmente como parte de la rama de la subfamilia de aminotransferasa tipo I, pero análisis recientes basados en datos cristalográficos indican que la enzima se considera más apropiadamente como parte de la rama de la subfamilia tipo II (Schulze, *et al.*, 2006). Esta distinción sutil, pero importante, aumenta en gran medida la probabilidad

de que el ALA-S haya evolucionado a partir de la glutamato-1-semialdehído aminotransferasa, la enzima dependiente de PLP responsable de la síntesis de ALA en la vía de 5-C.

La enzima ALA-S está más estrechamente relacionada con los otros tres miembros de la subfamilia de la acetiltransferasa dependiente de CoA, o α -oxoamina sintasa. Todas estas enzimas catalizan reacciones que involucran pequeños aminoácidos, ésteres de CoA y aminocetonas, y aunque solo se conocen cuatro miembros, las α -oxoamina sintasas son colectivamente de gran importancia biológica, porque además del importante papel del ALA-S en la biosíntesis de hemo, la palmitoiltransferasa y la 8-amino-7-oxononanoato sintasa catalizan los pasos clave de la síntesis de esfingolípidos y biotina respectivamente (Hunter & Ferreira, 2009).

La obtención de las estructuras cristalinas del ALA-S de *Rhodobacter capsulatus* con glicina y succinil-CoA unidos muestran que la enzima es una holoenzima (Astner, 2005). La resolución de estas estructuras arrojó una luz sin precedentes sobre las propiedades enzimológicas de esta proteína, incluídas las posiciones relativas de los sustratos, el cofactor, los residuos del sitio activo y un bucle de aminoácidos conformacionalmente móvil que se cierra sobre el sitio activo en el sustrato unido (Figura 1.4) El cofactor (PLP) reside 20 Å por debajo de una hendidura del sitio activo, formada en la interfaz de la subunidad, precisamente en el centro de la estructura en un entorno no acuoso. Es importante destacar que la identidad de secuencia del 49 % entre la enzima de *R. capsulatus* y el núcleo catalítico del ALA-S2 humano, hace que las estructuras de la bacteria sean modelos excelentes para estudios detallados de ALA-S de mamíferos, así como para predecir las relaciones entre las mutaciones de ALA-S2 humano y la anemia sideroblástica.

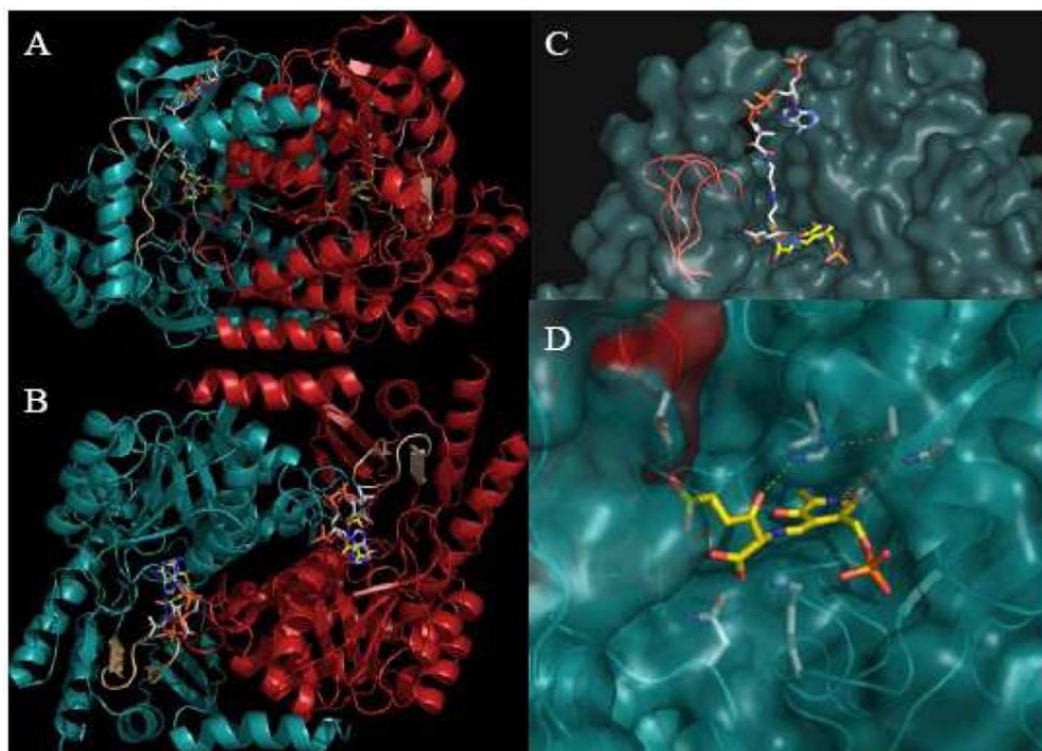


Figura 1.4: Características estructurales del núcleo catalítico del ALAS. A y B: vistas lateral y superior, respectivamente, que ilustran la estructura dimérica, la posición del sitio activo en la interfaz de la subunidad y los sustratos. El cofactor está casi exactamente en el centro de la estructura. El bucle del sitio activo conformacionalmente móvil es de color marrón claro. C: Estructura superficial monomérica desde la perspectiva de la subunidad adyacente con PLP-glicina (con carbonos amarillos) y succinil-CoA (con carbonos blancos) unidos. Las conformaciones abiertas y cerradas del bucle del sitio activo están en rojo. D: modelo estructural para interacciones de enlaces de hidrógeno con el intermedio α -amino- β -cetoadipato unido a PLP (Hunter & Ferreira, 2009).

En el caso del ALA-S de hígado de rata, se sabe que la enzima citosólica contiene 642 aminoácidos (peso molecular aproximado 70.000) de los cuáles 586 darán origen a la enzima mitocondrial madura y los 56 restantes constituyen la pre-secuencia mitocondrial ((Batlle & Magnim, 1988).

1.5.2 Mecanismo de acción

En base a lo publicado por Hunter & Ferreira (2009) el mecanismo de acción del ALA-S se resume en la Figura 1.5.

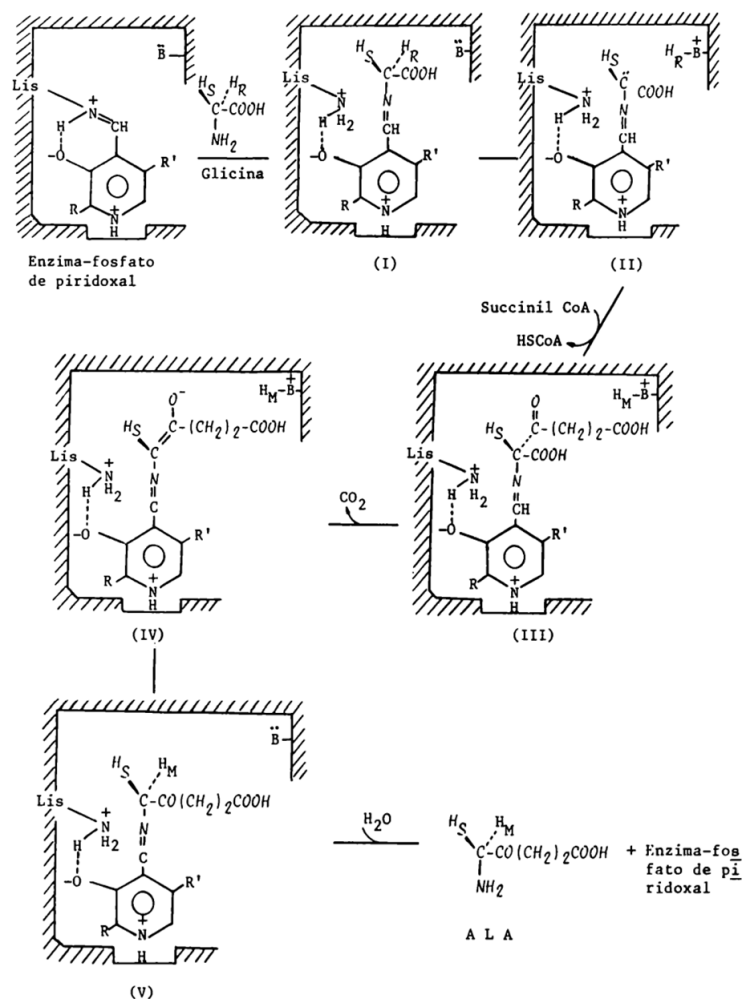


Figura 1.5: Mecanismo propuesto para la formación de ALA por la vía del ALA-S. Las reacciones se describen detalladamente en el texto. R: -CH₃; R': -CH₂-O-PO₃H₂

Se parte de la proteína unida al PLP mediante el átomo de nitrógeno del anillo pirimidínico y una base de Schiff que se establece entre el aldehído del cofactor y un grupo -ε-amino de un residuo lisina de la cadena polipeptídica. La reacción comienza cuando la glicina se condensa con el PLP para formar una nueva base de Schiff (I). Luego el protón H_R de este complejo es liberado y capturado por un grupo básico de la enzima, originándose un carbanión estable (II) que reacciona con el átomo de carbono del carbonilo electrofílico de la succinil CoA para producir un intermediario inestable, el ácido 2-amino-3-cetoadípico (III). Durante esta última conversión, el protón H_R unido a la proteína se intercambia con un protón H_M proveniente del medio. A continuación, el ácido 2-amino-3-cetoadípico, aún unido a la

enzima, se decarboxila para dar (IV), se adiciona el protón H_M (V) y por hidratación el ALA se libera del complejo enzima-PLP.

1.5.3 Características genómicas del ALA-S en los distintos organismos

- **Mamíferos**

Como ya mencionamos, en mamíferos existen dos isoformas de ALA-S codificadas por dos genes distintos (Figura 1.6): la isoforma 1 (ALA-S1) de expresión constitutiva en todas las células y la isoforma 2 (ALA-S2) o isoforma eritroide, que se expresa exclusivamente en células precursoras eritroides y es la responsable de la síntesis de hemo para la hemoglobina (Ikushiro *et al.*, 2018). Ambas isoformas se diferencian principalmente en su mecanismo regulador. ALA-S1 se expresa mayormente en las células hepáticas, como también en su nivel basal en todas las células del ser humano. ALA-S2 se expresa exclusivamente en las células eritroides, donde ALA-S1 deja de expresarse cuando comienza la función de ALA-S2 (Chiabrando *et al.*, 2014). El gen ALA-S1 (16 Kb) está localizado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21.2), Consiste en diez exones codificantes (exones 2-11) y dos exones adicionales no codificantes (exones 1A y 1B) en la región no traducida 5' (5'UTR). (Roberts & Elder, 2001).

El gen ALA-S2 se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp11.21) con una extensión de 22 Kb. Consta de diez exones codificantes (exones 2-11) y un exón no codificante (exón 1) en la región 5'UTR, que contiene un elemento de respuesta a hierro.

ALA-S1 y ALA-S2 presentan distintas zonas promotoras, pero ambos poseen las mismas organizaciones de exones/intrones. Por lo tanto, se parecen en la secuencia de los aminoácidos (Braidotti *et al.*, 1993).

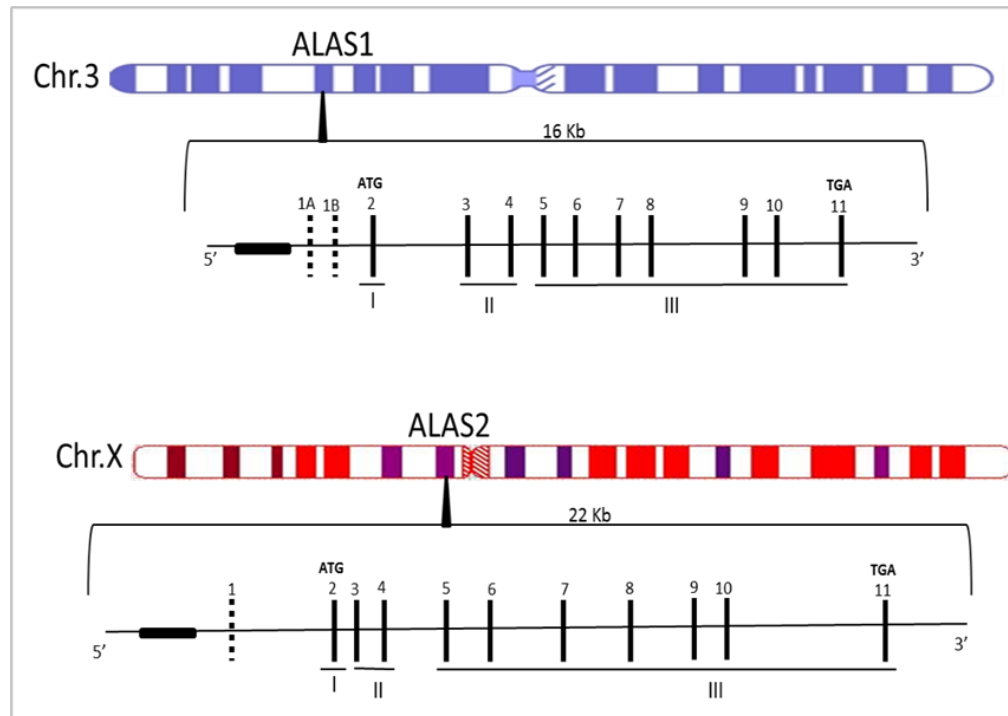


Figura 1.6: Estructura de los genes que codifican las dos isoenzimas de ALA-S, en mamíferos (Chiabrando *et al.*, 2014)

- **Procariotas**

En procariotas, el ALA-S sólo fue encontrada en el grupo de α -proteobacterias. En *Caulobacter crescentus*, una bacteria Gram-negativa miembro de las proteobacterias, el ALA-S es una proteína de 408 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 44,273 KDa. El ALA-S de esta especie es más chica que las ALA-S eucariotas típicas las cuales suelen tener entre 587 y 641 aminoácidos y la secuencia de aminoácido predicha comparte entre un 48% y 49% de identidad con las isoformas ALA-S1 y ALA-S2 de mamíferos respectivamente. En la figura 1.7 se muestra el alineamiento del ALA-S proveniente de distintos orígenes procarióticos. En *Escherichia coli* la enzima ALA-S es codificada por los genes hemA y hemM.

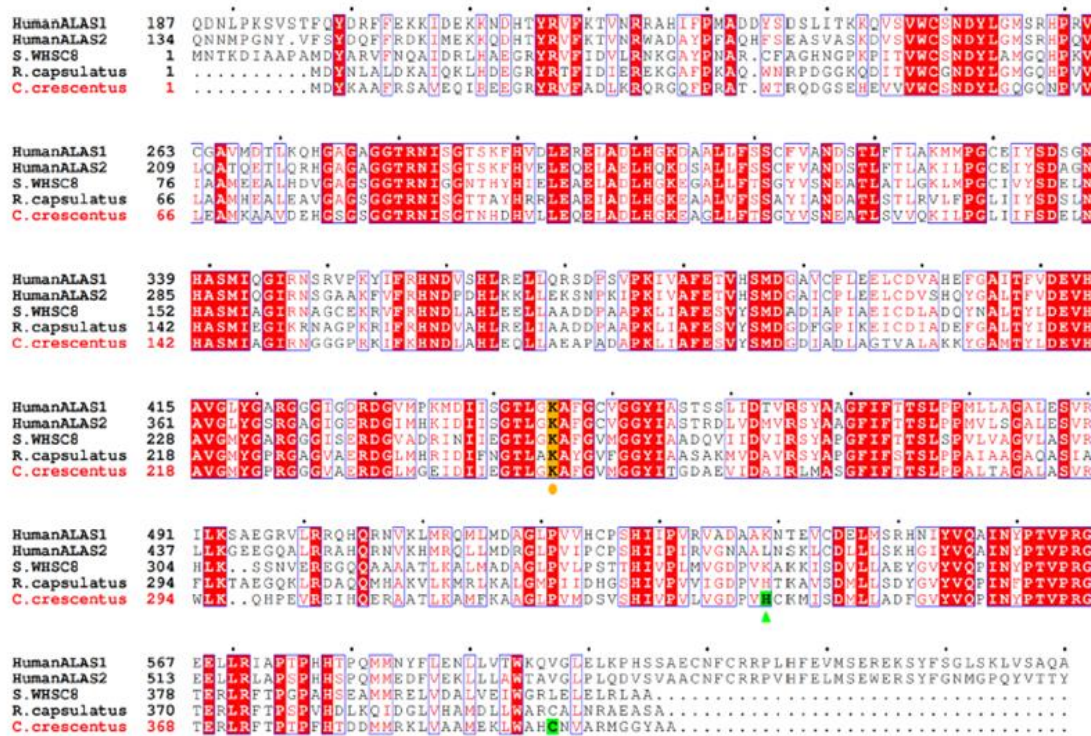


Figura 1.7: Alineación de secuencias de ALAS de varias especies. La secuencia de aminoácidos de ALAS de *C. crescentus* se comparó con ALAS1 humano (isoenzima doméstico no específico), ALAS2 humano (isoenzima específico eritroide), *Sphingomonas* WHSC8 (*S.WHSC8*) ALAS y *R. capsulatus* ALAS. La alineación fue realizado con Genetyx (Software Development Co., Fukuoka, Japón) y ESPrpt58. Los residuos de lisina que se predice que se unirán a PLP se resaltan en amarillo y se marcan con círculos. Adaptado de Ikushiro *et al.*, 2018.

• Levaduras

La enzima ALA-S fue ampliamente estudiada en *Saccharomyces cerevisiae*. Brown *et al.* (2018), presentaron la estructura cristalina de la enzima en esta fuente. Al igual que las ALA-S de otros grupos eucariotas y de proteobacterias, esta enzima es homodimérica y PLP dependiente. En la estructura presentada, una de las subunidades contiene unido el cofactor PLP, mientras que el sitio de unión para esta molécula se encuentra libre. En la estructura cristalina así obtenida se puede observar como la unión del cofactor produce un reordenamiento del sitio activo de la enzima y de regiones adicionales para lograr la óptima conformación activa de la enzima. Por otro lado, la región C-terminal resultó ser de gran importancia para la actividad de ALA-S, ya que se encuentra en contacto directo con el sitio activo de la enzima. Esta región contiene entre 35 y 60 residuos y solo se encuentra presente en las ALA-S eucariotas. Las mutaciones asociadas a esta región son responsables de patologías humanas debido a una hiperactividad enzimática o pérdida parcial de función. La extensión

C-terminal podría estar involucrada en la interacción con otra enzima, la succinil-CoA sintetasa, la cual provee de Succinil CoA al ALA-S.

En *S. cerevisiae*, el ALA-S esta codificada por el gen HEM1; su falta de función produce mutantes auxótrofos para ácidos grasos insaturados, ergosterol y metionina. Estas células pueden ser mantenidas mediante la suplementación con ALA en el medio de cultivo. HEM1 se encuentra localizado en el cromosoma IV y su producto es una proteína citoplasmática inactiva de 59 kDa la cual es procesada para ser transportada a la matriz mitocondrial dando origen a la versión activa del ALA-S la cual tiene un peso aproximado de 56 KDa y está compuesta por 548 aminoácidos. Este gen está regulado por la presión de oxígeno y la disponibilidad de glucosa.

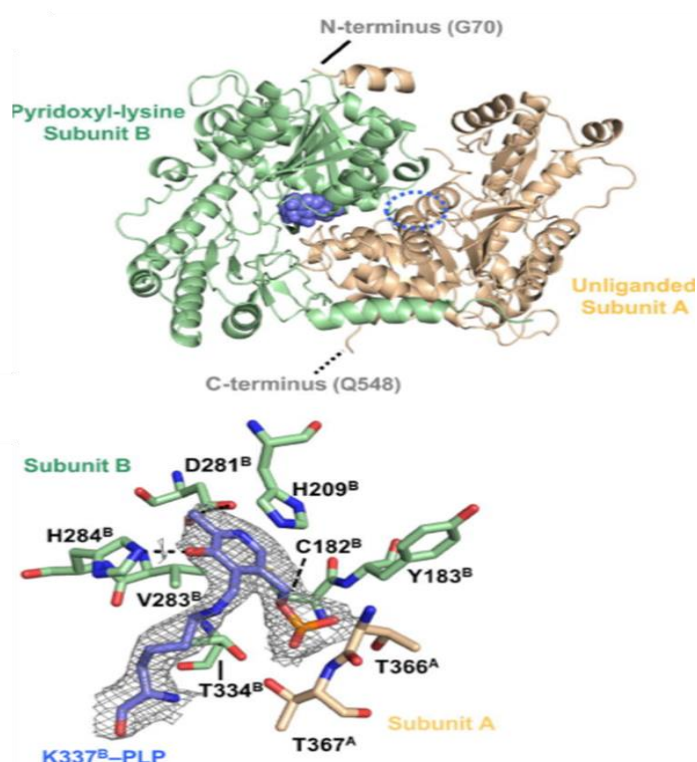


Figura 1.8: Estructura del ALA-S de *S. cerevisiae*. (Brown *et al.*, 2018)

1.5.4 Regulación por hemo del ALA-S

Se han identificado cinco mecanismos por los cuales el hemo libre regula negativamente la expresión de ALA-S1 (Figura 1.9). El hemo inhibe la transcripción del gen ALA-S1 (Srivastava *et al.*,

1988; Yamamoto *et al.*, 1982), reduce la estabilidad del ARNm (Hamilton *et al.*, 1991) e inhibe su traducción impidiendo la elongación de la cadena polipeptídica (Yamamoto *et al.*, 1983). Además, modula la entrada del precursor proteico de ALA-S-1 al interior de la mitocondria, donde ejerce su actividad (Yamauchi *et al.*, 1980). La unión de hemo al dominio HRM de ALA-S1 impide su transporte al interior de la mitocondria (Lathrop & Timko, 1993). Por último, se ha descrito un mecanismo por el cual el hemo promueve la eliminación de la proteína madura ALA-S1 a través de proteasas dependientes de ATP del sistema proteolítico mitocondrial (Kubota *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2011).

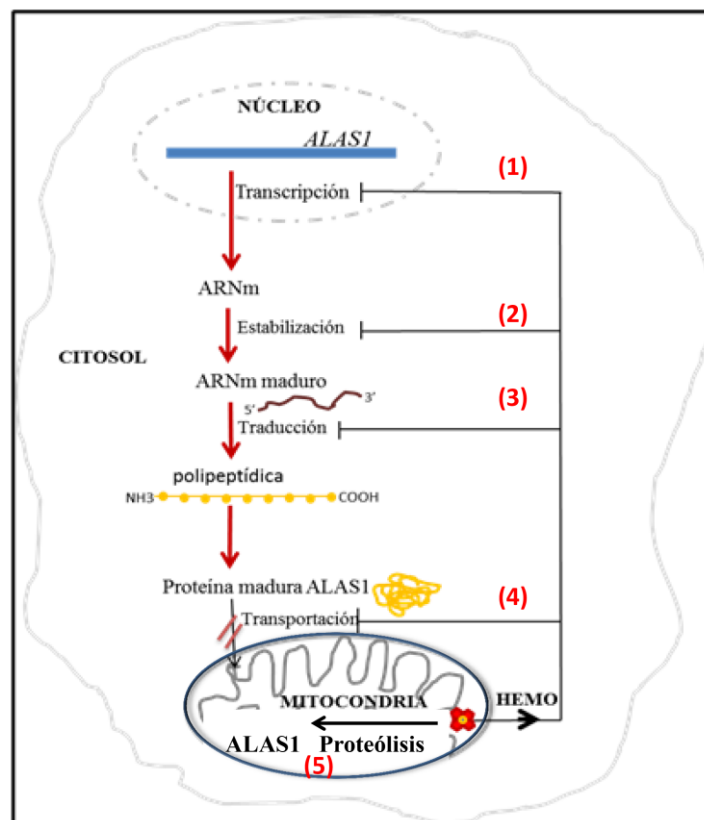


Figura 1.9: Regulación de ALA-S1 por hemo. El esquema muestra los cinco puntos de regulación de la expresión del ALA-S1. El control negativo se ejerce a nivel de (1) transcripción del gen, (2) estabilidad y (3) traducción del RNAm, (4) translocación de la proteína madura a la mitocondria y (5) degradación por proteasas del ALA-S mitocondrial (Kubota *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2011)

1.6 Biosíntesis de hemo en tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son un grupo de parásitos protozoarios de importancia médica y veterinaria que incluyen a *Trypanosoma* spp y *Leishmania* spp. Algunos miembros del grupo son: *Trypanosoma brucei*, agente causante de la enfermedad del sueño; *Trypanosoma cruzi*, que causa la enfermedad de Chagas; y *Leishmania* spp, que causa la leishmaniasis de tipo visceral, cutánea y mucocutánea. Son microorganismos hemoflagelados que requieren del agregado de compuestos hémicos (hemina, hematina o hemoglobina) para ser cultivados *in vitro*. Estos requerimientos nutricionales, están asociados con la incapacidad de biosintetizar hemo (Lombardo *et al.*, 2003; Tripodi *et al.*, 2011). Sin embargo, existen reportes que avalan la existencia de un camino biosintético para las porfirinas parcialmente funcional (Salzman *et al.*, 1982; Salzman *et al.*, 1986 a y b; Lombardo *et al.*, 2003), mientras otros autores consideran que el parásito carece totalmente de esta vía metabólica (Cupello *et al.*, 2014).

A partir de los estudios de Salzman *et al.* (1982; 1986 a y b) basados en la determinación de precursores (ALA y porfobilinogeno), porfirinas y actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de hemo, concluyeron que *T. cruzi* conserva funcionales la primera y la última de las enzimas de esta vía, ALA-S y FECH, ambas de localización mitocondrial. Por otro lado, un estudio extensivo a nivel de genoma de *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* permitió identificar genes homólogos para las tres últimas enzimas del camino: CPG-asa, PPG-asa y FECH (Kořený *et al.*, 2013) En el caso de *T. cruzi*, la búsqueda de los genes de las enzimas citoplasmáticas de este metabolismo arrojó resultados negativos, lo que concuerda con el hecho de que el parásito solo puede crecer en presencia de hemina o proto IX.

Nuestro grupo de investigación también obtuvo resultados que avalarían una vía de síntesis de hemo parcialmente funcional, al detectar en cultivos de epimastigotes la presencia de ALA, tanto en el interior del parásito, como en el medio de cultivo (Lombardo *et al.*, 2003). A pesar de no observar actividad de ALA-S *in vitro*, los niveles de ALA intracelular fueron significativos al igual que la cantidad de ALA excretado al medio. El 98% del ALA sintetizado por el parásito es excretado al medio extracelular, esta eliminación podría evitar un posible efecto citotóxico en el interior de la

célula y pone de manifiesto la falta de funcionalidad de la vía encargada de metabolizarlo (ALA-D y demás enzimas citosólicas). Respecto de la vía de 5-C, fue posible detectar en miembros de la familia Trypanosomatidae, actividad de una transaminasa capaz de convertir el ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA) en ALA, denominada DOVA transaminasa (DOVA-T) (Salzman *et al.*, 1982; Salzman *et al.*, 1986; Srivastava *et al.*, 1997). Cabe aclarar que al momento de estas publicaciones se consideraba al DOVA como intermediario más probable de la vía de 5-C, en lugar del glutamato-1-semialdehído posteriormente confirmado. Independientemente de esto, la ausencia de DOVA intra- y extracelular y los bajos niveles de actividad de DOVA-T (insuficientes para justificar la cantidad de ALA cuantificado) llevaron a descartar esta vía como responsable de la producción de ALA.

Relacionado con la actividad del ALA-S, nuestro grupo detectó la presencia de una molécula no proteica, de bajo peso molecular, inestable al calor, que es capaz de inhibir la actividad de esta enzima proveniente de bacterias fotosintéticas (Lombardo *et al.*, 2003). La capacidad inhibitoria de esta molécula se incrementa al aumentar los niveles intracelulares de hemo.

Considerando que el género *Leishmania* posee genes homólogos para las tres últimas enzimas de la vía y el género *Trypanosoma* es totalmente deficiente en la síntesis de hemo, Kořený *et al.* (2013) postulan, para todos los tripanosomátidos un ancestro común totalmente hemo-deficiente, a partir del cual *Leishmania* por transferencia génica horizontal a partir de una γ -proteobacteria, incorporó las secuencias que codifican para CPG-asa, PPG-asa y FECH.

Al igual que ocurre para otros metabolitos esenciales para el parásito que deben ser suministrados por el hospedador, *T. cruzi* posee para el hemo transportadores específicos (TcHTE) que le proporcionan los niveles intracelulares necesarios (Merli *et al.*, 2016) Este transportador presenta una secuencia 55% homóloga al del transportador LHR1 descrito para la captación de hemo en *L. amazonensis*. Si bien los niveles intracelulares de hemo podrían ser regulados por estos transportadores, en *T. cruzi* y *Leishmania donovani*, hay evidencias de actividad de hemo oxigenasa y biliverdina reductasa, que son las enzimas encargadas de degradar el hemo a bilirrubina (Cicarelli *et al.*, 2007) La presencia de ambas enzimas es importante porque evitan la citotoxicidad, mediada por la

generación de especies reactivas de oxígeno, que producen altos niveles de hemo (Ciccarelli *et al.*, 2007).

En conclusión, *T. cruzi* es incapaz de llevar hasta el final la síntesis de hemo, por lo que debe incorporarlo mediante transportadores específicos desde el medio extracelular. Su incapacidad para completar la síntesis de hemo se debería a la ausencia de las enzimas citoplasmáticas de dicho metabolismo, pero es posible que aún conserve las enzimas mitocondriales de esta vía. La presencia de estas enzimas y su rol fisiológico en el parásito no está aún esclarecida.

Capítulo 2

Trypanosoma cruzi y Enfermedad de Chagas

Página

2.1 *Trypanosoma cruzi*

2.1.1 Clasificación	32
2.1.2 Estadios morfológicos y ciclo de vida	33
2.1.3 El genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35

2.2 Enfermedad de Chagas

2.2.1 Enfermedad de Chagas: Descripción general y distribución.....	36
2.2.2 Formas de transmisión.....	37
2.2.3 Signos y síntomas.....	38
2.2.4 Tratamiento.....	40
2.2.5 Rutas metabólicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> con potencial terapéutico	44

Trypanosoma cruzi es el microorganismo objeto de estudio en esta tesis. A continuación, expondremos los aspectos más relevantes relacionados con su clasificación, morfología, ciclo de vida y características genéticas. Por ser el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, también en este capítulo se resumen los aspectos clínicos más salientes de esta parasitosis y se revisan las principales bases que sustentan las distintas perspectivas terapéuticas en la tripanosomiasis americana.

2.1 *Trypanosoma cruzi*

2.1.1 Clasificación

Trypanosoma cruzi pertenece a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida. Esta familia la componen protozoos flagelados que se caracterizan por la presencia de una organela denominada kinetoplasto (Figura 2.1). Esta organela se encuentra en la base del flagelo y contiene redes de DNA unidas entre sí y forma parte de una gran mitocondria. Además, existe la asociación de estructuras membranosas con el kinetoplasto (De Souza, 2000).

La ubicación taxonómica de *T. cruzi* es la siguiente (Levine *et al.*, 1980): **Reino:** Protista, **Subreino:** Protozoa, **Filo:** Sarcomastigofora, **Clase:** Zoomastigofora, **Orden:** Kinetoplastida, **Familia:** Trypanosomatidae, **Género:** Trypanosoma, **Subgénero:** Schizotripanum, **Especie:** *T. (S.) cruzi*.

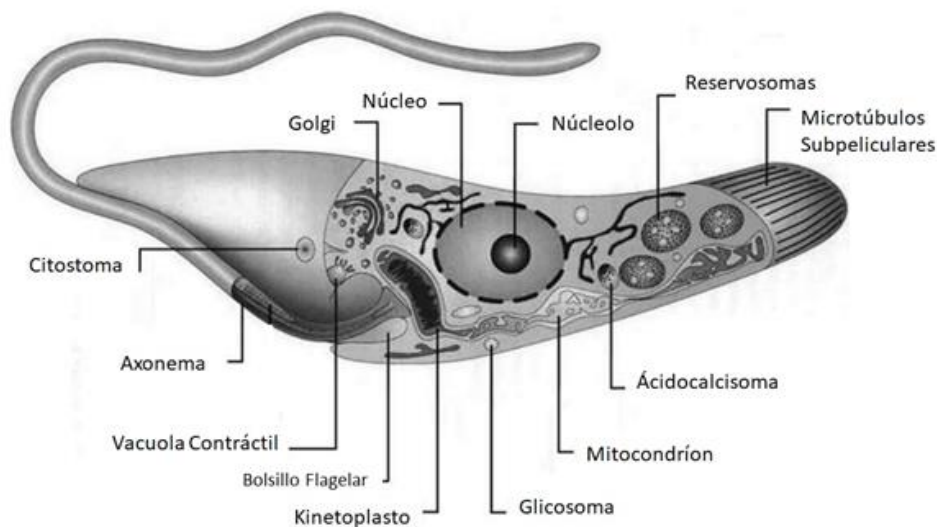


Figura 2.1: Esquema de las estructuras celulares de *T. cruzi*. Se puede observar la posición de kinetoplasto con el flagelo y su extensión en el cuerpo del parásito.(Cavalcanti & de Souza, 2018).

T. cruzi es una especie heterogénea con alta diversidad genética y fenotípica, que ha sido clasificada en seis unidades discretas de tipificación (UDTs, TcI-TcVI) gracias a los trabajos de Brenière *et al.* (2016) quienes realizaron una reconstrucción filogenética mediante árboles de máxima verosimilitud basados en genes mitocondriales comunes en bases de datos. Así propusieron una nueva

agrupación considerando la expresión de tres genes, dos mitocondriales (CytB y COII) y uno nuclear (Gpi). Estas UDTs se definen como un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa y que son identificadas por medio de marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos. Esta diversidad genética ha sido asociada con diferentes distribuciones geográficas y ciclos de transmisión (Zingales *et al.*, 2009).

2.1.2 Estadios morfológicos y ciclo de vida

Dependiendo de la presencia o ausencia del flagelo y de la posición del kinetoplasto en relación a la posición del núcleo, se caracterizan en el ciclo de vida tres estadios morfológicos: amastigote, epimastigote y trypomastigote (De Souza, 2000, Goncalves *et al.*, 2018). En la Figura 2.2 se muestra un esquema de los tres estadios morfológicos que se describirán a continuación.

- **Trypomastigote:** Este estadio es infeccioso y no replicativo. El parásito presenta un flagelo y una membrana ondulante a lo largo de todo el organismo. El kinetoplasto está situado en la región posterior al núcleo. Los trypomastigotes se encuentran en células de tejidos y sangre de los hospedadores mamíferos (forma circulante), en intestino posterior, heces y orina del hospedador invertebrado (forma metacíclica), en cultivos axénicos (forma estacionaria de crecimiento) y en cultivos celulares en fase líquida (De Souza, 2000; Zaidenberg *et al.*, 2000).

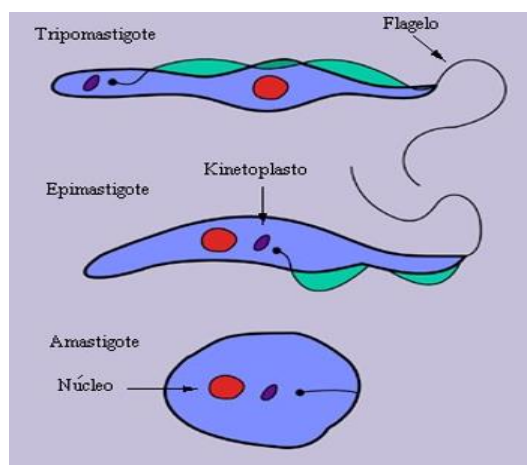
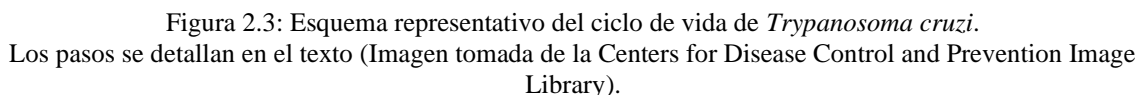


Figura 2.2: Estadios morfológicos de *T.cruzi*. Se observan los tres estadios del ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*. De arriba hacia abajo: Tripomastigote, Epimastigote y Amastigote.

- Epimastigote: Es la forma extracelular y replicativa presente en el intestino de los triatominos. Los epimastigotes se transforman en trypomastigotes metacíclicos y se encuentran en el intestino del vector aproximadamente entre 6 y 16 días. Son organismos alargados, que presentan el flagelo en el centro del cuerpo y el kinetoplasto en la parte anterior al núcleo (Buckner & Navabi, 2010). Cuando *T. cruzi* se mantiene en cultivos celulares, esta forma se observa en la fase logarítmica de crecimiento.
- Amastigote: Es una forma replicativa intracelular presente en mamíferos. Presenta una forma en esférica y sin flagelo. Se agrupan en cistos y pueden pasar al estadio trypomastigote (Buckner & Navabi, 2010). Aunque el estadio amastigote está definido como intracelular obligado, también puede ser hallado en el insecto vector durante la fase temprana de la infección, en sangre de ratones infectados y en cultivos libres de células (Zaidenberg *et al.*, 2000)

Trypanosoma cruzi tiene un ciclo biológico complejo (Figura 2.3), caracterizado por una sucesión de distintas formas morfológicas que circulan a través de ciclos domésticos y salvajes en los cuales está involucrada la especie humana, un vector hematófago y mamíferos que cumplen la función de reservorios (Tyler & Engman, 2001; Navarro *et al.*, 2003). La transmisión es iniciada cuando los hospedadores invertebrados (insectos hematófagos pertenecientes a la familia Hemíptera y Reduviidae) se alimentan mediante la ingesta de sangre y liberan por materia fecal trypomastigotes metacíclicos (1). Estos trypomastigotes penetran las células del hospedador y se transforman en amastigotes (2). Los amastigotes se multiplican hasta llegar a la capacidad máxima que soporta la célula (3), en ese momento, se transforman en trypomastigotes y producen la ruptura de la célula siendo liberados nuevamente al torrente sanguíneo del hospedador (4). Los trypomastigotes sanguíneos pueden ingresar al intestino de un nuevo triatomino si este se alimenta de la sangre del hospedador (5). Los trypomastigotes, en el intestino del triatomino, se diferencian a epimastigotes, donde también se multiplican por fisión binaria (6 y 7). En el intestino medio, los epimastigotes se diferencian en trypomastigotes metacíclicos y serán expulsados mediante la materia fecal cuando el triatomino vuelva a alimentarse iniciando el ciclo de infección (8).



La secuencia genómica de *T. cruzi* fue publicada junto con las secuencias genómicas completas de *Leishmania major* y *T. brucei* en 2005 (El-Sayed *et al.*, 2005a). Juntos estos tres parásitos se conocen como TriTryps. Se identificaron 22.570 genes que codifican para proteínas y aproximadamente la mitad del genoma está cubierto por secuencias repetitivas. El proyecto “genoma de tripanosomátidos”, también reveló 6.200 proteínas presentes en todos los TriTryps que representan blancos potenciales para drogas de amplio espectro. Sin embargo, el 50% de estos genes codifican para proteínas hipotéticas con función desconocida (Clayton, 2010; Callejas-Hernandez *et al.*, 2019). *T. cruzi* posee un genoma diploide estimado en aproximadamente 60,4 Mb (El-Sayed *et al.*, 2005b). Diferentes análisis de densitometría y electroforesis de campo pulsante han permitido identificar 55

cromosomas en el parásito, aunque existen variaciones entre cepas (Branche *et al.*, 2006; Reis-Cunha *et al.*, 2015; Reis-Cunha *et al.*, 2018). La secuenciación con tecnología nanopore permitió mejorar el ensamblado del genoma de *T.cruzi* (Diaz-Viraqué *et al.*, 2019).

2.2 Enfermedad de Chagas

2.2.1 Descripción general y distribución

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Se encuentra sobre todo en zonas endémicas de 21 países de América Latina (Schofield *et al.*, 2006) donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas, chinches o con otros nombres, según la zona geográfica (WHO 2004). La infección también se puede adquirir mediante transfusión de sangre, transmisión congénita (de la madre infectada a su hijo) y órganos donados, aunque estos modos de transmisión son menos frecuentes. Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi* (WHO 2021). La enfermedad lleva el nombre de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico e investigador brasileño que la describió en 1909. En mayo de 2019, en cumplimiento de la decisión de la 72.^a Asamblea Mundial de la Salud, se estableció el Día Mundial de la Enfermedad de Chagas para su celebración el 14 de abril (día de 1909 en que Carlos Chagas diagnosticó el primer caso humano de la enfermedad, en una niña de dos años llamada Berenice).

Inicialmente, la enfermedad de Chagas estaba confinada a las zonas rurales de la Región de las Américas, principalmente América Latina (no en las islas del Caribe). Debido principalmente a la mayor movilidad de la población en los últimos decenios, la mayoría de las personas infectadas ha pasado a vivir en entornos urbanos (proceso de urbanización) y la enfermedad se ha ido detectando cada vez más en los Estados Unidos de América y el Canadá, en muchos países europeos y en algunos africanos, del Mediterráneo Oriental y del Pacífico Occidental (Figura 2.4)



Figura 2.4: Mapa de la distribución de la Enfermedad de Chagas en el mundo hasta 2015. Las áreas endémicas se muestran en rojo y aquellas donde se han detectado casos, pero no es endémica se muestran en rosa (Imaz-Iglesia *et al.*, 2015)

2.2.2 Formas de transmisión

T. cruzi se transmite a los humanos por vía hematófaga mediante insectos triatominos, llamados por varios nombres locales, que incluyen vinchuca en Uruguay, Argentina, Bolivia y Paraguay, bar beiro en Brasil, Pito en Colombia, chipo en Venezuela, y chin chorro en Ecuador. Estos insectos se encuentran comúnmente en áreas pobres con condiciones de vivienda insalubres. La clasificación actual de Triatominae reconoce 137 especies en el orden hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae agrupadas en 18 géneros (Vallejo *et al.*, 2009; Galvão *et al.*, 2003) Entre ellos, *Triatoma* y *Rhodnius* y, en menor medida, *Pan strongylus* tienen la mayor importancia epidemiológica como vectores de *Trypanosoma cruzi*.

En América Latina, el parásito *T. cruzi* se transmite principalmente por contacto con las heces o la orina infectadas de triatominos que se alimentan de sangre. Por lo general, esos insectos que albergan los parásitos viven en las grietas y huecos de paredes, en tejados de casas y estructuras exteriores, como gallineros, corrales y almacenes, en zonas rurales y suburbanas. Normalmente permanecen ocultos durante el día y entran en actividad por la noche para alimentarse de la sangre de mamíferos, entre ellos los humanos. En general, pican en zonas expuestas de la piel, como la cara, y defecan/orinan cerca de la picadura. Los parásitos penetran en el organismo cuando la persona picada

se frota instintivamente y empuja las heces o la orina hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta.

Si bien la principal vía de transmisión de *Trypanosoma cruzi* a humanos ocurre a través de insectos triatominos, existen otras formas de contraer la infección como ser, por transfusión sanguínea, transmisión congénita, trasplante de órganos, la ingestión de alimentos contaminados con parásitos y los accidentes de laboratorio. Las transfusiones de sangre son otro mecanismo muy común de transmisión de la enfermedad de Chagas en humanos en América Latina, Europa, y Estados Unidos (Castro, 2009).

La enfermedad de Chagas en humanos, reportada en áreas no endémicas de Europa y las Américas, específicamente en los Estados Unidos, proviene de personas que adquirieron la infección en países endémicos (Schmunis, 2007) o a través de la inmigración (Milei *et al.*, 2009).

2.2.3 Signos y síntomas

Se pueden distinguir dos fases de la enfermedad: aguda y crónica. La fase aguda se caracteriza por una elevada afectación parasitaria tisular y sanguínea, y síntomas inespecíficos. En una segunda fase indeterminada, el paciente es seropositivo, pero permanece asintomático. Finalmente, la fase crónica, que suele ocurrir 10-30 años después de la infección (Coura, 2007).

En los seres humanos, después de la infección y un período de incubación de 6-8 semanas, comienza la fase aguda de la enfermedad de Chagas. En ausencia de un tratamiento específico, la enfermedad persiste durante unos dos meses con pocos síntomas característicos y una tasa de mortalidad del 2 al 8%, especialmente en los niños. Después de la fase aguda, que a menudo no se diagnostica (y por lo tanto no se trata), el paciente presenta fuertes evidencias de inmunidad, pero tiene tendencia a permanecer infectado (Sánchez-Sancho *et al.*, 2010).

Los síntomas de la fase aguda, si los hubiese, son leves y normalmente no produce más que una tumefacción local en el sitio de la infección, una lesión nodular o forúnculo, generalmente llamado chagoma, que puede aparecer en el sitio de la inoculación. Además, puede presentar otras manifestaciones que incluyen fiebre, anorexia, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia leve y

miocarditis. El signo de Romaña (tumefacción palpebral unilateral y periocular) puede aparecer como resultado de la contaminación conjuntival con las heces del vector (Coura, 2007).

Tras las fases iniciales de la infección, los pacientes sin tratar entran en una fase crónica que es inicialmente asintomática. Posteriormente, el 20-30% de los pacientes desarrollan anomalías cardíacas, el 10% patologías del tracto digestivo como megaesófago y megacolon (Oliveira *et al.*, 2009) y menos del 5% de los pacientes desarrollan una forma neurológica de la enfermedad. Muchas de las personas pueden permanecer asintomáticas de por vida y nunca desarrollar síntomas relacionados con Chagas (Oliveira *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2006).

La manifestación más grave de los pacientes con la infección crónica con *Trypanosoma cruzi* es una cardiopatía, con o sin insuficiencia cardíaca congestiva, que puede causar muerte súbita. La etiología de la cardiopatía chagásica es probablemente multifactorial (Tanowitz *et al.*, 2009). Aunque la comprensión actual de la cardiopatía chagásica apunta hacia una etiología mixta (Bonney & Engman, 2008), en la que el parásito estaría directamente involucrado en la producción de daño miocárdico (Bellotti *et al.*, 1996).

2.2.4 Tratamiento

2.2.4.1 Drogas anti-*T.cruzi*

Desde los comienzos de los años 70 dos drogas han sido usadas para el tratamiento de la enfermedad: Nifurtimox (Nfx) y Benzydazol (Bnz). El Nfx [5-nitrofurano (3-methyl-4-(5'-nitrofurfurylideneamina) tetrahydro4 H-1,4-tiazina-1,1-dioxido] fue aprobado para su uso en 1965; en tanto que el Bnz [2-nitroimidazol (N-benzyl-2-nitroimidazol) acetamida] fue lanzado al mercado en 1971 (Davies, 2007). Estas dos drogas son a la fecha las únicas internacionalmente aprobadas por las entidades reguladoras de drogas farmacéuticas (Gilbert *et al.*, 2003). Respecto al Nfx, cabe mencionar que a partir de los años 80 se ha comercializado de manera discontinua, primero en Brasil y luego en Argentina, Chile y Uruguay.

Otros dos medicamentos alternativos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el alopurinol e itraconazol que se han utilizado en algunos casos seleccionados y en determinadas condiciones (Apt *et al.*, 2003). En la Figura 2.5 se muestran las estructuras de las drogas descriptas.

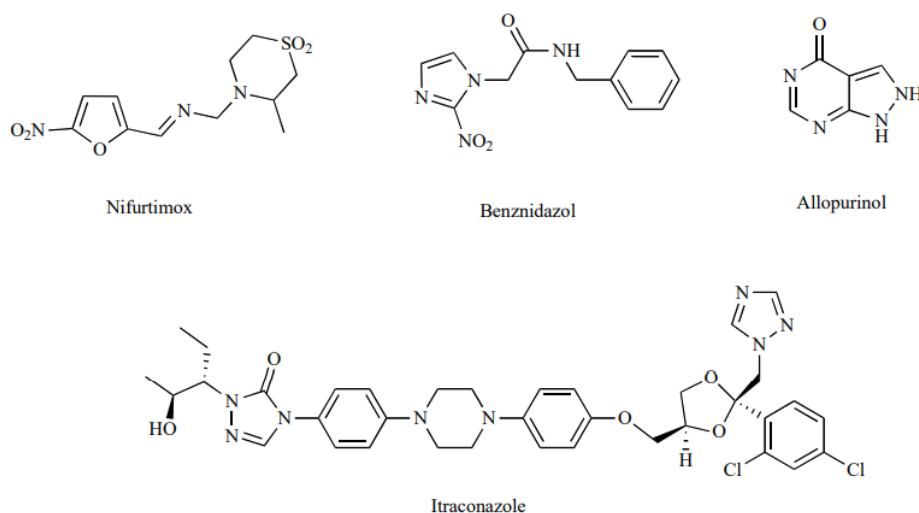


Figura 2.5: Estructura de las drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

2.2.4.2 Mecanismos de acción y efectos colaterales

- Nifurtimox: El modo de acción del Nfx involucra la generación del radical nitroanión por nitroreductasas que, en presencia de oxígeno, generan intermediarios reactivos altamente tóxicos, que producen daño oxidativo en las células del parásito (Docampo & Moreno, 1986). Los efectos secundarios negativos de Nfx incluyen anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, excitabilidad o somnolencia y manifestaciones digestivas tales como náuseas, vómitos y ocasionalmente cólico intestinal y diarrea, erupciones cutáneas, neuritis periférica, depresión de la médula ósea y pérdida de memoria. Las contraindicaciones del tratamiento incluyen la presencia de una grave enfermedad hepática o renal y no debe utilizarse durante el embarazo (Manarin *et al.*, 2008)
- Benznidazol: En el Bnz el modo de acción no es únicamente el daño oxidativo, ya que se requieren concentraciones elevadas para provocar la muerte celular a través de este mecanismo. La acción del Bnz involucra interacciones covalentes de la droga con algunos componentes del parásito como ser DNA, lípidos o proteínas (Maya *et al.*; 2007; Manarin *et al.*, 2008). Los efectos secundarios y

contraindicaciones más importantes de benznidazol incluyen dermatitis en el 20-25% de los pacientes, intolerancia digestiva (5% de los pacientes) como vómitos y dolor abdominal, polineuritis, depresión de la médula ósea y hepatitis. Otros efectos secundarios pueden ser anorexia, dolor de cabeza y fatiga. También se han descrito mialgia e insomnio sin interrumpir el tratamiento (Viotti *et al.*, 2009). La aparición de linfomas, así como las propiedades mutagénicas y cancerígenas también se han observado en animales de experimentación (conejos y ratones) tratados con Bnz (Teixeira *et al.*, 1994). Sin embargo, una amplia revisión de miles de los pacientes tratados con estos fármacos, por varios autores, no demostraron tales efectos (Viotti *et al.*, 2009). Por otro lado, y mediante técnicas de metabolómica, se ha podido determinar que el Bnz es capaz de formar aductos con los tioles libres quitándolos del pool de tioles celulares y dejando a la célula vulnerable a los efectos del stress oxidativo (Trochine *et al.*, 2014).

Tanto Nfx como Bnz son tripanocidas contra todas las formas del parásito y tienen una actividad significativa en la fase aguda, con hasta un 80% de curas parasitológicas en pacientes tratados. Su eficacia varía según la zona geográfica, probablemente debido a las diferencias en la susceptibilidad a los medicamentos entre diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* y la existencia de cepas que son naturalmente resistentes a los productos químicos utilizados contra ellos (Andrade *et al.*, 2008). Además, estos fármacos quimioterapéuticos utilizados actualmente poseen importantes limitaciones, debido a su baja actividad antiparasitaria en la forma crónica de la enfermedad.

- Alopurinol: El alopurinol (4-hidroxi pirazolo [3,4-d] pirimidina (Figura 2.7) es un análogo de hipoxantina que actúa como sustrato alternativo de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) y se incorpora al ARN. Esta incorporación conduce a la formación de nucleótidos no fisiológicos y bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina (Urbina & Docampo, 2003). Los resultados obtenidos con alopurinol varían de un autor a otro, tal vez como resultado de las diferentes protocolos y métodos de diagnóstico para estudiar el progreso de la enfermedad. Así, los estudios en ensayos clínicos con los pacientes en fase aguda mostraron que el alopurinol no es efectivo (Lauria-Pires *et al.*, 1988). En otro estudio, con pacientes crónicos, los

resultados con alopurinol fueron similares al efecto obtenido con Nfx y Bnz, sin embargo, el grupo tratado con alopurinol mostró menos efectos colaterales (Gallerano & Sosa, 2000).

Triazoles: El ketoconazol fue uno de los primeros imidazoles que mostró actividad *in vitro* contra *T. cruzi*, con acumulación de metabolitos provenientes del metabolismo de los esteroides en epimastigotes. *In vivo*, el ketoconazol condujo a una cura parasitológica en animales de experimentación en fase aguda, pero fue ineficaz en la fase crónica. Se observó un efecto sinérgico de ketoconazol y Bnz en ratones infectados con la cepa CL Brener o Y, lo que no ocurre en el caso de un aislado colombiano resistente a Bnz (Araujo *et al.*, 2000). Los azoles fluconazol e itraconazol tienen ensayos en animales de experimentación, y su mecanismo de acción contra *T. cruzi* implican interferencia en la síntesis de ergosterol (Maya *et al.*, 2007). Siguiendo el mismo protocolo utilizado para el estudio clínico descrito anteriormente para el tratamiento con alopurinol, 135 pacientes crónicos fueron tratados con itraconazol observando curación parasitológica y normalización del electrocardiograma (ECG) en el 36,5% de los pacientes tratados, pero aparecieron nuevas anomalías ECG en el 48,2% de los pacientes después del tratamiento (Apt *et al.*, 2005). Los estudios clínicos con ketoconazol o itraconazol en humanos con enfermedad de Chagas crónica no han demostrado una actividad curativa significativa. Por lo tanto, se deben realizar nuevos estudios para reevaluar la eficacia de estos medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Como en el caso de alopurinol, estos azoles deben ser investigados más a fondo mediante un protocolo bien diseñado para el tratamiento de pacientes con Chagas.

2.2.4.3 Nuevos enfoques para mejorar la eficacia de las drogas anti-*T. cruzi*

Las dosis altas se utilizan generalmente en quimioterapia para compensar la escasa solubilidad en agua del fármaco, su baja disponibilidad, la rapidez con la que se elimina y la baja eficacia de la focalización del fármaco, lo que conduce a efectos secundarios graves, observados con frecuencia con medicamentos anti-*T. cruzi*, particularmente Bnz y Nfx (Urbina, 2010). Recientemente, se han utilizado estrategias más nuevas basadas en la reformulación con el fin mejorar la eficacia de estos fármacos antiguos que carecen de un perfil farmacocinético y de biodistribución adecuado. En este

sentido, algunos intentos se han enfocado en el uso de benznidazol asociado a diferentes formulaciones. La reducción del tamaño de las partículas del fármaco y el uso de ciclodextrinas y codisolventes, permitió mejorar la solubilidad del Bnz (Leonardi *et al.*, 2013; Manarin *et al.*, 2013). Por ejemplo, Maximiano *et al.* (2011) desarrolló microcristales de Bnz con una mejora en la tasa de disolución que consecuentemente produjo una mayor eficacia en ratones infectados por *T. cruzi* (cepa Y), aumentando la supervivencia incluso en dosis muy bajas (25 mg / kg de peso corporal).

En este sentido, la enfermedad de Chagas representa un gran desafío, porque la simple modificación de la tasa de disolución no es suficiente para tratar los parásitos dentro de las células en la fase crónica de la enfermedad. Una gran limitación es la baja permeabilidad de las membranas celulares a las drogas anti-*T. cruzi* (Kayser *et al.*, 2003). Una formulación que proporcione un aumento selectivo del fármaco en las ubicaciones intracelulares donde vive el parásito durante la etapa crónica sería de gran utilidad para aumentar la eficiencia del mismo y disminuir sus efectos tóxicos. Es de destacar que la toxicidad de estos fármacos pueden producir daños graves e irreversibles al huésped. Para evitar este problema, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos que utilizan métodos basados en nanocarriers, que es uno de los enfoques más prometedores (Morilla *et al.*, 2005) Espuelas *et al.* (2012) enumera estrategias para alcanzar una mejor efectividad terapéutica contra este tipo de parásitos basadas en nanotecnología.

Las formulaciones de lípidos fueron investigadas por primera vez por Morilla *et al.* (2004) con liposomas multilaminares cargados con Bnz, que fueron administrados a ratones infectados por *T. cruzi* en fase aguda (cepa RA). A pesar de que la concentración de droga aumentó significativamente en el hígado, no pudieron mejorar la eficacia *in vivo*. Por otro lado, una formulación de liposomas sensibles al pH que contiene un nitroimidazol de segunda generación, etanidazol, al ser administrado por vía intravenosa mostró *in vivo* un perfil muy activo frente a la infección por el parásito. La dosis efectiva encapsulada resultó ser 180 veces menor que si se administra el fármaco libre (Morilla *et al.*, 2005). Este trabajo demostró que es posible convertir un fármaco activo *in vitro* en un fármaco eficaz *in vivo* asociándolo con un nanocarrier apropiado que modifica el tráfico intracelular dentro de las células infectadas.

En esta línea de investigación, la formulación liposomal comercial de anfotericina B (AmBisome, Gilead Sciences, Inc.) ha demostrado reducir significativamente la carga de parásitos en el corazón, hígado, bazo, esqueleto, músculo y en los tejidos adiposos tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección en ratones (Cencig *et al.*, 2012).

Otro ejemplo es el trabajo de Branquinho *et al.* (2014), donde un nuevo fármaco candidato, denominado licnofolido, ha demostrado ser muy eficaz en ratones infectados por *T.cruzi* (cepas CL e Y), cuando se asocia con nanocápsulas poliméricas de larga circulación (PLA-PEG NC) (Branquinho *et al.*, 2014; Mosqueira *et al.*, 2013) Este nuevo nanocarrier polimérico es potente y rápido para reducir la parasitemia en sangre. Además, aumentó la supervivencia de los ratones y mejoró las tasas de curación en comparación con Vitamina B12, incluso en la cepa Bnz resistente en dosis muy bajas (2 mg / kg / día).

2.2.5 Rutas metabólicas de *Trypanosoma cruzi* con potencial terapéutico

En la figura 2.6 se resumen los principales posibles targets terapéuticos estudiados hasta el momento (Duschak; 2019). En esta sección desarrollaremos en detalle los relacionados con este trabajo de tesis: sistema redox y metabolismo del hemo.

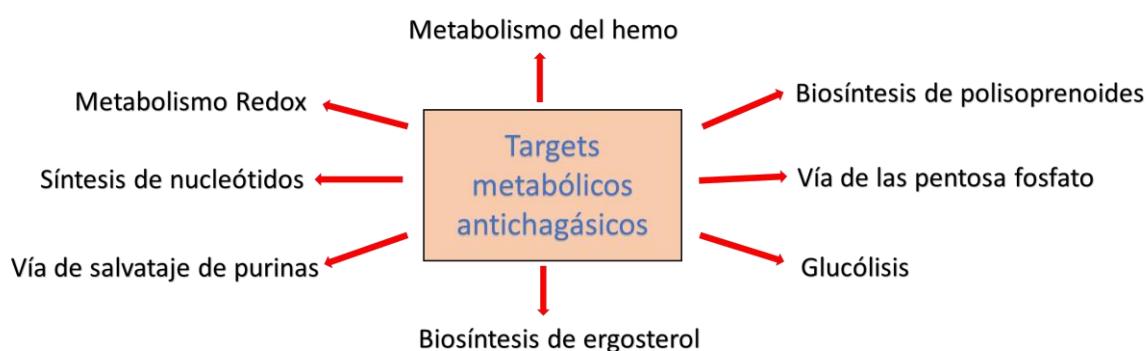


Figura 2.6: Resumen de los metabolismos target para el desarrollo de drogas antichagásicas. (Adaptado de Duschak; 2019)

- Sistema de defensa antioxidante

El predominio de los estados oxidativos en las células aeróbicas genera ROS tales como anión superóxido (O_2^-); peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^-). Sabemos que las ROS son citotóxicas, ya que pueden dañar componentes intracelulares como lípidos, proteínas, hidratos de carbono o ADN (Ross *et al.*, 2000; Smirnova *et al.*, 2000). Para contrarrestar estos efectos altamente agresivos, la célula posee un sistema de defensa antioxidante que elimina los componentes pro-oxidantes y captura los radicales libres.

El sistema de defensa antioxidante de *T. cruzi*, que presenta algunas diferencias respecto del sistema de mamíferos (Figura 2.9), incluye las siguientes enzimas: superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (A-Px), triparredoxina peroxidasa (Tpx-Px) y como antioxidantes de bajo peso molecular principalmente tripanotiona (N1, N8-bisglutathionil-espermidina) (Turrens, 2004). La SOD en estos microorganismos está presente en una única isoforma y es dependiente de Fe. Los tripanosomátidos carecen de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (GSH-Px) para eliminar el peróxido de hidrógeno, en su lugar poseen las enzimas A-Px y Tpx-Px. Todos los tripanosomátidos sintetizan tripanotiona (Try), un ditiol derivado de GSH, que es único para los miembros del orden Kinetoplástidos (Fairlamb & Cerami, 1992). La tripanotiona oxidada es nuevamente reducida por la tripanotiona reductasa (Try-R), una enzima dependiente de NADPH.

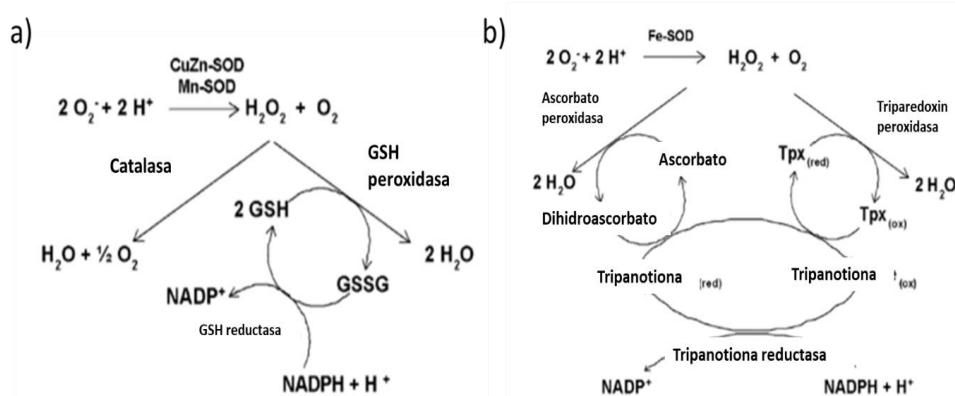


Figura 2.9: Esquema comparativo entre el sistema de defensa antioxidante de mamíferos (a) y el de *Trypanosoma cruzi* (b). En el esquema se pueden observar las diferencias presentes entre el sistema de defensa enzimático presente en el hospedador mamífero y el presente en *Trypanosoma cruzi*. Estas diferencias hacen de este sistema un potencial blanco terapéutico (Adaptado de Turrens, 2004)

- Metabolismo del hemo

Respecto a considerar el metabolismo del hemo con fines terapéuticos, tanto el transporte como la disponibilidad del mismo dentro del parásito, podrían ser considerados como blancos antichagásicos.

Transporte de hemo: Los procesos de transporte fueron utilizados en el parásito para asegurar la disponibilidad de los metabolitos que no puede sintetizar (Pereira *et al.*, 2008). Al respecto, existen transportadores para glucosa, purinas, pirimidinas, aminoácidos, poliaminas y hemo, entre otros, los que desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de nuevas terapias.

Los transportadores dependientes de ATP, denominados ABC, son una superfamilia de proteínas implicadas en el proceso de movilizar materiales inorgánicos, iones, metales, péptidos, esteroides, nucleósidos, azúcares y muchas otras moléculas pequeñas como hemo, a través de la membrana celular (Vasiliou *et al.*, 2009, Krishnamurthy *et al.*, 2007). En *Leishmania donovani*, la regulación negativa del transportador de hemo, LABC5, inhibe la proliferación del parásito, efecto que se revierte en presencia de hemo (Campos-Salinas *et al.*, 2011). Resultados similares se obtuvieron en *T. cruzi*, al emplear como inhibidores de este tipo de transportadores, ciclosporina A, verapamilo e indometacina (Cupello *et al.*, 2022). Además, se detectó la presencia de una proteína potenciadora del transporte transmembrana de hemo (TcHTE), la cual es responsable de la captación de hemo. La proteína se localizó en el bolsillo flagelar de epimastigotes pero, sorprendentemente, la sobreexpresión del gen TcHTE provocó la disminución del crecimiento del parásito, en condiciones de concentración óptima de hemina (20 μ M) en el medio de cultivo (Merli *et al.*, 2016). Este resultado sugiere que *T. cruzi* no tiene mecanismos eficientes para hacer frente a la sobrecarga intracelular de hemo intracelular, el cual al acumularse manifiesta su conocido efecto citotóxico (Cicarelli *et al.*, 2007). El estudio de los sitios de unión al hemo dentro de los transportadores podría dar información sobre inhibidores específicos. De hecho, se ha descubierto que algunos medicamentos antimicrobianos pueden inhibir un transportador de hemo (MmpL3) de *Mycobacterium tuberculosis* (Owens *et al.*, 2013).

Disponibilidad intracelular de hemo: En cuanto al contenido de hemo que requiere el parásito, debemos considerar que tanto la falta como la sobrecarga de hemo son perjudiciales para su supervivencia. Las metaloporfirinas han sido empleadas para interferir con el metabolismo del parásito de la malaria, mediante el bloqueo selectivo de la desintoxicación del hemo (Vanderesse *et al.*, 2016; Cole *et al.*, 2000), ya que inhiben la capacidad de formar β -Hematina (Begum *et al.*, 2003). La nanoencapsulación de porfirinas mejoró, 80 veces, la actividad antipalúdica de Zn-protoporfirina (Alves *et al.*, 2015) y se ha propuesto como una herramienta para mejorar la administración de fármacos, especialmente porque la porfirina no puede atravesar fácilmente las membranas celulares (Krishnamurthy *et al.*, 2007). También se ha informado que los complejos de metaloporfirina inhiben el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, efecto que se revierte con la adición de hemo, lo que sugiere una competencia entre las porfirinas y el hemo por la misma maquinaria de transporte, lo que lleva a disminuir su disponibilidad en el interior del parásito (Cupello *et al.*, 2022).

Se han hecho esfuerzos sustanciales para dilucidar la interacción hemo-fármaco como una estrategia potencial para interferir con el metabolismo del parásito. Los avances en este campo, por ejemplo, han mejorado la actividad antipalúdica y reducido la resistencia a los medicamentos contra el Paludismo (Singh *et al.*, 2014). Un ejemplo interesante son las quinolinonas. Estas drogas son bases débiles capaces de acumularse en vacuolas ácidas. Se ha demostrado que la adición exógena de hemo potencia 8 veces la actividad tripanocida *in vitro* contra tripomastigotes de *T. cruzi*, de distintos derivados de 4-aminoquinolina-3- carbonitrilos (Lechuga *et al.*, 2016).

Por otro lado, La capacidad de formar complejos con hemo se ha explotado para otros compuestos heterocíclicos nitrogenados. Los análisis de interacción de compuestos que se dirigen al hemo y a la hemozoína de la base de datos ChEMBL revelaron que el anillo de quinolina es el andamio más común, seguido de fenotiazina y orto-fenantrolina. Sin embargo, otros derivados de azoles, por ejemplo, los fármacos antifúngicos, también pueden formar complejos con el hemo (Huy *et al.*, 2002). Se ha reportado que el antimicótico clotrimazol inhibe el crecimiento de *P. falciparum in vitro* (Tiffert *et al.*, 2000) y las propiedades de unión con el hemo parecen estar involucradas en la

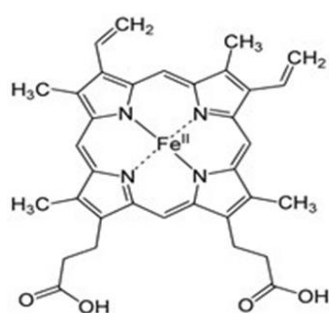
inhibición de su degradación por reducción del glutatión, lo que provoca daños en la membrana (Huy *et al.*, 2004).

La artemisinina (ART), el componente activo mayoritario del extracto de *Artemisia annua*, es una lactona sesquiterpénica trioxánica que parece ser un farmacóforo esencial para la actividad antipalúdica (Lechuga *et al.*, 2019). El mecanismo de acción de ART todavía no está claro, se sabe que ejerce su efecto a través de la generación de radicales libres, pero puede que involucre múltiples mecanismos (Pandey *et al.*, 2016). Es posible que actúe con la participación de algunos mecanismos mediados por hemo (O'Neill *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008) y otros no; estos últimos aún no dilucidados, justificarían la actividad de la ART contra parásitos que no acumulan grandes cantidades de hemo, como ser *L. donovani* (Sen *et al.*, 2010), *Toxoplasma gondii* (D'Angelo *et al.*, 2009) *T. cruzi* y *T. brucei* (Mishina *et al.*, 2007). Nuestro grupo también reportó actividad anti-*T. cruzi* mediada por hemo, para dos lactonas sesquiterpénicas naturales, denominadas psilostachina y psilostachina C (Puente *et al.*, 2016).

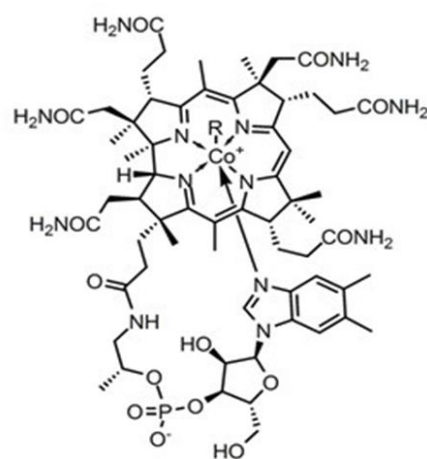
La HO representa un importante mecanismo defensivo que protege a las células del daño oxidativo del hemo libre (Kumar *et al.*, 2005). HO-1 es una enzima clave que, además de catabolizar el hemo, participa en la regulación de la inflamación e interacciones huésped-patógeno (Chung *et al.*, 2009). Aunque controvertido, HO-1 parece desempeñar un papel importante en la defensa del huésped contra los parásitos. Con el propósito de desequilibrar la homeostasis del hemo, se investigó el efecto de inductores e inhibidores de la HO sobre parásitos y células infectadas. En ratones infectados con *T. cruzi* tratados con Co-protoporfirina (CoPP), un inductor de HO-1, la parasitemia se redujo considerablemente, mientras que el tratamiento con la Sn protoporfirina (SnPP), un inhibidor de HO-1, aumenta la parasitemia (Paiva *et al.*, 2012). Diferentes resultados se observaron en ratones infectados con *T. cruzi* tratados con hemina, un inductor de HO-1. Se observó poco efecto sobre la parasitemia y aumentó el número de nidos de amastigotes en los tejidos, pero redujo en gran medida la inflamación del miocardio. Sin embargo, la inhibición de HO-1 por ZnPP redujo la parasitemia durante la infección aguda, pero no tuvo impacto en la supervivencia de los ratones (Gutierrez *et al.*, 2014). Igualmente, el papel de HO-1 en *T. cruzi* aún no está claro, ya que no se registró actividad enzimática,

pero los intermediarios del catabolismo del hemo (α -meso-hidroxihemo, verdohemo y biliverdina) y una proteína similar a HO fueron descritas en epimastigotes (Cupello *et al.*, 2014).

Además de las metaloporfirinas, otro análogo estructural del hemo cuya actividad tripanocida fue evaluada es la vitamina B12 (Vit B12). Esta molécula posee en su estructura un anillo corrínico que deriva del anillo porfirínico del uroporfirinógeno (Figura 2.10). Los estudios realizados mostraron un efecto anti-*T.cruzi* significativo tanto *in vitro*, sobre los tres estadios del parásito, como *in vivo*, en un modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas. Los valores de IC₅₀ obtenidos *in vitro* para la Vit B12 comparados con los del Bnz, resultaron ser 2 y 3 veces menores para los estadios epi- y tripomastigotes respectivamente, mientras que los amastigotes mostraron un valor de IC₅₀ 2 veces mayor. En los ensayos *in vivo*, se observó que: a) la actividad antiparasítica de la Vit B12 se potencia con el agregado de un reductor como la Vitamina C (Vit C), b) el área bajo las curvas de parasitemia disminuyó aproximadamente un 45 %, 59 % y 65 % para los animales tratados con Vit B₁₂+ Vit C, Bnz sólo y la combinación de estos tres, respectivamente, c) los menores niveles de parasitemia y mayor sobrevida se obtuvieron para el lote tratado conjuntamente con ambas vitaminas y el Bnz. Este tratamiento combinado permitiría disminuir la dosis de Bnz, disminuyendo así los efectos colaterales perjudiciales que el mismo presenta.



Hemo



R = 5'-deoxyadenosyl, Me, OH, CN

Vitamina B12

Figura 2.10: Estructuras del Hemo y la Vitamina B12.

En cuanto al mecanismo de acción, la Vit B12 ejercería su actividad antiparasítica a través de la generación de ROS por una reacción tipo Fenton y la Vit C potencia su efecto debido a la conocida acción prooxidante que un reductor manifiesta en presencia de metales de transición, como ser Fe, Cu ó Co (Ciccarelli *et al.*, 2012).

Capítulo 3

Hipótesis y objetivos

	Página
4.1 Hipótesis	52
4.2 Objetivos	53

Luego de todo lo expuesto en los capítulos anteriores, resumiremos los puntos principales que llevaron a la formulación de la hipótesis con la que se trabajó en esta tesis y los objetivos de la misma.

3.1 Hipótesis

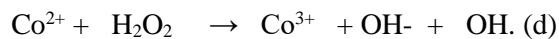
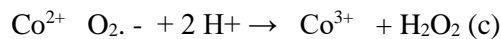
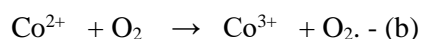
A continuación, se resumen los aspectos más salientes de la biosíntesis de hemo en *T. cruzi* que nos llevan a postular una de las hipótesis de trabajo de esta tesis doctoral. Nuestro grupo de investigación obtuvo resultados que estarían avalando una funcionalidad parcial de esta vía, ya que niveles intra y extracelulares de ALA fueron detectados en epimastigotes en cultivo (Lombardo *et al.*, 2003). Respecto a ambas vías de síntesis de ALA, la vía del ALA-S y la vía de 5C, los resultados obtenidos en cultivos de epimastigotes no permiten asegurar categóricamente la funcionalidad de una u otra vía. La excreción del 98% del ALA sintetizado al medio de cultivo evitaría su citotoxicidad y estaría avalando tanto la falta de funcionalidad de la vía encargada de metabolizarlo (condensación a porfobilinogeno y reacciones posteriores catalizadas por enzimas citosólicas) como la síntesis de ALA. Teniendo en cuenta que los niveles de ALA detectados en los cultivos están regulados negativamente por la cantidad de hemo presente en el medio (Lombardo *et al.*, 2003), y que este tipo de regulación es característica del ALA-S, la funcionalidad del ALA-S en *T. cruzi*, podría ser postulada.

Al respecto, la detección de una molécula no proteica, de bajo peso molecular e inestable al calor, presente en un extracto libre de células del parásito, que fue capaz de inhibir la actividad del ALA-S proveniente de bacterias fotosintéticas, podría también ser considerado un aval a la presencia de esta enzima en *T. cruzi* (Lombardo *et al.*, 2003). Por otro lado, sabiendo que las mitocondrias provienen de un orgánulo ancestral común que se originó a partir de la integración de una α -proteobacteria endosimbiótica con una célula huésped relacionada con Archaea, que dicha transición de una bacteria endosimbiótica a un orgánulo permanente, implicó una gran cantidad de cambios evolutivos (como ser origen de cientos de nuevos genes y un sistema de importación de proteínas, inserción de transportadores de membrana, integración del metabolismo y la reproducción, reducción del genoma, transferencia lateral de genes y retargeting de proteínas) (Roger *et al.*, 2017) y que la transferencia de genes entre la mitocondria y la célula hospedadora de la misma llevó a que muchas enzimas mitocondriales sean codificadas por el genoma nuclear (Roger *et al.*, 2017) entonces podría encontrarse en el genoma del parásito una proteína con actividad de ALA-S. Por tal motivo, conocida

la secuencia del genoma de *T. cruzi* y empleando la base de datos Blast se llevó a cabo una búsqueda avanzada de zonas que homologueen con buen *score* con las secuencias de las enzimas involucradas en la síntesis del hemo. Durante esta búsqueda se encontró una secuencia: Tc00.1047053511071.140, la cual también se encuentra identificada en la base de datos TriTryps con el código: TcCLB.511071.140 que podría codificar para una proteína con actividad de ALA-S (TcHem1)

En base a todo lo expuesto proponemos que el gen TcCLB.511071.140, el cual podría haber sido transferido desde la mitocondria al genoma nuclear durante el proceso de simbiosis, podría codificar para una enzima con funcionalidad de ALA-S en el parásito, la cual, justificaría la síntesis de ALA reportada previamente, y aportaría un avance importante para el conocimiento de la bioquímica y genómica del parásito. Surge el interrogante de para qué tendría el parásito un ALA-S funcional si carece del resto de las enzimas que se requieren para sintetizar porfirinas, al respecto, es importante tener en cuenta trabajos que adjudican al ALA-S un rol diferente no relacionado con el metabolismo del hemo; Tal como se reporta en Liu, et al (2018), ciertas ALA-S también catalizan la ciclación de ALA-CoA para formar 2-amino-3-hidrox ciclopenta-2-en-1-ona. En este trabajo, se pone de manifiesto que una ALA-S utilizada exclusivamente para la biosíntesis de tetrapirroles también es capaz de catalizar la reacción de ciclación, aunque con una eficiencia mucho menor que las ciclasas dedicadas a esta reacción. Aunque la función del producto de ciclación ALA-CoA y el ALA en si no estarían claras, nuestra hipótesis propone que un enzima tipo ALA-S funcional seria la responsable de la síntesis de ALA por un lado y que podría, además, cumplir otro rol no relacionado con el metabolismo del hemo, aún desconocido, pero de importancia biológica para el parásito.

Respecto a *Trypanosoma cruzi* y la terapéutica de la enfermedad de Chagas, teniendo en cuenta la avidez que presentan los tripanosomátidos por los compuestos hémicos y la acción citotóxica que la hemina y porfirinas relacionadas ejercen, a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, tales como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH\cdot$) (Kumar & Bandyopadhyay; 2005), investigamos el posible empleo de las porfirinas con fines terapéuticos. Al respecto, ya hemos reportado la actividad tripanocida que ejerce la vitamina B12, un análogo estructural del hemo, cuya acción citotóxica proviene de la siguiente secuencia de reacciones:



En primer lugar, el Co^{3+} presente en la vitamina B12, se reduce por acción de un antioxidante en su forma reducida ($\text{Antiox}_{\text{red}}$) a Co^{2+} (a) y luego el Co^{2+} reduce el O_2 a anión superóxido (b), el anión superóxido a peróxido de hidrógeno (c) y el peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo (d), mientras vuelve a oxidarse a Co^{3+} . En base a este mecanismo, nuestra hipótesis es que el átomo de Co^{3+} proveniente de la misma, podría ser reemplazado por iones de metales pesados preexistentes en las células, con lo cual, el agregado sólo de un antioxidante, como por ejemplo la vitamina C (Du *et al.*, 2012), bastaría para iniciar la secuencia de reacciones que llevaría a la generación de ROS y muerte del parásito. Cabe aclarar que, según la secuencia mencionada, el antioxidante estaría poniendo de manifiesto un efecto prooxidante dañino para la célula. Existen reportes que avalan un rol dual, oxidante/antioxidante para la vitamina C, donde se adjudica a la acción como prooxidante un importante efecto citotóxico (Du *et al.*, 2012, Mastrangelo *et al.*, 2017, Deubzer *et al.*, 2010, Cieslak & Cullen; 2015)

3.2 Objetivos

En base a todo lo expuesto surgen como objetivos generales de esta tesis doctoral:

- 1- Investigar actividad de ALA-S para la proteína TcpHem1 posiblemente codificada por la secuencia TcCLB.511071.140
- 2- Evaluar la posibilidad de emplear con fines terapéuticos, porfirinas y compuestos relacionados. Con este fin ensayamos actividad tripanocida de una porfirina sintética A4 sobre

tripomastigotes sanguíneos y actividad anti-*T. cruzi* de la vitamina C tanto *in vitro* sobre los tres estadios del parásito, como *in vivo* sobre un modelo murino de Chagas agudo.

Materiales y Métodos

Capítulo 4

Materiales y Métodos

Página

Materiales

Cepas y líneas celulares.....	58
Reactivos.....	58

Métodos

4.1 Cultivos y mantenimiento de las cepas y líneas celulares	59
4.2 Expresión heteróloga y caracterización de la proteína codificada por la secuencia TcCLB.511071.140.....	60
4.3 Evaluación de la actividad anti- <i>T.cruzi</i>	66
4.5 Análisis estadístico	71

A continuación, se detalla la metodología y los materiales utilizados para la realización de esta tesis.

Materiales

Cepas y líneas celulares

- *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuen Tul 2 (DTU VI) y Tulahuen Tul 2 transgénica que expresa en forma estable el gen de la β - galactosidasa (Buckner et al, 1996), gentilmente cedidas por Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica – IMPAM (UBA – CONICET).
- *Escherichia coli* cepa BL21 y DH5 α .
- Línea celular Vero y línea J774 de macrófagos murinos.

Reactivos

Los kits de extracción de plásmidos son marca Transgen provistos por ApBiotech. Las enzimas de restricción utilizadas fueron adquiridas a New England Biolabs. La enzima GoTaq polimerasa utilizada en las reacciones de amplificación fue adquirida a Biosystem y es marca Promega®. Los primers utilizados en esta tesis fueron sintetizados por Macrogen. El sistema pET 22b (+) de clonado y expresión fue adquirido a Novogen (cat: 69744-3). El kit TransformAID Bacterial Transformation Kit que se utilizó para hacer competentes y transformar las bacterias DH5 ∞ y BL21 fue adquirido a Thermo Scientific.

Los kits de purificación de fragmentos de PCR, AccuPrep, fueron adquiridos a Bioneer®. El plásmido de subclonado pJET fue adquirido a la empresa Thermo Fisher. Los antibióticos y el IPTG utilizados en este trabajo fueron provistos por Sigma. Todas las secuenciaciones fueron realizadas por Macrogen. La succinil CoA fue provista por Sigma al igual que la Acetil CoA. El anticuerpo anti-His 6X es marca BD®. Los marcadores usados para corroborar los tamaños de los productos de PCR fueron de Invitrogen® y el marcado de peso molecular de proteínas fue de TransGen. El kit de RT-PCR y la T4 DNA ligasa son marca Promega. Todos los demás reactivos y drogas utilizados son de grado analítico adecuado.

El Bnz usado en las experiencias fue extraído de los comprimidos comercializados por los laboratorios Elea. Los demás reactivos y solventes utilizados fueron todos de grado analítico P.A. provenientes de distintas fuentes comerciales

Métodos

4.1 Cultivos y mantenimiento de las cepas y líneas celulares

Los epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuen Tul 2 fueron cultivados a 28°C en un medio líquido conformado por 0,3 % de extracto de levadura (Difco), 0,9 % de triptosa (Difco), 0,4 % de dextrosa, 1 % de fosfato disódico, 0,36 % de cloruro de sodio, 0,04 % de cloruro de potasio, 0,15 % de extracto de hígado, 0,5 % de infusión de cerebro y corazón (Difco) y 2% de Hemina (Sigma). El medio se esteriliza en autoclave a 1,2 atmósferas durante 20 minutos.

Los tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen Tul 2, salvaje y transgénica, fueron obtenidos infectando ratones de la cepa CF1 de 21 días de edad. En el pico de la parasitemia (aproximadamente a los 15 días post infección), se extrae por punción cardíaca, la sangre del animal con los tripomastigotes. Los animales criados en el bioterio del IMPAM, Facultad de Ciencias Médicas – UBA, recibieron tratamiento y cuidados según normas de la AADEALC.

Los amastigotes fueron obtenidos infectando macrófagos murinos de la línea J774 con tripomastigotes, en relación 10:1 parásitos/célula.

Las bacterias, *E. coli* cepa BL21 y DH5 α , fueron cultivadas en medio LB líquido o sólido según corresponda. El medio contiene 1% de Peptona (Difco), 0,5 % de extracto de levadura (Difco) y 1% de cloruro de sodio. Para el medio sólido se añadió 1,5 % de Agar (Difco) y en el caso de agregar ampicilina la concentración utilizada fue 100 μ g/ml de medio.

Las células Vero fueron cultivadas en medio MEM, suplementado con suero fetal bovino (1,5 %) y gentamicina 40 μ g/ml, en estufa a 37°C con atmósfera controlada (CO₂ 5 %). Para la línea J774, las células se cultivaron en medio RPMI bajo las mismas condiciones descriptas para las células Vero.

4.2 Expresión y caracterización de la proteína codificada por la secuencia TcCLB.511071.140

4.2.1 Estudios bioinformáticos

Para la búsqueda de la proteína XP_814009.1 (TcpHem1) se construyó una matriz de puntuación sitio específica (PSSM) utilizando la plataforma Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el algoritmo Psi-Blast con los siguientes parámetros: base de datos RefSeq Protein, Word size: 3 y la matriz Blosum62. Como secuencia de partida se utilizó la del ALA-S humano que se encuentra en el cromosoma 3p21.2 versión GRCh38.p13 (NC_000003.12, NP_001291373.1). Se realizaron 3 iteraciones y luego se usó esta PSSM contra el genoma de *T. cruzi* utilizando la base de datos RefSeq Protein. El gen Tc00.1047053511071.140 (en tritryps TcCLB.511071.140) fue obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína TcpHem1 utilizando la plataforma tBlastn. La determinación de los parámetros, PM y punto isoelectrico, de la proteína fueron obtenidos de la plataforma ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Los dominios proteicos se obtuvieron utilizando las plataformas PFam (<https://pfam.xfam.org/>) y Prosite (<https://prosite.expasy.org/>). Los alineamientos de secuencia se realizaron mediante el software Mega, utilizando el algoritmo Clustal y el dendograma de secuencia se obtuvo utilizando el software Mega y el algoritmo de comparación UPGMA. Las secuencias de las proteínas utilizadas para el alineamiento estructural fueron obtenidas de la base de datos PDB (<https://www.rcsb.org/>) y los alineamientos estructurales, así como el árbol filogenético correspondiente se obtuvieron utilizando el software VMD (<https://www.ks.uiuc.edu/>). El modelado de la secuencia TcpHem1 se realizó con la herramienta online AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) y el *docking molecular* se obtuvo con el software Autodock Vina (Trott & Olson, 2010) utilizando como centro las coordenadas de la lisina del dominio aminotransferasa de clase II y el *size* de la *grid box* fue, para todas las coordenadas (x,y,z) de 40. Los demás parámetros fueron los que vienen por *default* con el *software*. La base de datos de estructuras de sustratos fue PDBeChem (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/>) y Zinc (<https://zinc.docking.org/>).

4.2.2 Obtención de la proteína recombinante

4.2.2.1 Extracción del material genético y amplificación por PCR de la secuencia TcCLB.511071.140.

A partir de un cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* se obtuvo, el ADN mediante el método de extracción con fenol:cloroformo y el ARN total por extracción con Trizol®. Los primers utilizados para amplificar por PCR la secuencia del gen TcCLB.511071.140 se diseñaron usando la plataforma Primer Blast y fueron sintetizados por Sigma Aldrich. En los extremos 5' de cada primer se adicionó la secuencia de corte de las enzimas HindIII y BamHI con el fin de clonar la secuencia amplificada en un vector de clonado y expresión. La secuencia de los primers utilizados fue:

ATT-**GGATCC**-G-ATGTTTTGTACGGCTTTGAGGTTCGC – FORWARD T_m= 64,75 °C

ATC-**AAGCTT**-CACGTTGAGTTCCTTCTTGATTG – REVERSE T_m= 58,22 °C

En naranja se encuentra resaltado el sitio de corte de la enzima HindIII y en amarillo el sitio de corte de la enzima BamHI

Para la amplificación del gen en estudio se usó el siguiente programa de PCR: 95°C 5 min, 35 ciclos (95°C 45 s, 61,5°C 30 s, 72°C 90 s) y 72°C 5 min. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Axygen, utilizando 200 ngr de ADN molde, primers en concentración final 10 mM y la enzima GoTaq® de la empresa Biondynamics, en un volumen final de 50 µl. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1% (Transgen®) durante 30 minutos a 80 V en una cuba electroforética Biorad. El marcador molecular que se utilizó fue de 1 KB (Transgen®). Los fragmentos fueron purificados directamente del gel utilizando un kit comercial (AccuPrep® PCR purification Kit, Bioneer) y se enviaron a secuenciar (Macrogen) para confirmar que la secuencia fuese la esperada. El rendimiento de dicha purificación y la pureza de la muestra se corroboró espectrofotométricamente (Nanodrop).

Para evaluar la expresión génica del gen en estudio se realizó una RT-PCR semicuantitativa utilizando un kit de Transcripción reversa provisto por Promega y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de PCR de punto final se siguió el mismo protocolo antes descrito para la amplificación del gen TcCLB.511071.140. Se utilizó el gen de la GAPDH como gen housekeeping, el

cual fue amplificado con los primers y condiciones adecuadas. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ.

4.2.2.2 Construcción de los vectores recombinantes

El producto de amplificación obtenido por PCR fue insertado en el vector de subclonado pJET el kit de clonado CloneJET PCR Cloning (#K1232, Thermo Fisher). Luego tanto el pJET-TcCLB.511071.140 como el vector de expresión se cortaron con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. El sistema de digestión estaba formado por 2 µl de buffer de corte, 1 µl de BamHI, 1 µl de HindIII, 1 µg de pJET recombinante ó 1 µg de pET 22 y agua desionizada hasta un volumen final de 20 µl. Se incubó ON a 37°C en un baño líquido con agitación constante y la digestión se detuvo exponiendo los tubos a una temperatura de 80°C durante 20 minutos. La eficiencia del corte se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Las bandas de interés (fragmento TcCLB.511071.140 y la forma lineal del vector pET22 b+) se purificaron directamente del gel (kit comercial AccuPrep PCR purification -Bioneer) y se ligaron por acción de la enzima T4 ligasa en una relación vector:inserto 1:20, siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.2.3 Transformación de bacterias con los vectores recombinantes

Tanto el vector pJET- TcCLB.511071.140 como el vector pET22- TcCLB.511071.140 fueron utilizados para transformar bacterias competentes de *Escherichia coli*, empleando la cepa DH5α o BL21 respectivamente. La competencia de las bacterias se obtuvo mediante método químico, utilizando cloruro de calcio y la transformación se llevó a cabo por shock térmico aplicado a 50 µl de bacterias competentes y 2 µl del producto de la ligación. A continuación, se agregaron 900 µl de medio LB y se dejó en recuperación durante una hora y media con agitación a 37°C. Finalmente, las bacterias transformadas fueron plaqueadas con rastrillo en placas de LB + Agar + Ampicilina (100 µg/ml) e incubadas ON a 37°C en estufa.

Se seleccionaron, por colony PCR (empleando el programa y los primers anteriormente descriptos), las bacterias portadoras del fragmento TcCLB.511071.140. Por secuenciación y posterior

alineamiento utilizando el algoritmo ClustalW se corroboró la identidad de la secuencia insertada. A partir de un cultivo ON de las colonias que resultaron positivas se purificaron los plásmidos recombinantes (pJET- TcCLB.511071.140 o pET22- TcCLB.511071.140) utilizando el kit de purificación EasyPure Plasmid MiniPrep (Transgen provisto por APBiotech). El rendimiento y la pureza de la extracción se determinó a partir de las lecturas de absorbancias a 260 nm, 280 nm y 230 nm (Nanodrop).

4.2.2.4 Purificación de la proteína recombinante producto de la secuencia nucleotídica TcCLB.511071.140.

A partir de un cultivo de bacterias de *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pET22-TcCLB.511071.140 (DO_{600} 0,600), se llevó a cabo inducción con IPTG (0,5 mM) durante 5 horas con agitación constante a 37°C. En las mismas condiciones se dejaron crecer un control no inducido y otro portador del plásmido sin el inserto. Las bacterias fueron cosechadas y resuspendidas en buffer Tris-HCl 0,05M pH 7,4. Mediante lisis celular por sonicación (tres pulsos a una amplitud de 14 micrones durante 45 segundos) y posterior centrifugación durante 10 minutos a 10000 rpm a 4°C, se obtuvo un sobrenadante libre de células (sobrenadante S). A partir del mismo se llevó a cabo una cromatografía de afinidad en una columna de Ni^{2+} (GE Healthcare), preparada y eluída según las indicaciones del fabricante. Tanto en el sobrenadante S como las fracciones eluídas de la columna se cuantificó la cantidad de proteína por una modificación del método de Bradford (Ernst & Zor, 2010) y se detectó la presencia de la proteína recombinante mediante el ensayo de dot-blot, revelando con un anticuerpo primario anti-His y un anticuerpo secundario asociado a HRP. Para la etapa de revelado la membrana se incubó 2 minutos en una solución que contenía 50 μ l peróxido de hidrógeno (10 volúmenes); 3 ml del buffer Tris-HCl 0,5M pH 8,2; 12 μ l de ácido cumárico y 25 μ l luminol. Luego de la incubación, se puso en contacto con una placa radiográfica, la cual fue posteriormente revelada utilizando un sistema de revelado fotográfico. Las fracciones con mayor concentración de proteínas se reunieron y representaron el stock de la proteína purificada.

4.2.3 Caracterización de la proteína recombinante

4.2.3.1 Determinaciones enzimáticas

- **Sistemas de incubación**

- **ALA-S:** El sistema de incubación utilizado es el reportado por Choi *et al.* (2004), que contiene buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5; glicina 5 mM, succinil coenzima A 1 mM, PLP 0,15 mM y 1-2 µg de enzima, en un volumen final de 100 µl. Se incubó 30 minutos a 37°C en un baño líquido con agitación constante y luego se detuvo la reacción por el agregado de 100 µl de TCA 10%.

- **Aminoacetona Sintetasa (AA-S):** Se siguió el protocolo descrito en Mukherjee & Dekker, 1987. El sistema de incubación está constituido por buffer PO4-K 200 mM pH 7,5, Glicina 100 mM, PLP 0,15 mM, Acetil-CoA 0,4 mM y 3-5 µg de enzima en un volumen final de 400 µl. Se incubó 30 minutos a 37°C en un baño líquido con agitación constante y luego se detuvo la reacción por el agregado de 400 µl de TCA 10%.

En ambos casos, la proteína desnaturalizada se separa por centrifugación durante 10 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante se utilizó para cuantificar el producto de la reacción.

- **Cuantificación del producto de la reacción**

Tanto la cuantificación de ALA como de AA se llevan a cabo previa condensación con acetil-acetona, formando un pirrol con una posición α -libre, capaz de reaccionar con el reactivo de Ehrlich, dando un complejo coloreado que puede ser cuantificado espectrofotométricamente (Mauzerall, & Granick, 1956). El sistema utilizado para la formación del pirrol contenía cada 100 µl de sobrenadante desproteinizado, 100 µl buffer acetato de sodio 1M pH 4,6; 10 µl de NaOH 3N, y 5 µl de acetil acetona. Se calentó durante 10 minutos a 100°C en un baño de agua, se dejó enfriar y se le agregó igual volumen de reactivo de Ehrlich modificado (Mauzerall, & Granick, 1956). El complejo coloreado se cuantificó leyendo la absorbancia a 510 nm entre los 10 y 30 minutos del agregado del reactivo. El coeficiente de extinción molar utilizado en los cálculos fue $7,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Batlle & Magnim, 1988).

En el caso de tener en la misma muestra ALA y AA, se procede a formar los pirroles, que deben ser separados, antes de agregar el reactivo de Ehrlich. Para la separación de los pirroles se dispone de dos métodos diferentes que se basan en la distinta solubilidad en éter etílico a pH básico y a la elución diferencial de una columna de intercambio iónico (Lien & Beattie *et al.*, 1982; Tishler & Winston, 1984).

El pirrol proveniente de la AA es extraído volumen:volumen con éter etílico, mientras que el pirrol proveniente del ALA permanece en la fase acuosa. De esta forma, cuantificando con el reactivo de Ehrlich antes y después de la extracción es posible, por diferencia, obtener la cantidad de AA y de ALA presente en la muestra. Cabe aclarar que la reacción colorimétrica se realiza siempre en la fase acuosa.

En el caso de emplear una columna de intercambio iónico con un intercambiador capaz de retener ambos pirroles (Dowex 1X8) la separación se realiza por una elución diferencial, en la cual el pirrol derivado de la AA eluye en n-butanol conteniendo hidróxido de amonio 0,1M. Mientras que el pirrol proveniente del ALA eluye en metanol: ácido acético glacial (2:1 v/v)

Cabe destacar que existe un método en el cual el ALA puede ser cuantificado por HPLC previa derivatización a un compuesto fluorescente (Oishi et al, 1996), pero el mismo no es capaz de distinguir entre ALA y AA.

- **Expresión de los resultados**

Se define, para ambas enzimas, una unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1 nmol de producto en 30 minutos, bajo las condiciones estándar de incubación.

4.2.3.2 Determinación del peso molecular

El peso molecular de la proteína recombinante se determinó mediante un ensayo de western blot revelado por autoradiografía, empleando un anticuerpo primario anti-His y un anticuerpo secundario unido a HRP utilizado según indicaciones del fabricante.

4.2.3.3 Competencia entre sustratos.

Ensayos de competencia entre los sustratos acetil-CoA y succinil-CoA por la proteína recombinante se llevaron a cabo midiendo actividad de ALA-S y AA-S, en las condiciones descriptas en el ítem correspondiente en el capítulo 5 de Resultados.

4.3 Evaluación de la actividad anti-*T.cruzi*

4.3.1 Ensayos *in vitro*

4.3.1.1 Determinación de IC₅₀

- **Epimastigotes:** A partir de parásitos cultivados durante 3 días, se preparó una suspensión que contenía entre 1,5 - 2,5 x 10⁶ parásitos/ml. Luego se inoculó una placa de 24 wells con 1,5 ml de dicha suspensión por wells. A cada well se le agregó la droga en estudio, vitamina C (1 a 10 μM), Porfirina A4 (2,5 a 15 μM) o Bnz (2,5 a 10 μM), este último utilizado como droga de referencia. Luego de 3 días, se evaluó la habilidad del compuesto para inhibir el crecimiento del parásito realizando un conteo celular en una cámara de Neubauer y los resultados se expresaron como densidad celular (DC). Los ensayos se realizaron por triplicado y fueron comparados con el control sin tratar. El porcentaje de inhibición (% I) fue calculado según la siguiente ecuación:

$$\% I = \left[1 - \left(\frac{DC_{3t} - DC_0}{DC_{3c} - DC_0} \right) \right] \times 100$$

Donde:

DC_{3t}: densidad celular de los parásitos tratados al día 3

DC₀: densidad celular de los parásitos al día 0

DC_{3c}: densidad celular de los parásitos sin tratar (control) al día 3

Se define el IC₅₀ de una droga como la concentración que inhibe en un 50% el crecimiento del parásito.

En el caso en que correspondiera, las muestras fueron iluminadas con luz blanca proveniente de un tubo fluorescente o de lámpara blanca. Las muestras se colocaron en placas de 24 pocillos con tapa de plástico transparente (2 mL de solución por pocillo). La fuente de luz se ubicó a 20 cm de dicha placa, siendo la única fuente de luz existente en un gabinete de iluminación completamente cerrado. Los tiempos de iluminación variaron, a intervalos de 15 minutos, entre 0 y 60 minutos.

- **Tripomastigote:** Los tripomastigotes presentes en una muestra de sangre proveniente de un ratón infectado se diluyen en medio RPMI hasta llegar a una concentración de $1,5 \times 10^6$ tripomastigotes/mL. Los parásitos fueron sembrados (150 μ l/well) por duplicado en una placa de 96 wells en presencia de vitamina C, aplicando concentraciones de entre 5 y 100 μ M, o en presencia de Porfirina A4 en concentraciones de entre 1 y 10 μ M y o en presencia de Bnz, aplicando concentraciones de entre 0,38 y 380 μ M. Las placas fueron incubadas según la metodología recomendada por la WHO por 24 horas a 4°C, y posteriormente se realizó el conteo de parásitos en cámara de Neubauer. Se calculó el porcentaje de lisis (%L) relativo al número de parásitos en el control (sin adición de la droga), y se definió el IC50 como la concentración que causa el 50% de lisis.

$$\% L = \left[1 - \left(\frac{DC_t}{DC_c} \right) \right] \times 100$$

Donde:

DCt: densidad celular de los parásitos tratados.

DCc: densidad celular de los parásitos sin tratar.

Aquellas muestras que fueron utilizadas para evaluar el efecto de la inactivación fotdinpamica con A4, fueron trabajadas de la misma manera que se describe en el caso de los epimastigotes.

- **Amastigote:** La inhibición del crecimiento de amastigotes fue evaluada sobre cultivos de macrófagos de la línea murina J774. Se sembraron 5×10^3 células por well con 100 μ l de medio RPMI en una placa de 96 wells y se incubó la placa durante 24 h a 37°C y con 5% de CO₂. Finalizada la incubación, los macrófagos fueron infectados con tripomastigotes transgénicos que expresan el gen de la β -galactosidasa, en relación parásito/células igual a 10:1 (Muscia *et al*, 2011). Después de 2 h de

incubación, la placa fue lavada para descartar los parásitos que no pudieron ingresar a la célula y se agregaron los compuestos a ensayar por duplicado. Tanto la vitamina C como el Bnz fueron ensayados en concentraciones desde 0,5 a 40 μM . Los controles incluyeron macrófagos no infectados (control 0% de infección) e infectados sin tratar (control 100% de infección). Luego de 7 días de crecimiento se cuantificó el número de parásitos transgénicos agregando CPRG (sustrato de la β -galactosidasa) en una concentración final de 100 μM y Nonidet P-40 con una concentración final de 1 %. Luego la placa fue incubada por un período de entre 4 a 6 horas a una temperatura de 37°C. Aquellos wells que presentaron actividad de β -galactosidasa viraron su color de amarillo a rojo. Este cambio fue cuantificado utilizando un lector de placas (SpectraCount, Packard) leyendo la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de inhibición (I %) fue calculado utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\% I = \left[1 - \left(\frac{A_{it} - A_{nit}}{A_{int}} \right) \right] \times 100$$

Donde:

A_{it} : Representa la absorbancia de las células infectadas y tratadas.

A_{nit} : Representa la absorbancia de las células no infectadas y tratadas.

A_{int} : Representa la absorbancia de las células infectadas no tratadas.

4.3.1.2 Actividad citotóxica

Los ensayos de citotoxicidad de los compuestos en estudio se llevaron a cabo *in vitro* usando células Vero (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires). Las células fueron sembradas en una placa de 24 wells en la que cada well contenía 500 μL de una suspensión de 9×10^5 células/ml. Dicha placa fue incubada a 37°C durante 24 horas. Luego de este período, se adicionó VitC, en concentraciones desde 5 a 5000 μM , y Bnz, en concentraciones desde 3 a 3000 μM , o porfirina A4 en DMSO (concentración final entre 0,01 - 10 μM) y la placa fue incubada nuevamente a 37°C por 48 horas. En el caso de la porfirina A4, las muestras fueron incubadas en luz durante 15 minutos previo a la incubación durante 48 hs. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue reemplazado por PBS y se añadió MTT a una concentración final de

0,5 mg/ml. Las células fueron incubadas por 1 hora a 37°C y luego resuspendidas en 500 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). Utilizando un lector de placas (SpectraCount, Packard) se leyó la absorbancia a 570 nm, tomando como blancos de reacción los valores de absorbancia de los wells que contenían solo medio y reactivos. Todos los ensayos con MTT fueron realizados por triplicado. Se definió la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) como la concentración que causa un 50% de muerte celular. El índice de selectividad (IS) fue calculado como la razón entre la concentración citotóxica 50% en células Vero y el IC₅₀ del compuesto para las células de *T. cruzi* (CC₅₀/IC₅₀).

4.3.1.3 Evaluación del estado de óxido-reducción del parásito

- **Contenido de grupos sulfhidrilos libres:** Los parásitos se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 0,05M pH 7,4. La suspensión fue sonicada y centrifugada durante 5 minutos a 5000 x g. Se descartó el pellet conservando el sobrenadante, el cual fue desproteinizado con TCA a una concentración final del 5%. El sistema de cuantificación contenía buffer fosfato de sodio 65 mM pH 8,0, EDTA 1,25 mM, DTNB 0,2 mg/ml y 0,25 ml de sobrenadante desproteinizado sobre el cual se mide el contenido de tioles, en un volumen final de 1,85 ml. Transcurridos 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, la cuantificación se realizó midiendo el cambio de absorbancia a 410 nm que ocurre cuando los grupos -SH reducen al 5,5'-ácido 2-nitrobenzoico (DTNB). Se utilizó la siguiente expresión matemática para calcular mmoles -SH/ml homogenato:

$$(A - B) \times 681,6 \times \frac{1}{0,9} \times 2$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra a 410 nm

B = Absorbancia del blanco a 410 nm

- **Estado oxidativo intracelular:** Se evalúa usando como sonda fluorescente H₂DCFDA. Los parásitos vivos se marcan (Sulsen *et al.*, 2011) con la sonda sensible a oxidación y se analizan por citometría de flujo (Becton Dickinson FACScalibur) con una l de excitación de 480 nm y de emisión

a 530 nm. Se utilizaron como control positivo parásitos tratados con una solución de peróxido de hidrógeno 0,2 mM. Los resultados de la citometría de flujo fueron expresados como Gmt/Gmc, donde Gmt y Gmc corresponden a la media geométrica de los histogramas obtenidos para las células tratadas y no tratadas respectivamente (Sulsen *et al.*, 2011)

4.3.2 Ensayos *in vivo*

4.3.2.1 Actividad anti-*T.cruzi* de la vitamina C

Para realizar las determinaciones *in vivo*, se utilizó un modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas. Se utilizaron 4 grupos de 6 ratones hembra cada uno, pertenecientes a la cepa C3H/HeN, de 8 semanas de edad. Los mismos fueron infectados con 5×10^3 tripomastigotes a través de la vía intraperitoneal. Cinco días después de la infección, se corroboró la presencia de parásitos circulantes por conteo de los parásitos en una cámara de Neubauer. Pasados siete días de la infección, se aplicaron los siguientes tratamientos:

- ✓ Grupo Vit C (1,5 mg/kg de peso/día).
- ✓ Grupo Bnz (0,75 mg/kg/día).
- ✓ Grupo Vit C (1,5 mg/kg de peso/día) + Bnz (0,75 mg/kg/día).
- ✓ Grupo Control, sólo administración del vehículo (PBS 0,05M).

Las drogas fueron resuspendidas en 0,05M PBS (pH 7,2). Bnz fue empleado como droga de referencia y el grupo 4 como grupo control. La administración de las drogas se realizó de lunes a viernes durante 2 semanas desde el día 7 hasta el día 12 post-infección y desde el día 15 hasta el día 20 post-infección mediante inoculación intraperitoneal. Los niveles de parasitemia fueron controlados extrayendo 5µl de sangre de la vena de la cola del ratón. La sangre extraída de esta manera fue diluida 5 veces con buffer de lisis (0,75% NH₄Cl, 0,2% Tris, pH 7,2) para minimizar la interferencia que producen los glóbulos rojos en el conteo, usando una cámara de Neubauer. El número de muertes por grupo fue registrado diariamente.

4.3.2.2 Citotoxicidad *in vivo* del Bnz

Para determinar si la presencia de la vitamina C era capaz de disminuir la citotoxicidad provocada por el Bnz *in vivo* se siguieron los siguientes protocolos: i) se utilizaron lotes de 5 ratones macho de la cepa CF1 de 8 semanas de edad a los que se les administró durante 5 días vía intraperitoneal una inyección diaria de Bnz 0,7 mgr/kg/día o 1,4 mgr/kg/día, en presencia o ausencia de Vitamina C (1,50 mgr/kg/día). ii) En lotes de 5 ratones se evaluaron la administración de dos dosis diarias de Bnz 3,33 mgr/kg/ aplicadas durante 2, 3 o 4 días.

En todos los casos el lote control fue inyectado con el vehículo de la droga y los animales fueron eutanasiados al quinto día, extrayéndose por punción cardíaca muestras de sangre las cuales se utilizaron para medir daño hepático (evaluado mediante la actividad de aspartato aminotransferasa - AST y alanina aminotransferasa – ALT) y daño renal (evaluado a través de los niveles de creatinina en plasma) utilizando los kits de Wiener lab y siguiendo las instrucciones del fabricante. También se midió la cantidad de tioles presentes en homogenatos de los hígados de los animales tratados y control. Los tioles fueron expresados en nmoles grupos SH/mgr proteína. El contenido de proteínas fue medido con el método de Bradford modificado (Ernst & Zor, 2010). Los tioles se calcularon tal como se describe en la sección 4.3.3.1

El uso y cuidado de los animales se llevó a cabo según las normas establecidas por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

4.4 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó trabajando con duplicados y fue repetido por lo menos 3 veces de manera independiente. Los datos se expresaron como el promedio de los 3 experimentos \pm la desviación standard (n=3). Los valores de IC₅₀ fueron calculados graficando el porcentaje de inhibición (% I) o el porcentaje de lisis (% L) en función del logaritmo de la concentración de la droga (μ M), y ajustados por regresión no lineal a una curva sigmoidea (Sigmaplot 12). Los datos obtenidos por citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo V10. Las diferencias significativas entre los valores obtenidos bajo las diferentes condiciones experimentales se determinaron por el test t de Student o el

análisis de varianza de una vía (ANOVA) con análisis post-hoc usando el test de Tukey. Los valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El nivel de parasitemia y la pérdida de peso se analizaron usando el test U no paramétrico de Mann-Whitney. La parasitemia se expresa como área bajo la curva (AUC). Las curvas de sobrevida fueron analizadas con el test log-rank.

Resultados y Discusión

Capítulo 5

Metabolismo del Hemo en *Trypanosoma cruzi*

Páginas

5.1 Análisis bioinformáticos de la secuencia candidata a codificar la enzima ALA-S.....	74
5.2 Detección y cuantificación de ALA	86
5.3 Obtención y caracterización de la proteína recombinante TcpHem1.....	93
5.4 Conclusiones parciales del capítulo 5	99

En este capítulo expondremos los resultados del estudio bioinformático y experimentales del metabolismo del hemo en *T.cruzi*. En principio, corroboramos por bioinformática la probable participación de la secuencia TcCLB.511071.140 en la síntesis de ALA y confirmamos la presencia de ALA intra y extracelularmente en cultivos del parásito. La secuencia en estudio fue clonada y la proteína recombinante fue caracterizada.

5.1 Análisis bioinformáticos de la secuencia candidata a codificar la enzima ALA-S

5.1.1 Búsqueda de una secuencia candidata

A pesar de que *Trypanosoma cruzi* es un organismo hemodeficiente (Cenci *et al.*, 2016), Lombardo *et al* (2003) reportaron, en un cultivo de epimastigotes, la presencia de ALA (primer metabolito específico de la biosíntesis de hemo) dentro y fuera del parásito. En base a este dato, y sabiendo que la producción de ALA solo se lleva a cabo vía una reacción enzimática, nos propusimos buscar dentro del genoma de *T.cruzi* una secuencia candidato a codificar la enzima ALA-S. Utilizando la herramienta Psi-Blast dentro de Blastp, y como referencia la secuencia de la isoforma del ALA-S de *Homo sapiens* (NP_001291373), construimos una matriz de puntuación sitio específica (PSSM) que nos permitiera identificar proteínas homólogas entre organismos muy distantes evolutivamente, como es el caso entre *Homo sapiens* y *Trypanosoma cruzi*. El algoritmo de Psi-blast construye un alineamiento múltiple, y luego un perfil (PSSM), a partir de cualquier alineamiento local significativo encontrado. La secuencia original, en este caso NP_001291373 sirve como plantilla para los alineamientos múltiples y la construcción del perfil (Altschul & Koonin; 1998). La PSSM se construye a partir de varias iteraciones, las cuales permite encontrar y agregar nuevas secuencias a la matriz. En la primera iteración arrojó los resultados de secuencias proteicas pertenecientes únicamente de distintos grupos de vertebrados. En una segunda iteración, se utilizaron los resultados arrojados en la primera para buscar nuevas proteínas. Este paso se repitió una vez más y finalmente se descargó la PSSM, la cual se utilizó para buscar secuencias tipo ALA-S en el genoma de *T.cruzi*. En todos los casos, las secuencias de proteínas que fueron encontradas con las sucesivas iteraciones correspondieron a enzimas ALA-S cuya identidad fue corroborada experimentalmente. Cuando se aplicó la PSSM así generada al genoma del parásito la búsqueda arrojó 7 resultados que cumplieran con las condiciones de score y de e-value. Todas ellas son secuencias de proteínas que no han sido corroboradas experimentalmente. Se eligió para trabajar la secuencia XP_814009.1, la cual presentaba el mejor score (177) y el mejor e-value (3×10^{-49}). La proteína está identificada como 2-amino-3-

ketobutyrate coenzyme A ligase, también conocida como aminoacetona sintetasa (AA-S), enzima presente tanto en procariotas como eucariotas relacionadas con la conversión de la L-treonina a glicina. Tanto en las células procariotas como en las eucariotas, esto tiene lugar en un proceso de dos pasos (Figura 5.1), que involucra la L-treonina deshidrogenasa (TDH) y la AA-S, siendo esta reacción reversible con una eficiencia muy reducida (Schmidt *et al.*, 2001) La L-treonina, por acción de la TDH, se convierte primero en 2-amino-3-cetobutirato, el cual reacciona con la coenzima A en una reacción catalizada por la AA-S para formarse glicina y acetil-CoA. El 2-amino-3-cetobutirato es un intermediario muy reactivo que rápidamente se descarboxila para formar aminoacetona (AA) y CO₂.

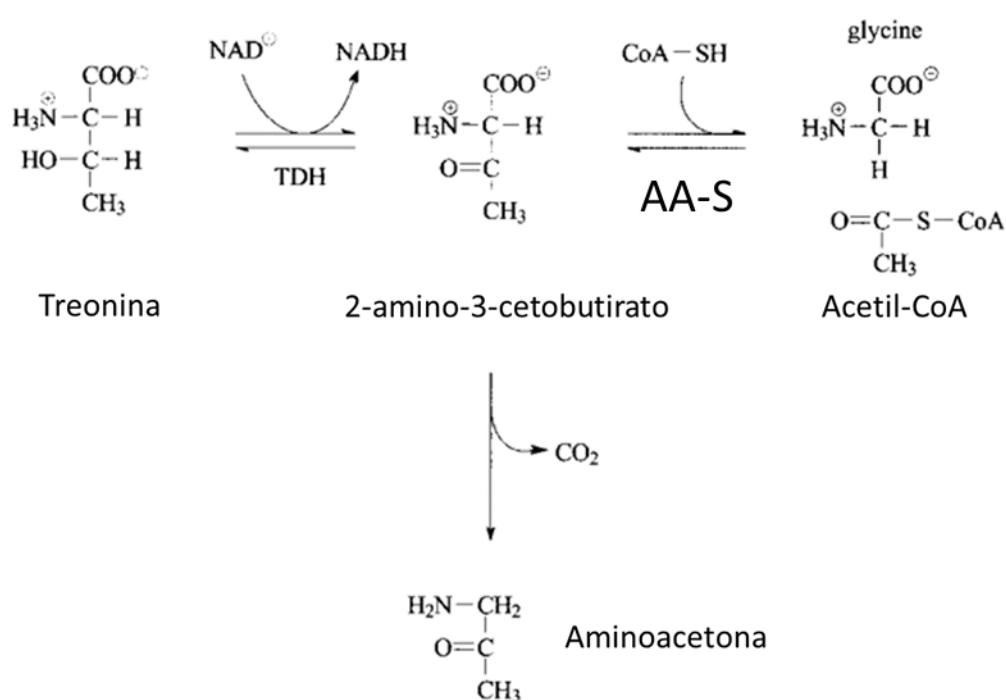


Figura 5.1: Metabolismo de la treonina. A partir del producto de la TDH, la enzima AA-S es capaz de catalizar la formación de acetil-CoA y glicina, en forma reversible. Independientemente de esta reacción el 2-amino-3-cetobutirato, es inestable y se descarboxila para dar aminoacetona y CO₂.(Adaptado de Schmidt et al., 2001)

La AA-S es miembro de una familia de proteínas conocidas como aminotransferasa clase II. Las enzimas miembros de esta familia son dependientes de piridoxal fosfato (PLP), el cual se une covalentemente a una lisina conservada formando una base de schiff. Dentro de esta familia se encuentra la enzima ALA-S. Cabe esperar que ambas enzimas, ALA-S y la AA-S compartan un alto porcentaje de identidad tanto de secuencia como de estructura. Si alineamos la secuencia del ALA-S

humana y de la proteína XP_814009.1 utilizando la herramienta Blast observamos que el porcentaje de identidad entre ambas es del 30% (figura 5.2). Este porcentaje refleja lo alejado evolutivamente que se encuentran los organismos de los cuales provienen estas secuencias. En UniProt, la proteína XP_814009.1 (a la cual denominamos TcpHem1 por *Trypanosoma cruzi* putativa **Hem1**, siendo Hem 1 la referencia de ALA-S) esta registrada con el código Q4DI02. La información provista por la plataforma indica que no existen estudios experimentales que comprueben que la secuencia corresponde efectivamente a la enzima en cuestión, y que su anotación es una predicción bioinformática, lo cual concuerda con la nomenclatura de su anotación en NCBI.

Range 1: 32 to 404 GenPept Graphics						Next Match Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities		Positives	Gaps	
551 bits(1421)	0.0	Composition-based stats.	115/378(30%)		196/378(51%)	19/378(5%)	
Query 253	SDSLITKKQVSV-----	WCSNDYLGMSRHPVCGAVMDTLKQHGAGAGGTRNI	300				
Sbjct 32	S+ +IT KQ ++	+C+N+YLG++ +P V A D L+ HG G R I					
Query 301	SGTSKFHVDLERELADLHGKDAALLFSSCFVANDSTLFTLAKMMPGCEIYSDSGNHASMI	360					
Sbjct 92	GT+ H LE + G + +L+ SCF AN L I SD+ NHAS+I	CGTTDIHKKLEDTMTKFLGTEDTILYPSCFDANGGVFEALLNEQDA--IISDALNHASII	149				
Query 361	QGIRNSRPVKYIFRHNDVSHLRELLQRSDPSVPKIVAFETVHSDMGAVCPLEELCDVAHE	420					
Sbjct 150	G+R + ++ + H D++ L LQ++ +++ + V SMDG V PL+++ +A +	DGVRLCKAERHRYAHMDMAELETALQKTQDKRIRLIVTDGVFSMDGDVAPLDKIVALAEK	209				
Query 421	FGAITFVDEVHAVGLYGARGGGIGDRDGVMPKMDIISGTLGKAFGCVGGYIASTSS-LID	479					
Sbjct 210	+ A VD+ HA G G G G GV+ K+DI++ TLGKA G G ++S S +++	YNANIMVDDSHATGFMGEGGRGPTLFGVVDKVDILNTTLGKALGGASGGLSSGSKEIVE	269				
Query 480	TVRSYAAGFIFTTSLPPMLLAGALESVRILKSAEGRVLRQHQHNVKLMRQMLMDAGLPV	539					
Sbjct 270	R ++F+ ++ P + G+L+ + +L+++ +++ Q N +L R + AGL +	VQRQKGRPYLFSNTIAPAAVGSLKVMELLQNSS--SAQKKLQENTRLFRTEMKKAGLTL	327				
Query 540	V-HCPSHIIPVRVADAANKTEVCDELMSRHNIVQAINYPVPRGEELLRIAPTPHHTPQ	598					
Sbjct 328	H I+PV + DA E +MS+ IYV A +YP VP G+ +R + H+ +	TGHEECPIPVMLYDARIAGEFASRMMSQ-GIYVIAFSYPVVPNGKARIRQLSAAHSTE	386				
Query 599	MMNYFLENLLVTWKQVGL 616						
Sbjct 387	+ +E K++ +	DVMRAVEAFKTIKKELNV 404					

Figura 5.2: Alineamiento entre la secuencia de ALA-S humana (query) y la proteína XP_814009.1 (subject). El porcentaje de identidad entre ambas secuencias es del 30%. Se observa que, aunque no son estrictamente similares, las sustituciones presentes fueron realizadas por aminoácidos con las mismas características químicas (signos positivos).

Por otro lado, utilizando la herramienta ProtParam, obtuvimos los siguientes datos de la secuencia en estudio: 404 aminoácidos, PM 43.68 kDa y PI de 7,2. La enzima ALA-S de *Homo sapiens* cuenta con 640 aminoácidos, un PM de 70 KDa y un PI de 8,57, mientras que la enzima ALA-S de *Sphingomonas spp* (WP_218916739.1) posee 404 aminoácidos, un PM de 43,60 KDa y un PI de 6,23. Resultados similares a los de *Sphingomonas* encontramos si analizamos la secuencia de esta

enzima en el organismo *Euglena* (GenBank: AAG61086.1, 446 aminoácidos, 48,24 KDa y un PI de 6,51). Esto nos indica que, dentro de los eucariotas más relacionados con *T.cruzi*, las enzimas ALA-S tienen características similares a la proteína TcpHem1. Cabe destacar que, si se utilizan estas proteínas como molde para una búsqueda en Blast, los resultados arrojados son los mismos que si se utiliza la secuencia humana del ALA-S.

Independientemente a la reacción catalizada por el ALA-S, el ALA puede formarse también por la vía de 5-C, sin embargo, no existen reportes que avalen que esta vía se encuentra activa en *Trypanosoma cruzi* (Battle *et al.*, 1997). La búsqueda bioinformática no arrojó resultados positivos para las enzimas involucradas en esta vía: glutamil-tRNA reductasa y glutamato-1-semialdehído aminotransferasa. Estos resultados son importantes si tenemos en cuenta que el ALA-S puede derivar de alguna de estas dos enzimas (Schulze, 2006).

Otra hipótesis, reporta que el ALA-S pudo haberse originado mediante una duplicación génica de un gen que codificaba para una enzima PLP dependiente cuyo sustrato tenía unido CoA. Esta enzima podría haber modificado su especificidad manteniendo únicamente la condición de que el sustrato tenga unido CoA (Oh-Hama; 1997).

5.1.2 Estudio de la localización celular de la secuencia TcpHem1

Tanto la enzima ALA-S como la enzima AA-S son enzimas de localización mitocondrial (Hunter & Ferreira; 2009, Edgar & Polak; 2000), por lo que decidimos evaluar la probabilidad de que la secuencia en estudio pueda ser enviada a mitocondria. Algunas enzimas mitocondriales son codificadas por el núcleo celular. Estos genes fueron producto del proceso de endosimbiosis, en el cual, algunos genes mitocondriales migraron al núcleo. Este evento requirió que las proteínas mitocondriales, ahora codificadas en el genoma nuclear, tengan una secuencia que permita que la proteína se sintetice en el citoplasma y sea enviada a la mitocondria (Roger *et al.*, 2017). Para estudiar si proteína TcpHem1 tenía señal de envío a mitocondrias utilizamos la herramienta Mitoprot, la cual informó, que nuestra secuencia tiene una probabilidad de 0,9874 de ser exportada a la mitocondria y el sitio de clivaje predicho es: MFCTALRFANPALRQIAAAQIAA. Por otro lado, según los trabajos de

Lathrop & Timko (1993), la pre-secuencia de ALA-S contiene, el sitio de clivaje antes mencionado y dentro de este al menos un sitio denominado HRM donde el Hemo interactúa con la proteína e impide su unión con el receptor de la membrana mitocondrial, evitando su ingreso a la mitocondria. La secuencia HRM consenso propuesta por los autores es la siguiente: (R, K o N)-C-P. La K puede ser cualquier aminoácido hidrofóbico incluyendo metionina y leucina. Podemos observar en la secuencia de clivaje el motivo RFANP, donde la fenil-alanina y la alanina son aminoácidos hidrofóbicos. Este dato nos lleva a pensar que la secuencia proteica en estudio podría interactuar con hemo y estaría regulando su entrada a la mitocondria. En la secuencia de la pre-ALA-S humana, el dominio HRM presenta la siguiente secuencia: RRCP. Para las enzimas AA-S no existen reportes de la presencia de este dominio.

Ikushiro *et al* (2018) reportó que el ALA-S de *Caulobacter vibroides* poseía en su secuencia proteica una histidina capaz de interactuar con el Hemo, el cual, al unirse a la proteína, desplazaba al cofactor PLP y volvía a la enzima inactiva. Esta Histidina también se encuentra presente en el ALA-S de *R.capsulatus*, pero no así en el ALA-S humana en ninguna de sus isoformas. Cuando analizamos las secuencias de las ALA-S de *R.capsulatus* y de *C. vibroides* contra la proteína TcpHem1 utilizando la herramienta Cobalt de Blast (Figura 5.3) observamos que la zona donde podría estar la histidina que interactúa con el hemo es una zona muy conservada (coloración roja), pero la histidina se encuentra reemplazada por una isoleucina en el caso de nuestra proteína. Ambos aminoácidos tienen naturaleza química distintas (la histidina es un aminoácido polar con carga neta positiva, mientras que la isoleucina es un aminoácido apolar sin carga), por lo que la sustitución de un aminoácido por el otro no estaría siendo una sustitución sinónima y sería de esperar que la isoleucina no se comportara químicamente igual que la histidina. Este resultado nos estaría indicando que la ausencia de la histidina necesaria para la interacción proteína-hemo reportada por Ikushiro *et al* (2018) no le permitiría a nuestra secuencia proteica ser regulada por hemo por unión directa de este producto. Esto no descarta que los mecanismos clásicos de regulación del ALA-S (represión de la expresión génica, desestabilización del mensajero e impedimento de entrada a la mitocondria) antes mencionados en el capítulo 1 no estén funcionando. Por otro lado, esta histidina, solo fue reportada en las secuencias

mencionadas, pero no se encuentra presente en las ALA-S humanas, así como tampoco en las de *Euglena spp* o *Sphingomonas spp*

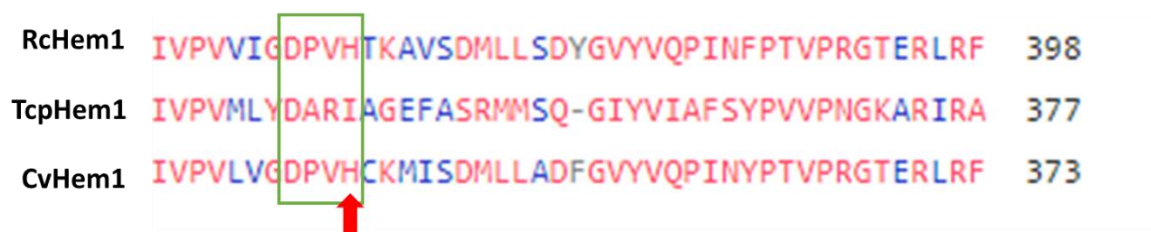


Figura 5.3: Alineamiento de las secuencias de ALA-S de *R. capsulatus*, la proteína XP_814009.1 de *T. cruzi* (TcpHem1) y *C. vibroides* (CvHem1). El recuadro verde muestra la zona donde se encuentra la histidina (marcada con una flecha roja) que interactúa con el hemo (Ikushiro *et al*; 2018). Los aminoácidos en rojo representan una zona muy conservada de la proteína, los aminoácidos en azul representan zonas de baja conservación.

5.1.3 Identificación de dominios funcionales y estructura secundaria de la proteína TcpHem1

Mediante la herramienta web Prosite determinamos que la secuencia estudiada presenta un dominio identificado como aminotransferasa clase II (Figura 5.4), al igual que las ALA-S de los eucariotas (Schulze, 2006). Este dominio se caracteriza por presentar una lisina altamente conservada responsable de la unión del piridoxal fosfato, cofactor de las enzimas de esta familia. Tanto en Prosite como en Pfam, ambas proteínas (ALA-S y AA-S) solo poseen este tipo de dominio. Por otro lado, utilizamos la herramienta AlphaFold para modelar la proteína TcpHem1 y utilizando el software de visualización de moléculas VMD obtuvimos el gráfico de Ramachandran (Figura 5.5), el cual permite aproximar, *a priori*, cuál será la estructura secundaria del péptido, ya que existen combinaciones de ángulos típicas para cada estructura (α -hélice y hoja β).

MFCTALRFANPALRQIAAAQIAAVKEAGTYKSERVITSKQSAIDVQSSTQPLLNFCAANNYLGLAG
 NPEVIQAAKDALETHGYGLASVRFICGTTDIHKKLEDMTKFLGTEDTILYPSCFDANGGVFEALL
 NEQDAIISDALNHASIIDGVRLCKAERHRYAHMDMAELETALQKTQDKRIRLIVTDGVFSDGDVA
 PLDKIVALAEKYNANIMVDDSHATGFMGEGGRGPTLFGVVDKVDILNT **TLGKALGGAS**GGLSSGS
 KEIVEVQRQKGRPYLFSNTIAPAAVGGSLKVMELLQNSSAQKKLQENTRLFRTEMKKAGLTLTGH
 EECPIVPVMLYDARIAGEFASRMMSQGIYVIAFSYPVVPNGKARIRAQLSAAHSTEDVMRAVEAFK
 TIKKELNV

Figura 5.4: Secuencia TcpHem1 analizada con la herramienta web Prosite. En amarillo se destacan los aminoácidos principales (248-257) del dominio aminotransferasa clase II donde se encuentra la lisina (K) del sitio de unión a piridoxal fosfato.

En el primer cuadrante se hallan las combinaciones de la hélice α derecha, en el segundo cuadrante las combinaciones de la hoja β y en el tercer cuadrante se hallan la hélice α izquierda y los giros o bucles loops

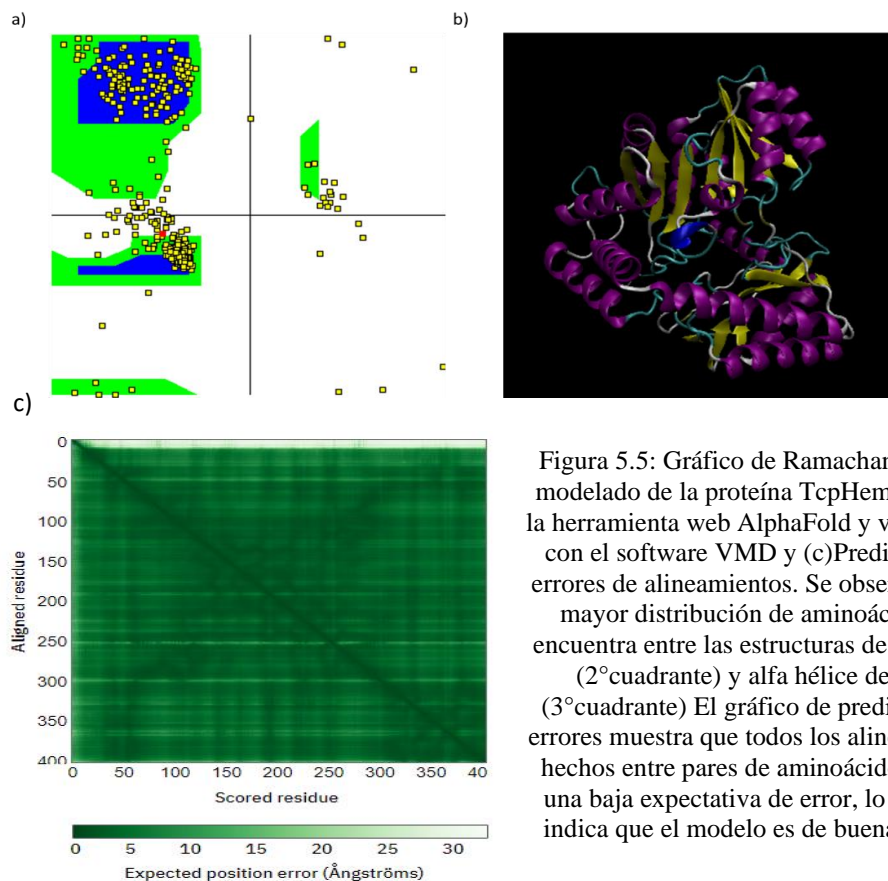


Figura 5.5: Gráfico de Ramachandran (a), modelado de la proteína TcpHem1 (b) con la herramienta web AlphaFold y visualizada con el software VMD y (c) Predicción de errores de alineamientos. Se observa que la mayor distribución de aminoácidos se encuentra entre las estructuras de hoja beta (2º cuadrante) y alfa hélice derecha (3º cuadrante). El gráfico de predicción de errores muestra que todos los alineamientos hechos entre pares de aminoácidos tienen una baja expectativa de error, lo cual nos indica que el modelo es de buena calidad.

En el gráfico de Ramchandran (Figura 5.5a) se pueden observar que la mayor cantidad de aminoácidos se encuentran formando hojas beta y alfas hélices derechas, lo cual se puede observar

también en la figura 5.5 b. Vemos que la estructura secundaria de la proteína TcpHem1 posee aproximadamente 10 alfas hélices y 9 hojas beta. En *R. capsulatus*, cada monómero del ALA-S (también es un homodímero) consta de tres dominios, el dominio N-terminal consta de una hélice α , alejada del resto del monómero, y una hoja β antiparalela de tres cadenas. El gran dominio central o catalítico lleva una hoja β de siete cadenas, en gran parte paralela cubierta a cada lado por nueve hélices α en motivos β/α repetidos. El dominio C-terminal incluye una hoja β antiparalela de tres hebras que contacta con los dominios N-terminal y catalítico del mismo monómero y tres hélices α que contactan con el dominio N-terminal. En este caso, vemos que la enzima posee alrededor de 13 hélices α y 4 hojas β aproximadamente (Figura 5.5b). Cabe aclarar que el estudio de la estructura secundaria nos permitió realizar un docking molecular para evaluar especificidad por sustrato.

Con el objetivo de determinar si la proteína en estudio se relacionaba más estructuralmente con una enzima del tipo ALA-S o una enzima del tipo AA-S, así como también, determinar si ambos tipos de proteínas podían identificarse por sus estructuras, realizamos un alineamiento estructural, el cual conlleva una superposición óptima de las proteínas y establecer por cercanía espacial cuales son los residuos equivalentes en cada secuencia. Para llevar a cabo esto, utilizamos las estructuras cristalográficas de las ALA-S y de las AA-S o KBL depositadas en PDB junto con la predicción estructural de la proteína TcpHem1 obtenida desde AlphaFold. Los resultados se muestran en la figura 5.6.

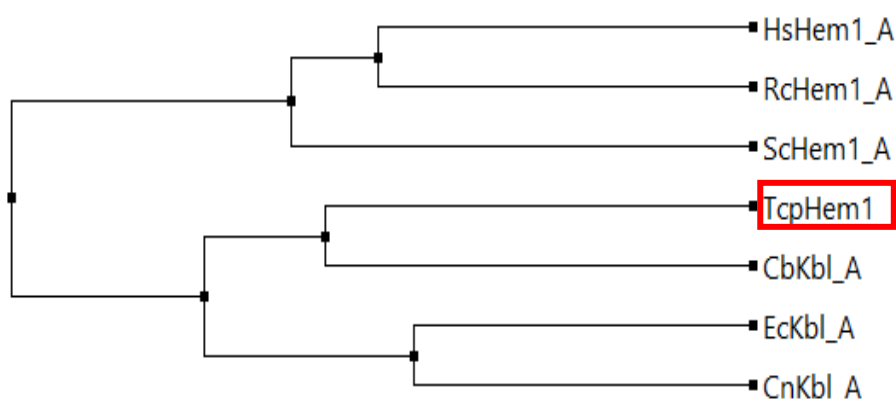


Figura 5.6: Dendrograma estructural de enzimas ALA-S y AA-S (Kbl) obtenidas de la base de datos PDB junto con la predicción estructural de la proteína TcpHem1. Se puede observar que la secuencia de interés se agrupa con las enzimas tipo AA-S. Para este dendrograma se utilizó la herramienta de alineamiento estructural y construcción de dendogramas del software VMD. HsHem1: ALA-S humana, RcHem1: ALA-S de *R.capsulatus*, ScHem1: ALA-S de *S.cerevisiae*, CbKbl: AA-S de *C.burnetti*, EcKbl: AA-S de *E.coli* y CnKbl: AA-S de *C.necator*. En rojo se encuentra señalada la proteína TcpHem1

Tal como podemos observar las distintas ALA-S seleccionadas y las AA-S se separan en dos grupos, lo cual nos indica que, a partir de su estructura, podemos distinguirlas. La proteína TcpHem1 se agrupa con las enzimas tipo AA-S. A partir del alineamiento estructural pudimos determinar que el dominio aminotransferasa Clase II en la proteína TcpHem1 abarcaría desde los aminoácidos 193 a 323. Esta conclusión pudimos obtenerla luego de comparar estructuralmente las secuencias del ALA-S humana con la de la proteína TcpHem1. Según Uniprot (P13196) el dominio aminotransferasa clase II, en el caso del ALA-S humano, abarca desde la posición 386 a la 475. Cabe destacar que, según prosite, los aminoácidos más importantes de este dominio se encontraban en la posición 248 a la 257; como se puede ver, estas posiciones se encuentran contenidas dentro del rango estimado para el dominio en cuestión dentro de la secuencia de la proteína TcpHem1. Por otro lado, si buscamos en Pfam la secuencia de la proteína TcpHem1, esta herramienta identifica el mismo dominio entre las posiciones 53 a 353 y si observamos, este rango contiene perfectamente al determinado con la predicción del alineamiento estructural.

5.1.4 Comparación de la secuencia de la proteína TcpHem1 con otras proteínas de la familia.

La proteína TcpHem1 es un miembro de las aminotransferasas de clase II. Otros miembros de la familia son la enzima ácido 5-aminolevulínico sintetasa y la serina palmitoiltransferasa. La relación entre la proteína en estudio y algunos miembros seleccionados de la familia de las aminotransferasas de clase II se muestran como un dendograma en la Fig. 5.7. Se puede observar que la proteína TcpHem1 se agrupan en la misma rama del árbol de las AA-S de los organismos seleccionados y estas ramas son distintas de otros miembros de la familia. Como *outgroup* se eligió un miembro muy distante de la familia de las aminotransferasas, la tirosina aminotransferasa humana (HsAtty) según PFam. El dendograma antes expuesto fue construido utilizando el método de comparación UPGMA (media aritmética pareada no ponderada). Este algoritmo utiliza un método de distancia para la reconstrucción de árboles filogenéticos. UPGMA supone tasas de evolución constantes y compara de a pares las secuencias a partir de un alineamiento. En este caso, el alineamiento para la construcción del

árbol que se muestra en la figura 5.10 fue construido con el programa Clustal utilizando la secuencia completa de las proteínas. Nuevamente, podemos observar que, si realizamos un alineamiento de secuencia, la proteína TcpHem1 se agrupa con las enzimas tipo AA-S. Resultados similares a los obtenidos en el dendograma estructural de la figura 5.6

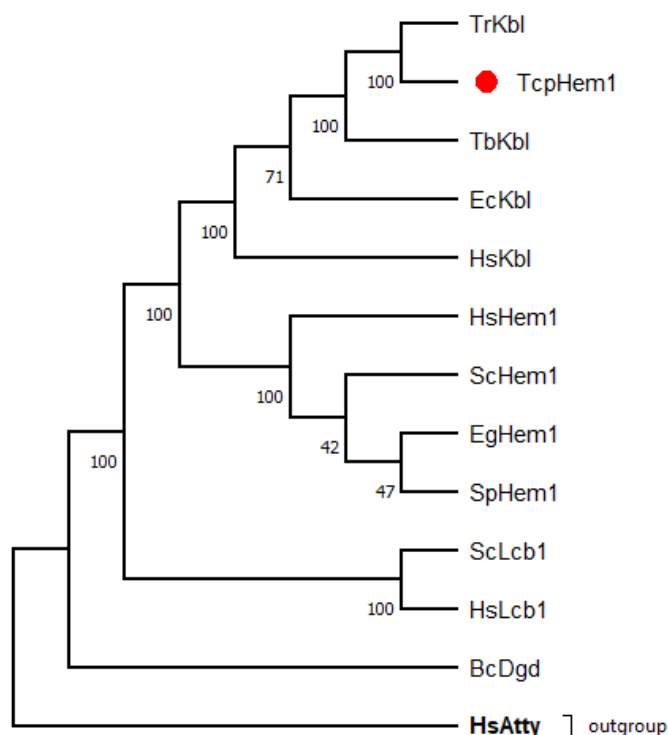


Figura 5.7: Dendograma que muestra la similitud entre las secuencias de distintos miembros de la familia de las aminotransferasas clase II. Con un punto rojo se encuentra marcada la proteína de estudio en esta tesis. Las secuencias elegidas fueron: AA-S humana (HsKbl), AA-S de *E.coli*, (EcKbl) AA-S de *T.brucei* (TbKbl), AA-S de *T.rangeli* (TrKbl), ALA-S Humana (HsHem1), ALA-S *S.Cerevicie* (ScHem1), ALA-S *E.gracilis* (EcHem1), ALA-S *Sphingomonas* (SpHem1), Serina palmitoiltransferasa humana (HsLCB1) y Serina palmitoiltransferasa de *S.cerevicie* (ScLCB1). Como outgroup se eligió la proteína tirosina aminotransferasa humana (HsAtty). Se utilizó el software Mega y el algoritmo de alineamiento Clustal.

5.1.5 Docking molecular con succinil-CoA y acetil-CoA

El *docking* molecular es un método basado en la estructura *in silico* ampliamente utilizado en el descubrimiento de fármacos. El *docking* permite la identificación de nuevos compuestos de interés terapéutico, la predicción de interacciones ligando-target a nivel molecular o la delimitación de relaciones estructura-actividad (Pinzi & Rastelli; 2019). Como hemos expuesto hasta el momento, los

estudios bioinformáticos nos han permitido identificar una secuencia a la que llamamos TcpHem1 como una posible ALA-S o AA-S. La enzima AA-S es específica para su sustrato acetil-CoA, por lo que es incapaz de tomar succinil-CoA y fabricar ALA (Schmidt *et al.*, 2001; Mukherjee & Dekker, 1987), sin embargo, la enzima ALA-S es capaz de tomar ambos sustratos y, por lo tanto, fabricar aminoacetona o ALA (Figura 5.8).

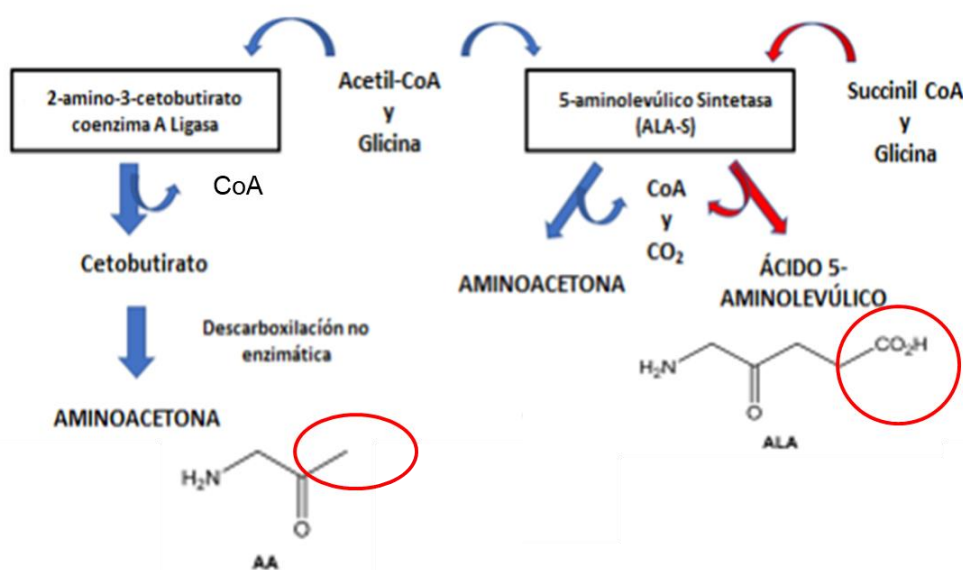


Figura 5.8: Esquema de las reacciones de la enzima AA-S (Kbl) y el ALA-S. En rojo se resalta las diferencias químicas entre la aminoacetona (AA) y el ALA. Estas diferencias permiten generar pirroles por condensación con diferentes solubilidades, propiedad que fue utilizada para los ensayos de detección y cuantificación de ALA intra y extracelular.

En vista de este comportamiento, decidimos hacer un *docking* molecular con la proteína TcpHem1 y los sustratos posibles (acetil-CoA y succinil-CoA). Para esto, utilizamos la predicción bioinformática de la estructura de TcpHem1 obtenida de AlphaFold y las estructuras de los sustratos acetil-CoA y succinil-CoA que se encuentran cargados en la base de datos Zinc con los códigos: ZINC8551095 y ZINC8215552 y como ACO y SCA en PDBeChem respectivamente. Utilizamos el software Autodock Vina para hacer los *docking* moleculares y los resultados se pueden observar en la figura 5.9 y en la figura 5.10.

El *software* Autodock vina ofrece como dato la energía libre de Gibbs calculada para las distintas posiciones conformacionales del sustrato en la zona donde se le indica al programa realizar el *docking*. Cuanto más negativa es la energía más espontánea y probable se vuelve la reacción.

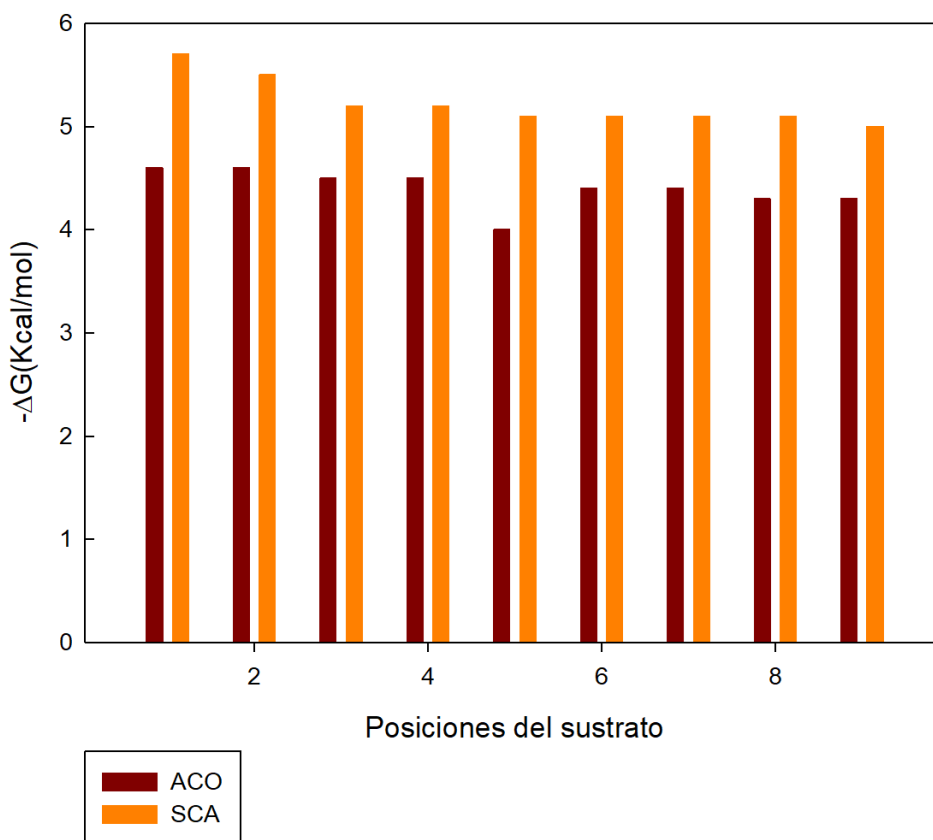


Figura 5.9: Gráfico de las energías libres de gibbs (kcal/mol) para las distintas posiciones del sustrato (1 a 9) de la proteína TcpHem1 en presencia de ACO o SCA. Observamos que no existe un patrón claro que pueda indicar que la proteína posee más afinidad por un sustrato que el otro, lo que nos lleva a pensar que podría estar aceptando ambos sustratos por igual. El docking molecular fue realizado utilizando el programa Autodock. La proteína TcpHem1 fue modelada utilizando la plataforma virtual AlphaFold. Los sustratos fueron obtenidos de la base bioinformática PDBChem.

Como se puede observar (Figura 5.12), no existe un patrón claro que nos permita decir que la proteína tiene más afinidad por un sustrato que por el otro, lo que nos lleva a pensar que podría estar aceptando ambos sustratos por igual. Cabe aclarar que el sitio utilizado para realizar el *docking* es donde se encuentran los aminoácidos más importantes del dominio aminotransferasa clase II, los cuales fueron determinados utilizando la plataforma Prosite. La posición 6 para acetil-CoA resultó ser

la que coincidía en cercanía con los aminoácidos más importantes del sitio activo (Figura 5.10, a y c), mientras que para succinil-CoA, esa posición resultó ser la 2 (Figura 5.10, b y d)

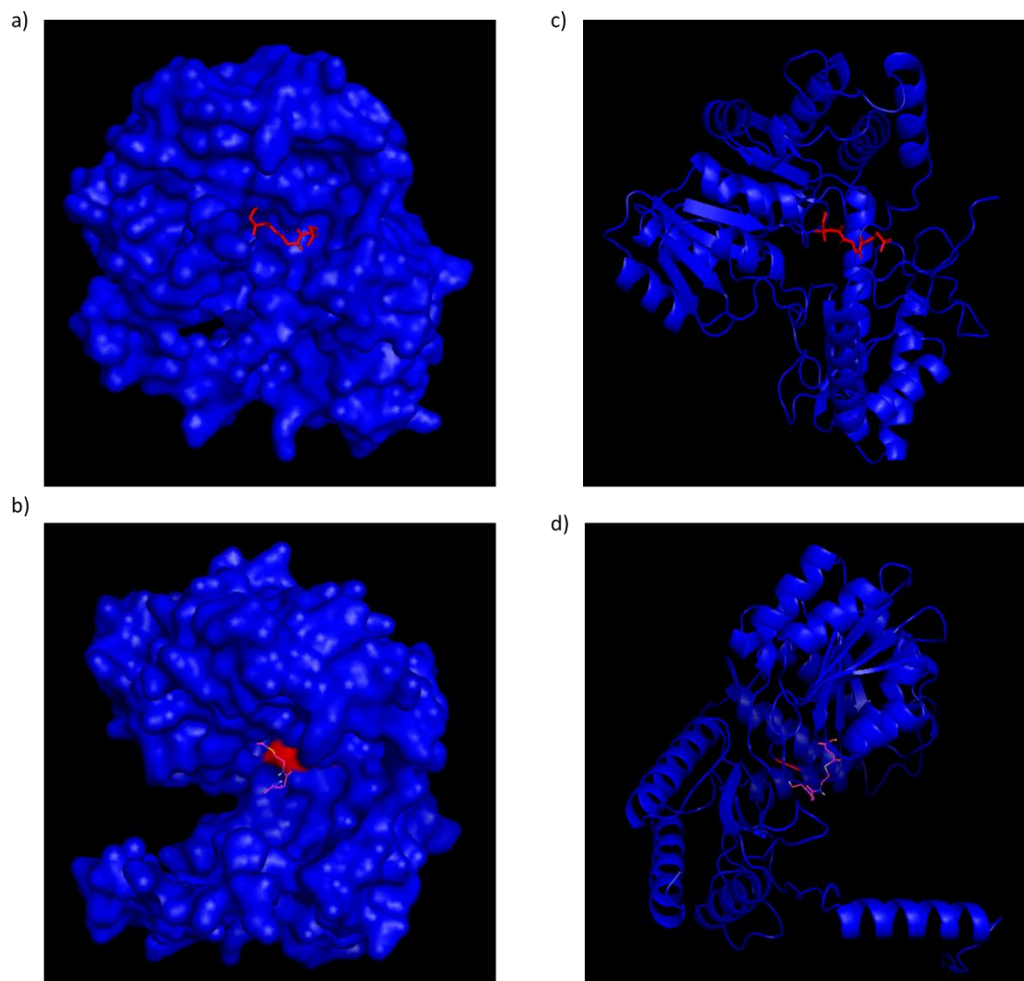


Figura 5.10: Imagen del modelado de la proteína TcpHem1 con el sustrato (a y c) Acetil-CoA y (b y d) Succinil-CoA. El sitio donde se encuentran los aminoácidos principales del dominio aminotransferasa de clase II aparecen resaltados en rojo. Las visualizaciones se hicieron con el software Pymol. Ay B son representaciones de superficie, mientras que C y D son representaciones de la estructura secundaria.

5.2 Detección y cuantificación de ALA intra y extracelular

Empleando epimastigotes de *T.cruzi*, Lombardo *et al.* (2003) detectaron y cuantificaron ALA, tanto dentro del parásito como en el medio de cultivo. En base a estos resultados, se postuló la síntesis de ALA, a pesar de no poder ser posteriormente metabolizado a porfirinas. Años después, algunos trabajos cuestionaron la validez de estos resultados alegando que, aquella molécula que se detectaba como ALA, podría ser una contaminación proveniente del suero que se utiliza habitualmente para

suplementar el medio de cultivo (Kořený *et al.*, 2010), sin considerar que, en el caso del trabajo que se estaba cuestionando, el medio de cultivo utilizado no contenía suero y se habían realizado todos los controles correspondientes para asegurar la veracidad de los resultados.

Habiendo surgido del análisis bioinformático que la proteína TcpHem1 podría codificar para una enzima con actividad de ALA-S o AA-S, resultó conveniente corroborar si los niveles reportados de ALA eran sólo ALA y/o AA. Cabe aclarar que, en el método de cuantificación de ALA empleado, la AA interfiere. Ambos compuestos son capaces de condensarse con acetilacetona formando pirroles con una posición alfa libre, que reaccionan luego con el reactivo de Ehrlich (Figura 5.11). Teniendo en cuenta la posibilidad de separar ambos pirroles, empleando la extracción con éter etílico o el pasaje por un intercambiador iónico (Dowex 1x8), comenzamos ensayando la eficiencia de ambos métodos en la separación y cuantificación del ALA, para luego emplearlos en la detección de ALA en el parásito.

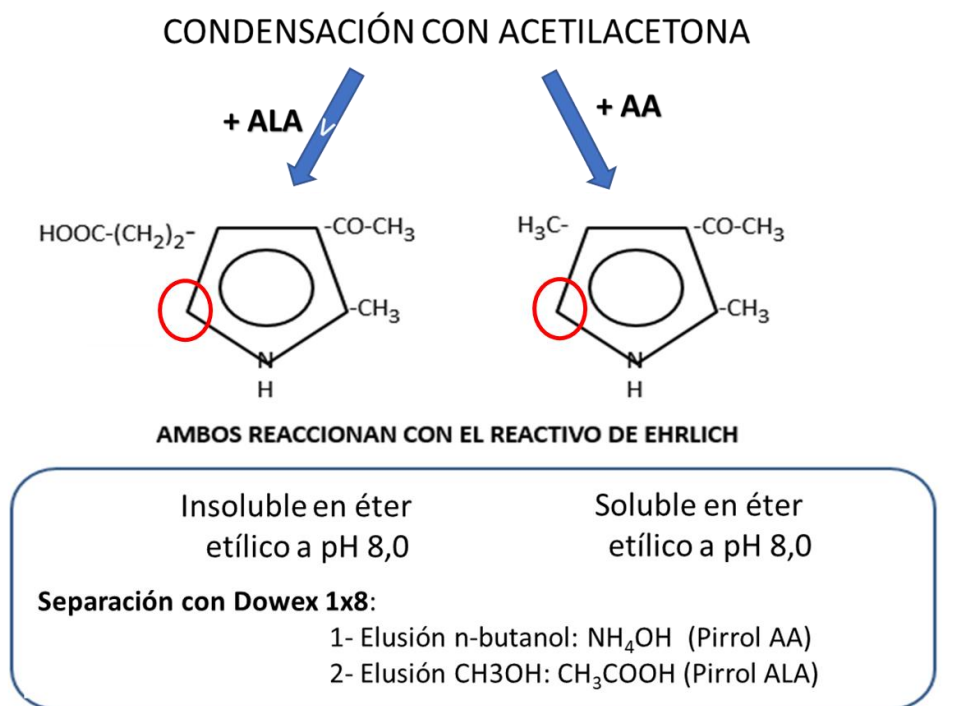


Figura 5.11: Separación de los pirroles provenientes de la condensación de ALA y AA con acetilacetona. En rojo se señala la posición alfa libre capaz de reaccionar con el reactivo de Ehrlich.

Concentraciones variables de ALA (12,50 - 50,00 nmoles/ml) fueron condensadas con acetilacetona para obtener el pirrol correspondiente. La Figura 5.12 muestra la recuperación obtenida luego de extraer con éter etílico y llevar a cabo la reacción colorimétrica con el reactivo de Ehrlich. Para concentraciones entre 12,50 y 37,50 nmoles/ml, la recuperación del ALA luego de la extracción fue del 100%, mientras que una disminución del 20 % se hizo evidente a una concentración de 50,00 nmoles de ALA/ml. Esta disminución puede atribuirse a pérdidas durante la extracción y a la separación de pequeñas cantidades de aminoacetona, que, como impurezas, aporta el ALA comercial. Dicha contribución es despreciable a concentraciones de ALA entre 12,50 nmoles/ml y 37,50 nmoles/ml.

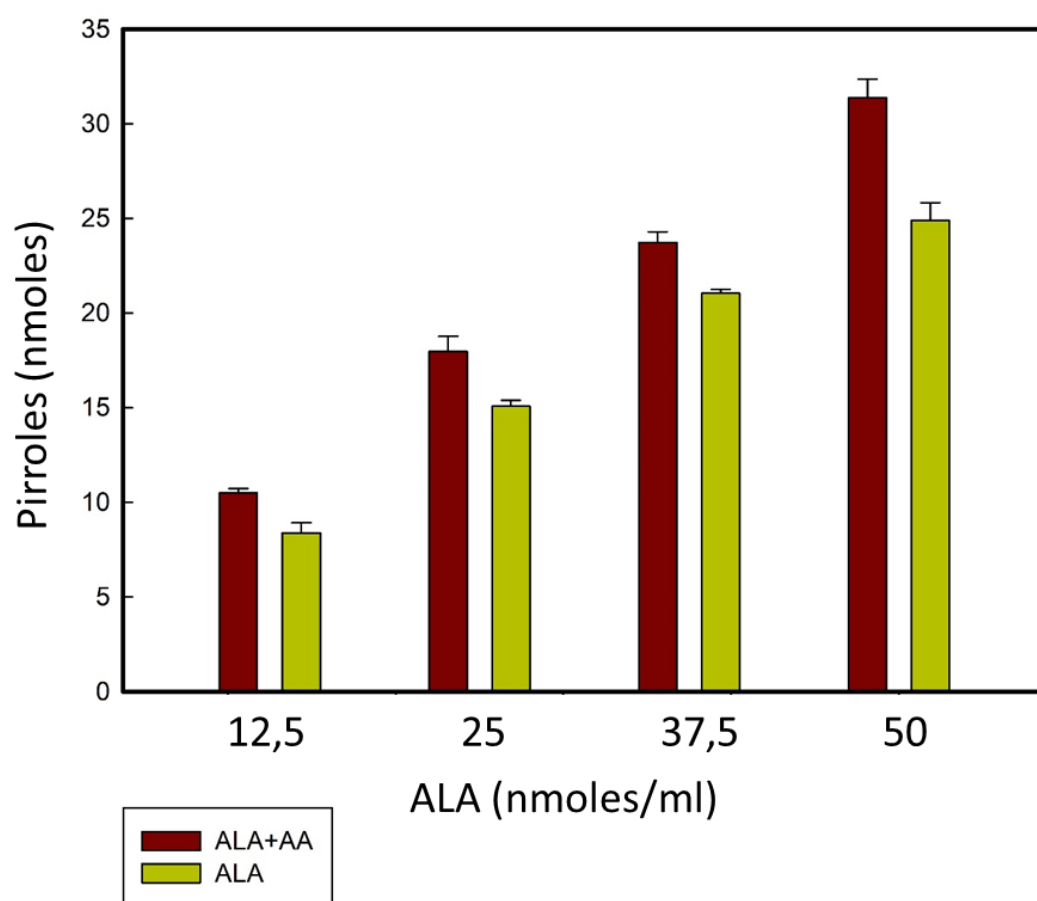


Figura 5.12: Efecto de la extracción con éter etílico sobre la cuantificación del ALA. Distintas concentraciones de ALA(12,5; 25; 37,5 y 50 nmoles/ml) fueron condensadas con acetilacetona y los pirroles obtenidos cuantificándose con el reactivo de Ehrlich (A553 nm) antes y después de la extracción con éter etílico.

Cuando los pirroles, obtenidos con concentraciones de ALA comprendidas entre 25,00 - 50,00 nmoles/ml, son retenidos por una columna de resina Dowex 1X-8 y posteriormente eluidos, primero con n-butanol:NH₄OH y luego con metanol:ácido acético, el porcentaje de recuperación de ALA osciló entre el 80 - 85 % y se hizo evidente en todo el rango de concentraciones la presencia de aminoacetona en el estándar de ALA. Esta última técnica resultó más eficiente que la extracción con éter para separar y cuantificar ALA y AA (Figura 5.13).

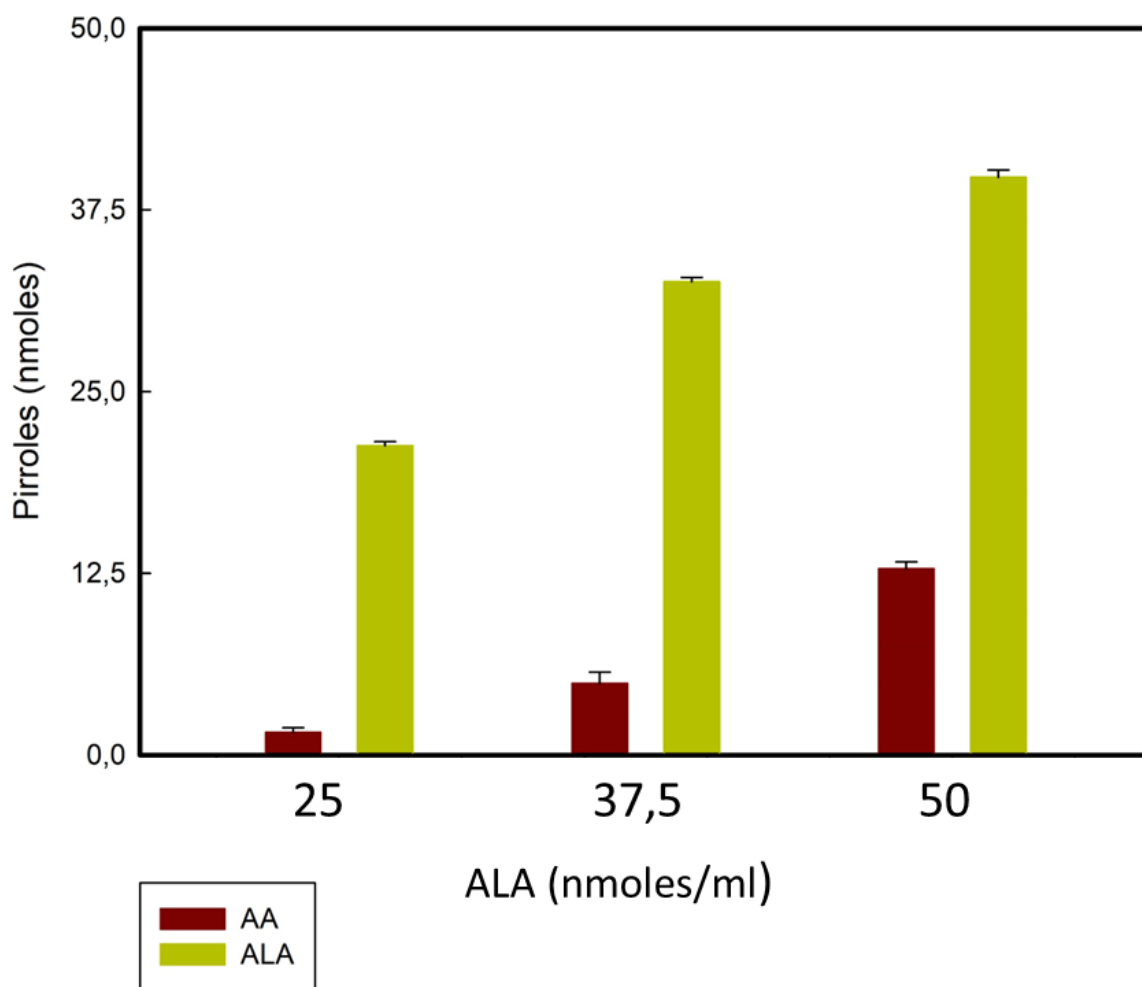


Figura 5.13: Cuantificación del ALA luego de ser retenido y posteriormente eluido de una columna de Dowex 1x8. Se ensayaron concentraciones de ALA de 25; 37,5 y 50 nmoles. Luego de condensar con acetilacetona, los pirroles son retenidos por la resina y posteriormente eluidos con n-butanol:NH₄OH y metanol:ácido acético.

Cabe mencionar que el ALA también puede ser cuantificado por HPLC previa derivatización a un compuesto fluorescente (Figura 5.14), que se obtiene por calentamiento con acetilacetona y formaldehdo a 100°C durante 10 minutos. Por ser más sensible que el colorimétrico, este método fue

utilizado con éxito para la detección de ALA en el plasma y la orina de 418 trabajadores contaminados con plomo (Oishi *et al.*, 1996). En un principio, con un mecanismo de reacción equivocado, Okayama *et al.* (1990) reportaron que la aminoacetona no era capaz de formar el derivado, por ende, no interfería en esta metodología. En vista del mecanismo de la Figura 5.17 que es el correcto, tanto el ALA como la aminoacetona generan derivados fluorescentes, que en las condiciones de la corrida por HPLC no se logran separar. Por tal razón no usamos esta metodología para separar y cuantificar el ALA en el parásito.

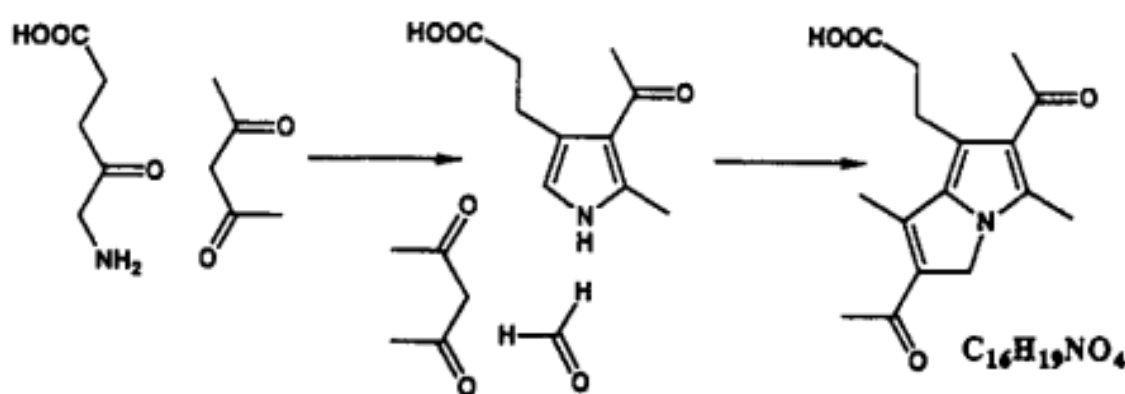


Figura 5.14: Formación del derivado fluorescente del ALA, obtenido al hacerlo reaccionar con acetilacetona y formaldehído.

5.2.3 Cuantificación de ALA en el medio intra y extracelular del parásito

A partir de un cultivo de epimastigotes de *T.cruzi* con 5 días de crecimiento, utilizamos el método de extracción con éter y de pasaje por una columna Dowex 1x8 para separar y cuantificar ALA y AA. Las determinaciones se llevaron a cabo tanto en el medio de cultivo como en un extracto libre de células proveniente del parásito. La tabla 5.1 muestra los resultados obtenidos, los cuales fueron similares independientemente de la metodología empleada. Los resultados estarían mostrando para ALA y AA, que su principal destino es ser expulsados al medio, debido a que lo que permanece en el interior del parásito no llega a ser un 1% del total sintetizado. La expulsión podría deberse a su toxicidad dentro de la célula, debido a que no son posteriormente metabolizados dentro del parásito. Si consideramos el total sintetizado de ALA y AA y la formación muy similar de cada uno de ellos

(45,52% de ALA y 54,48 de AA) y atribuimos su síntesis a la misma enzima, podríamos inferir una actividad similar para la reacción con acetil-CoA o succinil-CoA como sustratos. Estos resultados avalarían la predicción bioinformática descripta arriba.

Tabla 5.1: Contenido de ALA y AA en un cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Fuente	ALA		Aminoacetona	
	nmoles	%	nmoles	%
Intracelular	$1,14 \pm 0,15$	$0,22 \pm 0,01$	$4,14 \pm 0,99$	$0,67 \pm 0,02$
Extracelular	$515,02 \pm 0,97$	$99,78 \pm 1,10$	$613,52 \pm 1,11$	$99,33 \pm 1,05$
Total	$516,15 \pm 2,00$	100	$617,66 \pm 2,00$	100

Los valores corresponden al contenido de ALA y AA tanto en el interior del parásito como en el medio de cultivo, provenientes de 35 ml de una suspensión de epimastogotes en fase exponencial tardía. Se observa que la producción de ALA y de AA corresponde al 45,52% y 54,48% respectivamente.

5.2.4 Efecto del hemo sobre el contenido de ALA extracelular

Sabiendo que el hemo regula la síntesis de ALA (Rossetti *et al.*, 2016) evaluamos el efecto de distintas concentraciones de hemina (0, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 mg/l), agregadas al medio de cultivo, sobre la cantidad de ALA excretado al medio.

Tabla 5.2: Efecto de distintas concentraciones de hemina en el medio de cultivo sobre el contenido de ALA extracelular

ALA Extracelular		
Hemina (mg/l)	nmoles/ml de medio	nmoles/mg prot
0	$19,11 \pm 0,10$	$10,07 \pm 0,05$
2,5	$67,63 \pm 2,10$	$7,63 \pm 0,24$
5	$52,67 \pm 0,65$	$5,93 \pm 0,04$
7,5	$46,42 \pm 2,30$	$4,22 \pm 0,87$
10	$35,31 \pm 0,30$	$3,94 \pm 0,02$
15	$21,21 \pm 0,20$	$2,36 \pm 0,01$

La cantidad de ALA se expresa en nmoles/ml de medio y estos valores se normalizan considerando los mg de proteína, proveniente del pellet de parásitos, obtenidos en las distintas condiciones.

Los resultados obtenidos (Tabla 5.2) ponen de manifiesto una disminución en el contenido de ALA a medida que aumenta la concentración de hemina en el medio. Este comportamiento concuerda con el efecto regulatorio que el hemo ejerce sobre la síntesis de ALA catalizada por el ALA-S.

Al realizar un western blot de los extractos proteicos provenientes de los parásitos crecidos en las distintas condiciones de hemina y revelando con un anticuerpo anti-ALA-S (Bortwick *et al.*, 1983; Rohde *et al.*, 1990), observamos la presencia de una banda de aproximadamente 40 KDa, cuya intensidad disminuye al aumentar los niveles de hemina, que podría corresponder a la proteína involucrada en la síntesis de ALA (figura 5.15)

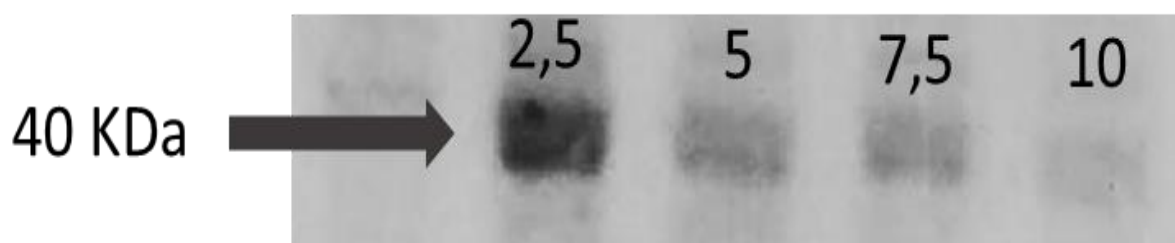


Figura 5.15: Western Blot con anticuerpo anti-ALAS correspondientes a los extractos proteicos provenientes de parásitos crecidos con hemina: 2,5; 5; 7,5 y 10 mg/litro. Se detalla el peso molecular estimado según el marker utilizado. En cada calle se sembró la misma cantidad de proteína.

Al analizar los niveles de expresión del gen TcCLB.511071.140 utilizando la técnica de RT-PCR semicuantitativa y el ARN extraído de los parásitos cultivados en las distintas concentraciones de hemina observamos que, la intensidad de las bandas en el gel de agarosa disminuye notoriamente al aumentar la concentración de hemina. Los resultados se pueden ver en la figura 5.16. Estos resultados concuerdan con lo observado en el Western blot de la figura 5.15

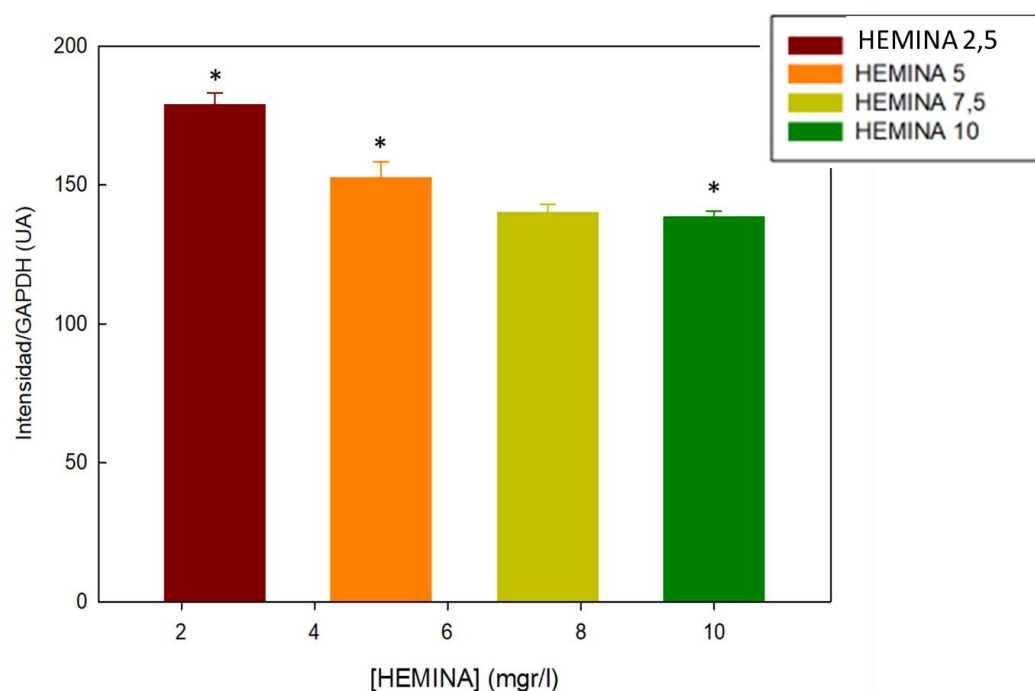


Figura 5.16: Gráfico de la intensidad relativa del gen TcCLB.511071.140 respecto del gen *housekeeping* GAPDH (intensidad/GAPDH) en unidades arbitrarias (UA) vs la concentración de hemina en el medio. Los datos se encuentran normalizados utilizando como housekeeping el gen de la enzima GAPDH. Los resultados son el promedio de tres réplicas independientes. Las intensidades fueron determinadas con el software ImageJ.

5.3 Obtención y caracterización de la proteína recombinante TcpHem1

Con el fin de determinar la identidad de la proteína TcpHem1, que según estudios bioinformáticos podría corresponder a un ALA-S o AA-S, procedimos al clonado de la secuencia genómica que la codifica y a la posterior obtención de la proteína recombinante.

A partir de la secuencia de aminoácidos obtenida de Blastp y UniProt, y utilizando la herramienta tBlastn, obtuvimos la secuencia de nucleótidos más probable (con un porcentaje de identidad del 93,56%) cuyo Gene ID es 3545475 (genomic scaffold: NW_001849528.1). A partir de esta secuencia se diseñaron los primers con los cuales se amplificó por PCR de punto final. La secuencia nucleotídica se encuentra anotada en TriTryps con el código TcCLB.511071.140. El ADN utilizado, extraído de un cultivo de 5 días de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen Tul 2, poseía una relación de absorbancia 260/280 de 2,12 y una concentración de 2,665

µg/µl. El fragmento amplificado por PCR de punto final tuvo una longitud de 1,2 Kpb aproximadamente (figura 5.17), lo cual corresponde al tamaño del producto previsto.

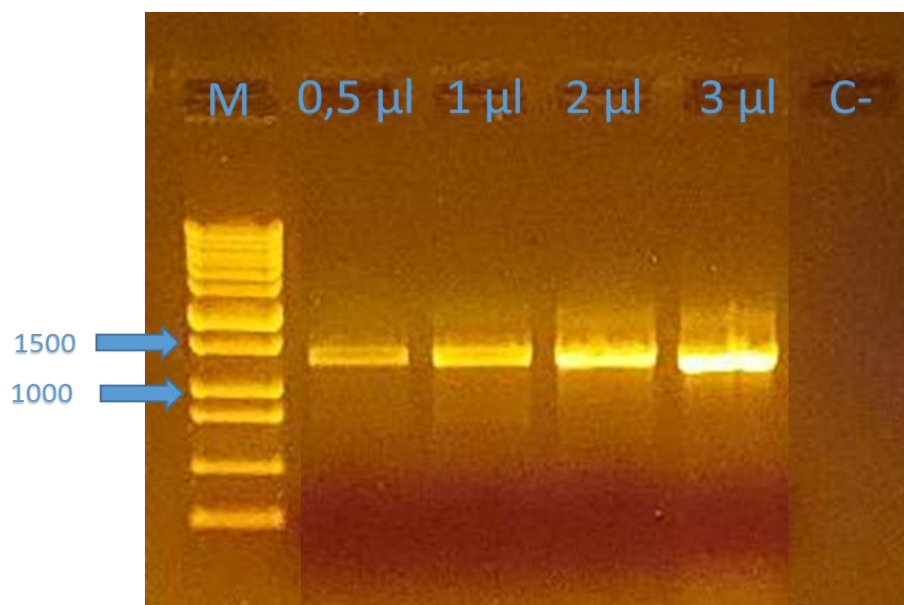


Figura 5.17: Amplificación del gen TcCLB.511071.140 mediante la técnica de PCR de punto final. Las cantidades de 0,5 a 3 µl (50 ng a 300 ng) corresponden a la cantidad de DNA molde utilizado durante la reacción de PCR de punto final, siguiendo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La calle C- corresponde a un control sin ADN.

El fragmento obtenido fue purificado y enviado a secuenciar. La secuencia obtenida se alineó con la reportada utilizando la plataforma Blast, herramienta: “Global Alignment”. El alineamiento mostró que ambas secuencias, la esperada y la obtenida de la secuenciación, coinciden en un 98,9%. Se observa que las zonas donde el apareamiento no es perfecto corresponden a los extremos. Por un lado, estas zonas presentan interferencias debido a la técnica usada para la secuenciación; Por otro lado, los extremos de la secuencia obtenida presentan los sitios de corte para las enzimas BamHI y HindIII, sitios que no están presentes en la secuencia original (Figura 5.18).

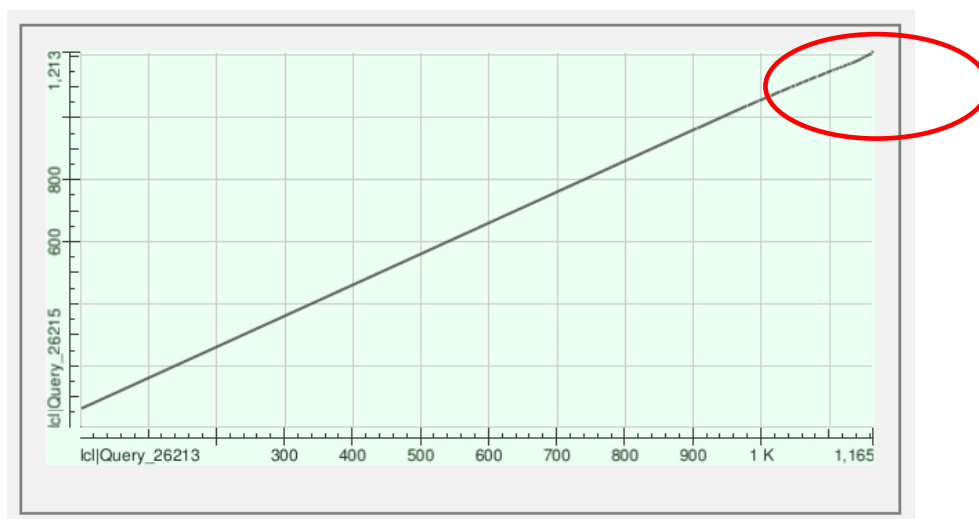


Figura 5.18: Dot plot del alineamiento entre la secuencia obtenida por PCR de punto final y la secuencia que se deseaba amplificar. El círculo rojo marca la zona donde se encuentra la mayor parte de los gaps, los cuales se deben al método de secuenciación. La identidad de ambas es del 98%, lo que nos indica que la secuencia fue amplificada con un grado alto de fidelidad.

Confirmada la secuencia del producto de PCR, el mismo fue insertado en un vector de subclonado (pJET), a partir del cual, se obtuvo nuevamente el fragmento a insertar en el vector de expresión (pET22 b+). El empleo del vector de subclonado aumentó la eficiencia de ligación del fragmento al vector de expresión. Teniendo en cuenta que el vector de expresión utilizado nos permite etiquetar la proteína con una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal, la proteína recombinante fue purificada empleando una columna de Níquel comercial que se eluye con Imidazol. La presencia de la proteína recombinante, a lo largo del esquema de purificación, se determinó por dot blot revelando con un anticuerpo anti-His. Las fracciones provenientes del esquema de purificación fueron:

- Sobrenadante S: Extracto libre de células obtenido por lisis de las bacterias transformadas e inducidas con IPTG.
- Fracción P: Percolado de la columna luego de sembrar el sobrenadante S
- Fracción L1: Lavado de la columna de afinidad con el buffer con el cual esta equilibrada la columna

- Fracciones E1-E6: Corresponden a las distintas alícuotas de la elución con solución de Imidazol.

De la figura 5.19a, que corresponde a la fracción S, podemos concluir que la proteína no se expresa si transformamos con el plásmido vacío, hay un nivel basal de expresión si transformamos con el plásmido recombinante sin inducir, el cual es notoriamente mayor luego de la inducción. La figura 5.19b representa el dot blot obtenido para las fracciones antes mencionadas. La intensidad de la señal en el percolado nos indica saturación de la columna, la señal de las fracciones E1 a E6 ponen de manifiesto si la proteína retenida fue totalmente eluída y cuáles son las fracciones que deben reunirse para obtener una muestra de proteína lo más concentrada posible.

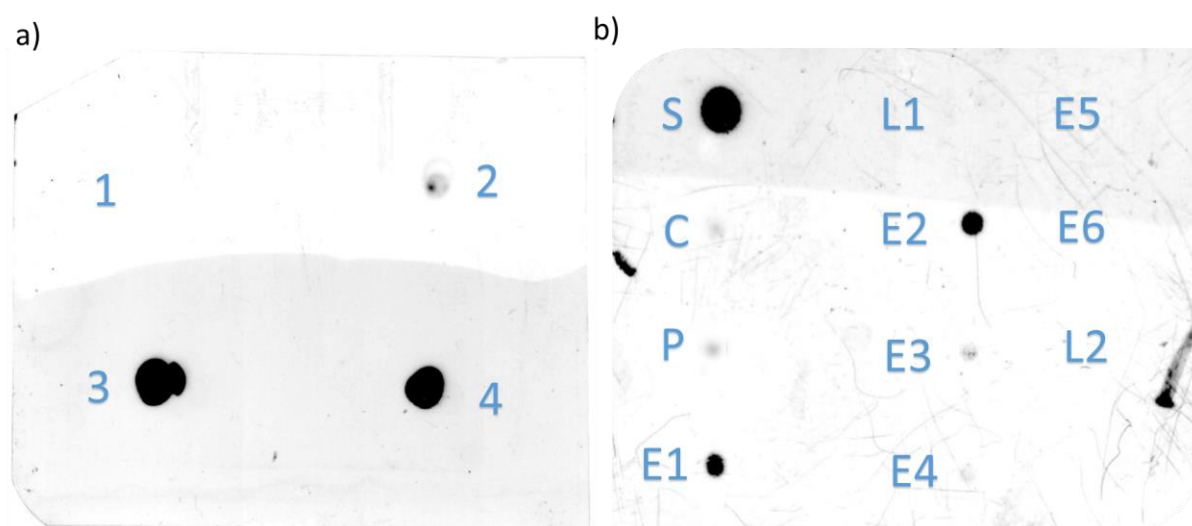


Figura 5.19: Dot blot de las fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína recombinante. a) corresponde a la fracción S proveniente de 1: bacterias transformadas con el plásmido vacío, 2: bacterias transformadas con el plásmido recombinante sin inducir y 3 y 4: con este último inducido. b) corresponde a las fracciones S, P, E1-E6 mencionadas en el texto. L2 corresponde al lavado posterior a E6 y C es un extracto de bacterias transformadas con el plásmido recombinante sin inducir, pero no fueron sembradas en la columna.

Según la tabla 5.3, del total de la proteína presente en 1,5 ml del sobrenadante S, un 41,65% corresponde a la proteína recombinante, el 52,5% no interactúa con la columna y el porcentaje restante es pérdida adjudicada a la metodología.

Tabla 5.3: Nivel de expresión de la proteína recombinante en base al contenido proteico.

Fracciones	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	mg Totales
S	1,5	22,02 ± 0,01	33,14
P	1,5	11,59 ± 0,02	17,39
E1	0,5	2,5 ± 0,04	5
E2	0,5	2,7 ± 0,03	5,4
E3	0,5	0,8 ± 0,01	1,6
E4	0,5	0,9 ± 0,01	1,8

La determinación de proteínas en las distintas fracciones provenientes del esquema de purificación se llevó a cabo por el método de Bradford.

El western blot de la figura 5.20 nos permitió adjudicar a la proteína recombinante un peso molecular de aproximadamente 40 KDa, este dato coincide con las predicciones bioinformáticas antes mencionadas y en la figura 5.15.

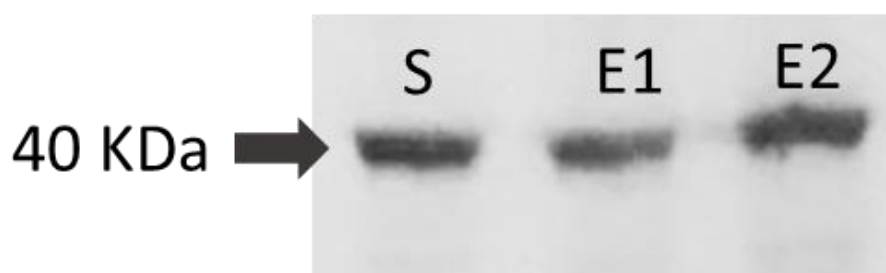


Figura 5.20: Western blot de las fracciones S, E1 y E2 del esquema de purificación. El western blot fue revelado con un anticuerpo primario anti-his y un anticuerpo secundario unido a HRP, siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos.

5.3.1 Actividad de ALA-S y AA-S en la proteína recombinante TcpHem1

Comenzamos la caracterización de la proteína recombinante evaluando su capacidad de catalizar la síntesis de ALA a partir de succinil CoA y de AA a partir de acetil CoA.

Utilizando como sustrato glicina 100 mM y succinil CoA 1mM, la proteína fue capaz de sintetizar $24,35 \pm 1,4$ nmoles ALA/30 min x μg de proteína. Tanto la glicina como la succinil CoA estarían en concentraciones saturantes, ya que al incrementarlas no se observaron modificaciones significativas de la velocidad de la reacción.

Empleando como sustrato glicina 100 mM y acetil CoA 0,4 mM, detectamos la formación de $31,67 \pm 1,23$ nmoles de AA/30 min x μg de proteína. En este caso, dada la estabilidad del acetil CoA pudimos evaluar el efecto de distintas concentraciones de acetil CoA de $1,25 \times 10^{-2}$ mM hasta 0,4 mM sobre la actividad de la enzima (Figura 5.21)

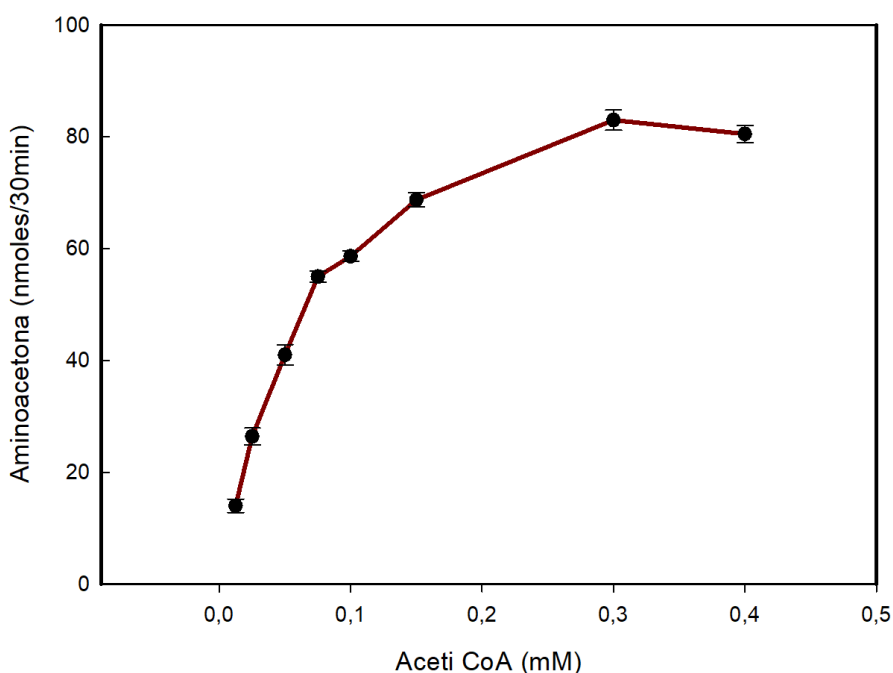


Figura 5.21: Efecto de distintas concentraciones de acetil CoA sobre la actividad de AA-S. Se midió actividad de la manera descrita en Materiales y Métodos empleando la proteína recombinante (3 microgramos), glicina a una concentración constante (100 mM) y distintas concentraciones de acetil CoA.

Los resultados nos permiten adjudicarle a la enzima un comportamiento Michaeliano y a partir del gráfico de inversas calculamos los parámetros cinéticos K_m y V_m (Figura 5.22)

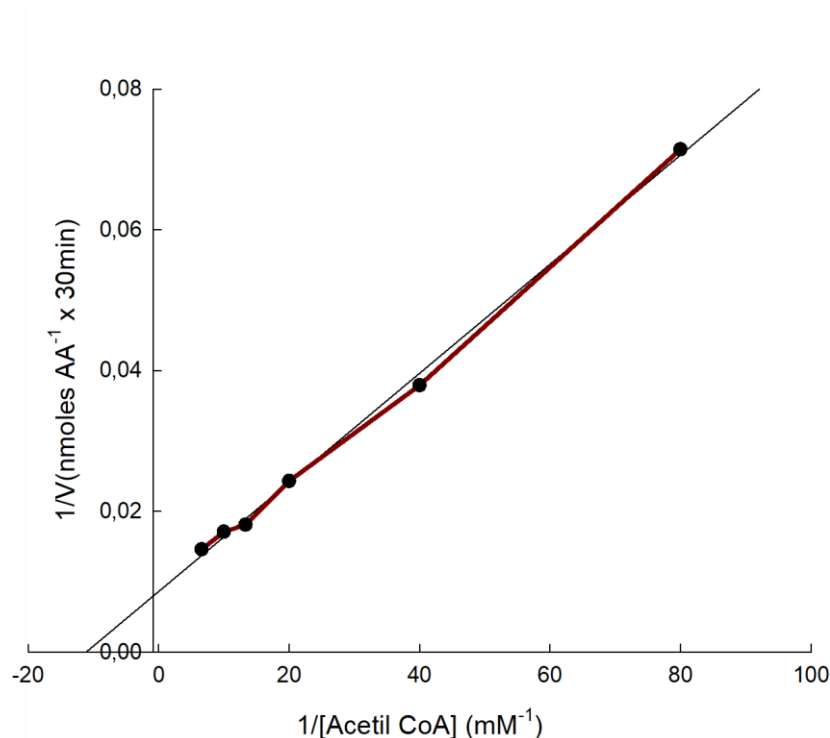


Figura 5.22: Gráfico de inversas para el acetil CoA como sustrato variable y la glicina como sustrato fijo. En esta regráfica se representan los valores de la figura anterior.

Obtuvimos para la enzima un valor de K_m de $0,090 \pm 0,003\ mM$ y una V_m de $116,18 \pm 1,4$ nmoles/30 minutos que, considerando la cantidad de proteína utilizada, corresponden a $38,73$ nmoles/30 minutos.microgramo de proteína. Un tratamiento análogo para el ALA-S no fue posible realizar debido a la inestabilidad de la succinil CoA.

En base a estos resultados, decidimos realizar ensayos de competencia para determinar la especificidad de la enzima por los sustratos. Utilizando una concentración fija de glicina $100\ mM$ se midió: actividad de AA-S en ausencia de succinil CoA y actividad de AA-S y ALA-S en presencia de una concentración de succinil CoA constante y acetil CoA variable. La concentración de succinil CoA fue la adecuada para asegurar la saturación del ALA-S. Las determinaciones de actividad se realizaron tal como se describen en materiales y métodos. En la figura 5.23 observamos cuales son los posibles resultados para este ensayo

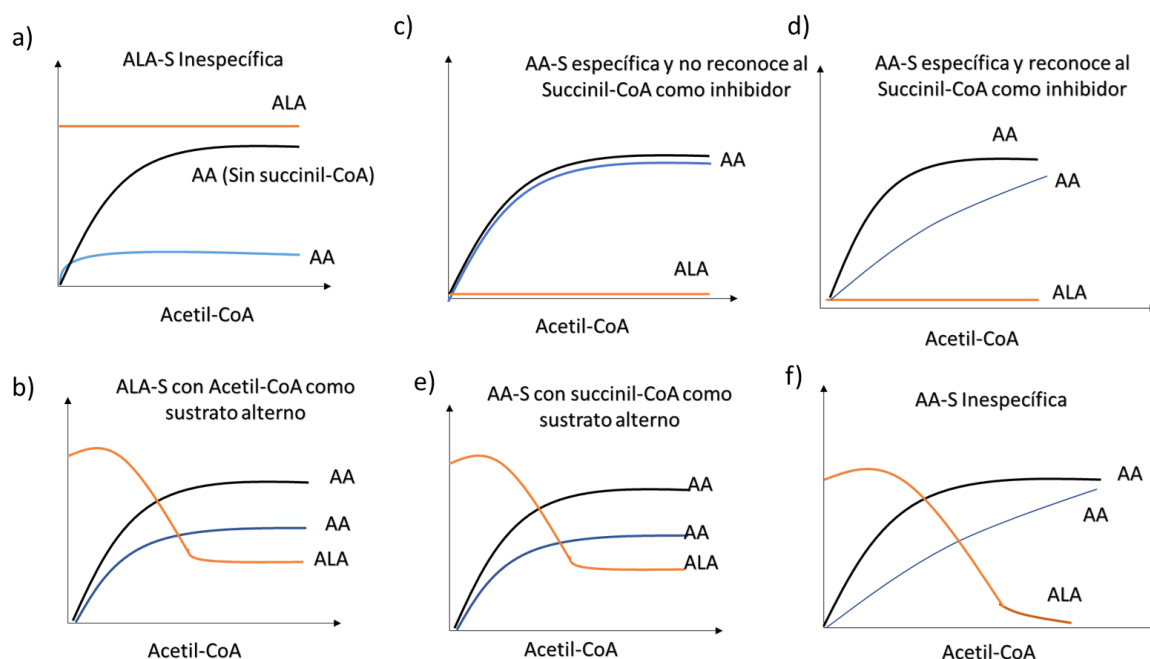


Figura 5.23: Posibles resultados del ensayo de competencia. la curva negra de producción de AA, en todos los casos, corresponde a la producción de AA en ausencia de succinil-CoA y sería una repetición de los resultados obtenidos en la figura 5.21, pero de forma esquemática. Las curvas restantes (celeste y naranja) representan los posibles resultados obtenidos si en el sistema agregamos una concentración saturante de succinil-CoA.

Si suponemos que la proteína TcpHem1 es una enzima tipo ALA-S, no sería específica para succinil-CoA ya que es capaz de formar AA a partir de acetil-CoA (figura 5.21). Este último comportamiento invalida también la posibilidad de que para un ALA-S específico el acetil CoA pudiese actuar como inhibidor. Si fuese un ALA-S inespecífica es decir, que es capaz de tomar succinil-CoA como sustrato principal y acetil-CoA con menor eficiencia (figura 5.23a), entonces a concentración saturante de succinil-CoA la producción de ALA será máxima y constante aunque la concentración de acetil-CoA aumente hasta la saturación. La cantidad de AA sería despreciable. Por otro lado, si la enzima ALA-S pudiera aceptar tanto acetil-CoA y succinil-CoA como sustratos (figura 5.23b), veríamos que al aumentar la concentración de acetil-CoA, en presencia de succinil-CoA saturante la producción de ALA decae mientras la concentración de AA aumenta, alcanzando nuevas

velocidades máximas menores a las obtenidas en presencia sólo de succinil-CoA ó acetil-CoA respectivamente.

Si suponemos que la enzima TcpHem1 es una enzima del tipo AA-S podemos considerar 4 posibilidades: en el caso de que sea una enzima AA-S específica que además no reconoce al succinil-CoA como inhibidor (figura 5.23c), vemos que en presencia de ambos sustratos, no habrá producción de ALA y la formación AA no se ve afectada por la presencia de succinil-CoA. Si ahora consideramos la posibilidad de que la AA-S reconozca al succinil-CoA como inhibidor (figura 5.23d), veremos que tampoco hay producción de ALA y la formación de AA se verá disminuida hasta que las concentraciones de acetil-CoA sea saturante y alcance la velocidad máxima. Otra posibilidad es que la AA-S sea capaz de reconocer al succinil-CoA como sustrato alternativo (figura 5.23e), en ese caso, obtenemos una gráfica similar a si consideramos que la enzima TcpHem1 sea un ALA-S cuyo sustrato alternativo es el acetil-CoA (figura 5.23b). Finalmente, podríamos considerar que la AA-S sea inespecífica (figura 5.23f), en ese caso, vemos que la producción de ALA comienza siendo máxima, pero decae hasta valores indetectables cuando la concentración de acetil-CoA se vuelve saturante. En este caso la formación de AA se ve disminuída por la presencia de succinil- CoA, pero a altas concentraciones de acetil-CoA alcanzaría la velocidad máxima. En conclusión, la figura 5.23 estaría indicando como a partir del ensayo de competencia podríamos inferir la posible identidad de la proteína TcpHem1. En la figura 5.24 se muestran los resultados experimentales obtenidos al llevar a cabo el ensayo de competencia.

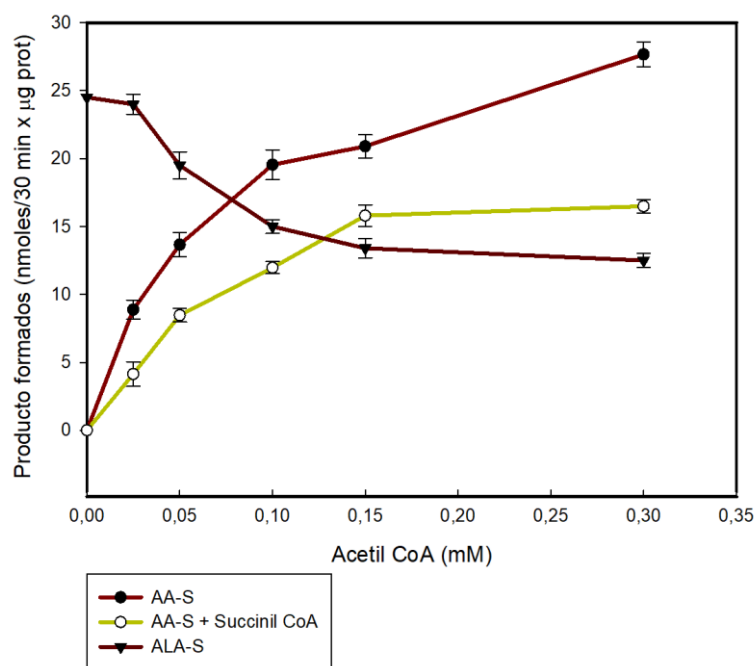


Figura 5.24: Competencia entre el acetil CoA y succinil CoA como sustrato. Empleando 3 microgramos de la proteína recombinante TcpHem1 y una concentración de glicina 100 mM se midió actividad de AA-S en ausencia y presencia de succinil CoA (1 mM) y actividad de ALA-S en presencia de succinil CoA 1 mM y acetil CoA variable.

A partir de este gráfico podemos concluir que la proteína TcpHem1 se comportaría como una enzima ALA-S cuyo sustrato alternativo es el acetil-CoA o una enzima AA-S que tiene como sustrato alternativo al succinil-CoA. Considerando los estudios bioinformáticos de alineamiento estructural y secuencial, concluimos que, la proteína en estudio podría corresponder a una enzima tipo AA-S que tiene al succinil-CoA como sustrato alternativo.

5.4 Conclusiones parciales del Capítulo 5

A partir de los datos presentados podemos concluir que el parásito produce ALA, el cual es exportado fuera de la célula en aproximadamente un 98%. La producción y detección del ALA pudo ser separada de la detección y cuantificación de otro compuesto químicamente similar, la aminoacetona (AA). Este compuesto, es producido por una enzima de la misma familia de las ALA-S, la AA-S. Cuando realizamos la búsqueda bioinformática con el fin de hallar una secuencia con capacidad de codificar un ALA-S y, por lo tanto, explicar la presencia de ALA en el medio de cultivo del parásito, encontramos una única secuencia proteica candidata, la cual, se encuentra anotada como

una AA-S putativa. Este resultado nos llevó a analizar la secuencia, a la que llamamos TcpHem1 e investigar si tenía alguna relación con la producción de ALA. Los estudios de alineamiento, tanto de secuencia como estructurales, con secuencias ampliamente estudiadas de ALA y AA-S de distintas especies, nos agrupaban de forma categórica las ALA-S alejadas de las AA-S y la secuencia de la proteína TcpHem1 se relaciona más con estas últimas que con las ALA-S. Por otro lado, sabiendo que el ALA-S es regulada a distintos niveles por hemo, observamos que, al aumentar los niveles de hemina en el medio de cultivo disminuyen los niveles de ALA extracelular, la expresión del gen candidato a codificar la enzima TcpHem1 y los niveles de expresión de una proteína cuyo peso molecular coincide con el peso molecular de la proteína en estudio. Los estudios de *docking* molecular mostraron que sería posible que esta proteína pudiera tomar con afinidad similar los sustratos acetil-CoA y succinil-CoA. Tal como se ha explicado hasta este momento y como se representan en la figura 5.17, las enzimas tipo ALA-S pueden tomar cualquiera de los dos sustratos antes mencionados, sin embargo, las enzimas tipo AA-S solo pueden utilizar acetil-CoA. Estos resultados del *docking*, sumado a la teoría de que la enzima ALA-S podría haber surgido de una enzima tipo AA-S nos llevó a clonarla y sobreexpresarla para evaluar su capacidad de sintetizar ALA y/o AA. Los resultados mostraron que la proteína era capaz de catalizar la formación de ALA y de AA empleando como sustratos succinil CoA y acetil CoA respectivamente. De los ensayos de competencia pudimos observar que ambas actividades, la de ALA-S y la de AA-S, coexisten, ya que concentraciones saturantes de succinil-CoA no anulan la actividad de AA-S y viceversa, concentraciones saturantes de acetil CoA no anulan la formación de ALA. El estudio de competencia concuerda con lo predicho en el *docking* molecular.

Capítulo 6

Efecto tripanocida de la Vitamina C y de la Porphirina sintética A4

	Páginas
Vitamina C	
6.1 Ensayos <i>in vitro</i>	102
6.2 Ensayos <i>in vivo</i>	107
Porfirina A4	
6.3 Ensayos <i>in vitro</i>	110
6.4 Conclusiones parciales del capítulo 6	116

A continuación, presentaremos los resultados relacionados con el uso de vitamina C y de la Porphirina A4 como posibles agentes anti- *T. cruzi*. El efecto citotóxico de la vitamina C (debido a su acción prooxidante) generaría un daño oxidativo dentro de la célula, que si el parásito no puede contrarrestar produciría su muerte. Por otro lado, teniendo en cuenta la avidez que el parásito tiene por las porfirinas, y el efecto citotóxico de su acumulación, el estudio de moléculas estructuralmente análogas, como la porfirina sintética que llamamos A4, podría ser un camino hacia la mejora en la eficacia del tratamiento contra la Enfermedad de Chagas.

Vitamina C

6.1 Ensayos *in vitro*

6.1.1 Evaluación de la actividad anti-*T. cruzi* de la Vitamina C

La actividad anti-*T. cruzi* de la vitamina C (Vit C) se evaluó *in vitro* sobre los tres estadios del parásito, siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos. En todos los casos el Bnz fue utilizado como droga de referencia. En la Figura 6.1 se representan las curvas a partir de las cuales se obtuvieron los valores de IC₅₀ que se muestran en la Tabla 6.1.

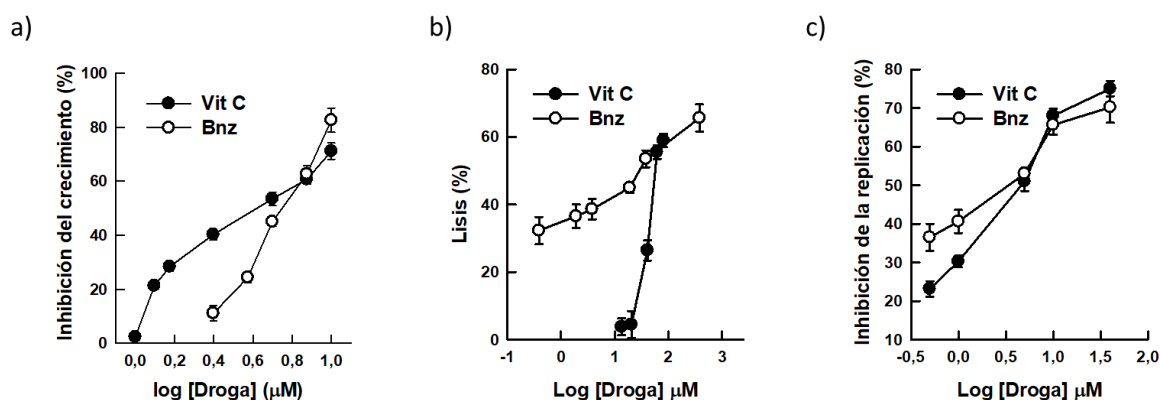


Figura 6.1: Efecto de distintas concentraciones de Vit C y Bnz sobre los tres estadios de *T. cruzi*. En todos los casos, los parásitos fueron tratados con distintas concentraciones de vitamina C y Bnz como droga de referencia. a) Los epimastigotes fueron cultivados durante 5 días a 28°C. b) Los tripomastigotes presentes en sangre de ratón infectado fueron tratados durante 24 h a 4°C. c) Los amastigotes presentes en un cultivo de macrófagos infectado con tripomastigotes transgénicos fueron tratados durante 7 días a 37°C

En el caso de los epimastigotes se pudo observar que para concentraciones menores a 5 μM la Vit C fue más efectiva que el Bnz, a concentraciones más altas los efectos se igualan, arrojando valores de IC₅₀ similares. Para tripomastigotes, el Bnz mostró un IC₅₀ significativamente menor al de la Vit C, mientras que en amastigotes ambas drogas resultaron igualmente efectivas. En la misma tabla se observan los índices de selectividad (IS), que surgen de haber calculado, para la vitamina C y el Bnz, su citotoxicidad en células Vero (Figura 6.2).

Tabla 6.1. Efecto de la Vit C sobre los tres estadios de *T. cruzi*.

Droga	Epimastigote		Tripomastigote		Amastigote		CC ₅₀ (μM)
	IC ₅₀ (μM)	IS	IC ₅₀ (μM)	IS	IC ₅₀ (μM)	IS	
Vit C	3,65 ± 0,45	>684,93	50,60 ± 2,50	>49,40	4,65 ± 0,38	>573,63	> 5000
Bnz	5,86 ± 0,93	14,12	30,26 ± 2,85	2,74	4,10 ± 0,55	20,10	90,9 ± 2,50

Los valores de IC₅₀ fueron calculados a partir de los gráficos de la figura 6.1. Mientras que la CC₅₀ para ambas drogas surge de los datos de la figura 6.2

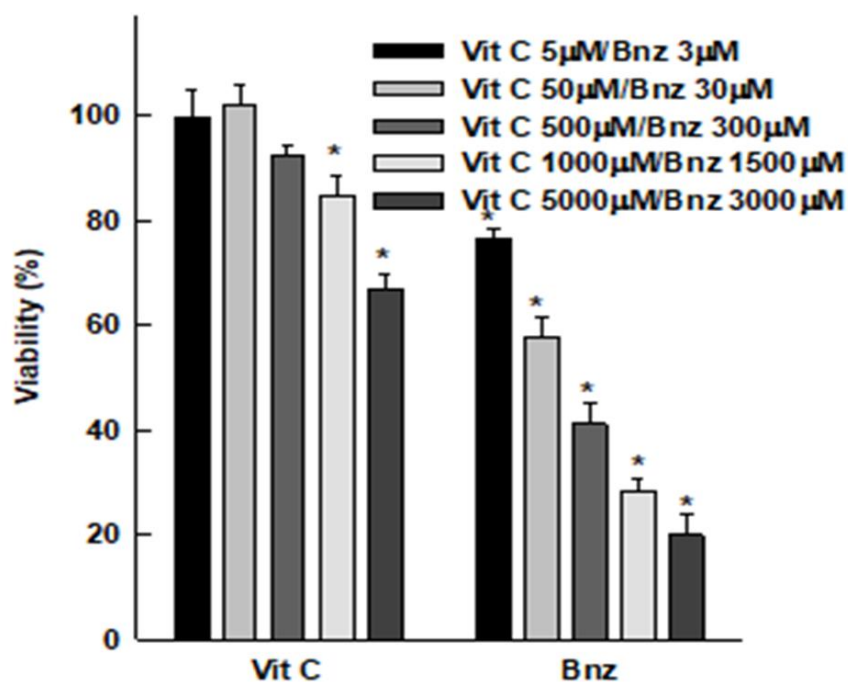


Figura 6.2: Citotoxicidad de la Vit C y el Bnz sobre células de mamífero. La citotoxicidad fue ensayada sobre un cultivo de células Vero mantenido a 37°C durante 48 h. La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo con MTT.

La Vit C no causa ningún efecto citotóxico a concentraciones de hasta 2500 μM. Sin embargo, concentraciones más altas (5000 μM) demostraron ejercer un efecto citotóxico del 35%. Para el Bnz se obtuvo una CC₅₀ = 90,9 ± 2,50 mientras que el de la Vit C fue mayor de 5000. Los altos valores de IS

obtenidos para la Vit C, muy superiores a los correspondientes al Bnz, hacen a la droga un candidato promisorio para ser evaluada *In vivo*.

Con el fin de realizar una evaluación *in vivo*, se evaluó el efecto del agregado de Vit C sobre la actividad tripanocida que el Bnz ejerce sobre el estadio tripomastigote y sobre la citotoxicidad del Bnz sobre células Vero (Tabla 6.2)

Tabla 6.2: Efecto de la Vit C sobre a) actividad tripanocida sobre tripomastigotes y b) citotoxicidad del Bnz sobre células Vero

a)		b)	
Compuestos	Lisis (%)	Vit C (μ M)	Viabilidad (%)
Control	0	0	48,95 \pm 1,05
Bnz	41,40 \pm 3,80	5	78,00 \pm 3,50
Vit C1	3,77 \pm 1,10	50	80,43 \pm 2,00
Vit C1 + Bnz	35,85 \pm 1,50	500	79,71 \pm 4,10
Vit C2	26,42 \pm 3,50	5000	20,46 \pm 1,05
Vit C2 + Bnz	40,40 \pm 2,00		
Vit C3	58,94 \pm 3,50		
Vit C3 + Bnz	36,96 \pm 4,20		

a) Las concentraciones ensayadas fueron: Bnz: 33.3 μ M; Vit C1: 13.6 μ M; Vit C2 : 40.9 μ M and Vit C3 : 81.8 μ M. b) La concentración de Bnz ensayada fue 100 μ M

Según los resultados de la tabla 6.2a, el efecto tripanocida que ambas drogas manifiestan cuando se encuentran por separado no resulta aditivo al ser administradas conjuntamente. Los porcentajes de lisis observados en las distintas combinaciones no resultan significativamente diferentes al obtenido con Bnz solo. Por otro lado, en células de mamíferos, entre 5 y 500 μ M la Vit C disminuye un 30% la citotoxicidad ejercida por el Bnz a una concentración 100 μ M (tabla 6.2b). Dicha disminución es independiente de la concentración de Vitamina C utilizada. A concentración 5000 μ M la citotoxicidad alcanza valores del 80% debido a que se manifiesta el efecto citotóxico de ambas drogas.

En base a los resultados de la tabla 6.2b, calculamos nuevamente la CC_{50} del Bnz en presencia de distintas concentraciones de Vit C (Tabla 6.3)

Tabla 6.3: Variación de la concentración citotóxica de Bnz en presencia de Vit C

Vit C (μ M)	$CC_{50}(\mu$ M)
0	$92,73 \pm 4,15$
5	$1043,66 \pm 8,35$
50	$4037,75 \pm 7,28$
500	$1527,57 \pm 5,25$
5000	$42,42 \pm 4,75$

El ensayo de citotoxicidad se evaluó de la manera habitual descripta en Materiales y Métodos

Como podemos observar, la CC_{50} del Bnz aumenta significativamente entre 5 y 500 μ M de Vit C, pero a concentraciones de 5000 μ M, su disminución del mas del 50% respecto del 0 de Vit.C nos estaría indicando que ambas drogas potencian sus efectos tóxicos.

6.1.3 Evaluación del estado redox del parásito en presencia de Vit C + Bnz

Se sabe del efecto dual antioxidante/prooxidante de la Vit C (Du *et al.*, 2012; Mastrangelo *et al.*, 2017; Deubzer *et al.*, 2010; Cieslak & Cullen, 2015). De esta misma manera, esta reportado que el Bnz y /o sus metabolitos son capaces de formar aductos con los tioles libres, dejando a la célula vulnerable a los efectos del stress oxidativo (Trochine *et al.*, 2014). En base a lo expuesto, decidimos evaluar *in vitro*, sobre epimastigotes, el efecto a lo largo del tiempo (2, 5, 8 y 10 hs), de distintas concentraciones de Vit C (5, 15 y 30 μ M) en presencia y ausencia de Bnz (15 μ M), sobre el estado redox del parásito. Los parámetros utilizados para evaluar dichos cambios fueron el nivel de grupos

SH- libres por reacción con DTNB (Figura 6.3) y el estado oxidativo intracelular empleando la sonda H_2DCFDA .

En la figura 6.3a se puede observar una disminución significativa, independiente de la concentración de Vitamina C, en el contenido de tioles (~ 50%) entre 2 hs y 5 hs después del tratamiento solo con Vit C. Desde las 5 hs hasta las 8 hs, el contenido de tioles aumentó de manera dependiente de la concentración de Vit C, alcanzando valores máximos de 191% y 133% (valores que estaban por encima del control), para 30 μM y 15 μM de Vit C, respectivamente.

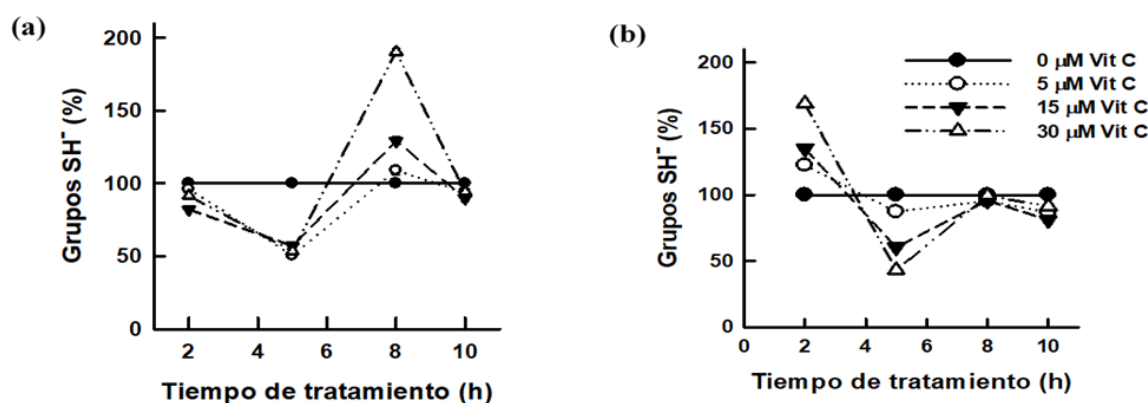


Figura 6.3 Efecto de la Vit C y el Bnz sobre el contenido de tioles. Los epimastigotes fueron tratados con Vit C, en ausencia (a) o en presencia (b) de una concentración fija de Bnz (15 μM)

Después de alcanzar este valor máximo, la concentración de grupos SH disminuyó para volver a valores de control después de 10 h del tratamiento. Este comportamiento se modifica cuando, a las diferentes concentraciones de Vit C, se le agregó una concentración fija de Bnz (15 μM) (Figura. 6.3b). A las 2 horas de tratamiento se observó un aumento en el contenido de tioles proporcional al incremento de los valores de concentración de Vit C. A las 5 hs, se observaron valores mínimos en el contenido de tioles de 40, 60 y 85% correspondiente a 30, 15 y 5 μM de Vit C, respectivamente. El nivel de tioles volvió a los valores iniciales después de 8 h postratamiento y casi no se observaron variaciones entre las 8hs y las 10hs. Es de destacar que el contenido de tioles en los controles (correspondientes a diferentes tiempos) observado en presencia de Bnz es de 3 a 5 veces menor que los medidos en su ausencia, los cuales fueron, en todos los puntos de tiempo, de ~153,52 nmol/mg de

proteína. Este comportamiento pone de manifiesto la interacción Bnz y/o sus metabolitos con los grupos tioles.

Respecto del estado redox intracelular, evaluado por citometría de flujo con la sonda H₂DCFDA, las relaciones Gmt/Gmc (Indicador del estado redox de los parásitos tratados respecto de los controles) oscilaron entre 0,95 y 1,15 para todas las condiciones ensayadas, poniendo de manifiesto que el estado redox intracelular no se altera. Estos resultados pondrían de manifiesto el efecto del resto del sistema de defensa antioxidante presente en el parásito.

6.2 Ensayos *in vivo* de la Vitamina C

6.2.1 Evaluación de la actividad tripanocida de la Vitamina C

El estudio sobre un modelo murino nos permite evaluar más eficientemente si la droga que estamos estudiando puede ser utilizada como tratamiento. Las determinaciones *in vivo* se realizaron sobre un modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas utilizando ratones de la cepa C3H/HeN y se ensayaron los siguientes tratamientos:

- ✓ GrupoVit C (1,5 mg/kg de peso/día).
- ✓ GrupoBnz (0,75 mg/kg/día).
- ✓ GrupoVit C (1,5 mg/kg de peso/día) + Bnz (0,75 mg/kg/día).
- ✓ GrupoControl, sólo administración del vehículo (PBS 0,05M).

La evolución de los tratamientos se siguió midiendo parasitemia, sobrevida y pérdida de peso de los animales.

Los resultados de las parasitemias y del porcentaje de sobrevida se muestran en la figura 6.5. El grupo control presentó un pico de parasitemia en el día 15 posinfección de $(60,5 \pm 1,5) \times 10^6$ parásitos/ml, mientras que el grupo tratado con Vitamina C sola mostró una disminución del 55% en dicho valor. Simultáneamente, los ratones tratados con Bnz solo o combinado con Vitamina C presentaron niveles similares de parasitemia $[(18,65 \pm 1,5) \times 10^6$ y $(16,66 \pm 1,5) \times 10^6$ parásitos/ml, respectivamente]. En cuanto al área bajo las curvas de parasitemia, se observaron disminuciones del

40,45%; 58,65% y 63,79% para ratones tratados solo con Vitamina C, solo con Bnz, o la combinación de ambos, respectivamente (figura 6.4)

Mientras que en el grupo control se registró un 100% de mortalidad entre los días 14 y 29 post-infección, el grupo tratado con Bnz + Vitamina C mostró 100% de supervivencia hasta el final del período de tratamiento acompañado de un mejor aspecto del pelaje y comportamiento (mayor actividad e interacción entre pares) de los animales de estos dos lotes.

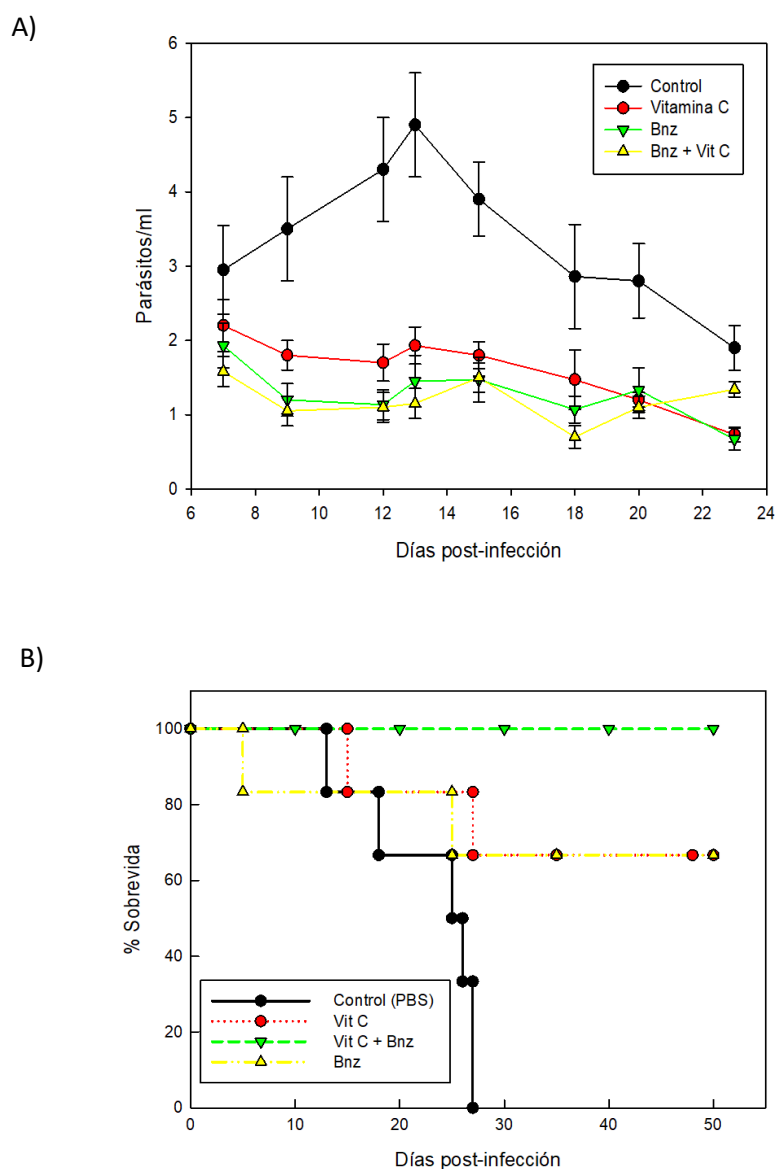


Figura 6.4 Efecto del tratamiento con Vit C (1,5 mg/kg/día) administrada intraperitonealmente sola o conjuntamente con Bnz sobre la cantidad de parásitos/ml (A) y la sobrevida (B). Los ratones fueron tratados luego de 7 días de ser infectados.

Sumado a esto, los ratones tratados con la combinación de compuestos presentaron una reducción de la pérdida de peso lo que explica una mejora del estado de salud (Figura 6.5)

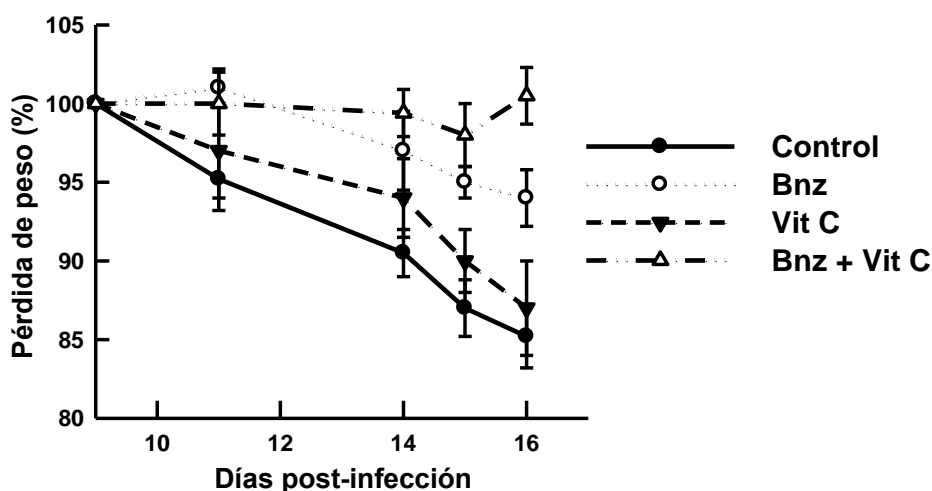


Figura 6.5: Curva de peso de los ratones de los distintos tratamientos. Se observa que los ratones tratados con la combinatoria Vitamina C + Bnz son los que menos pérdida de peso presentaron respecto de los demás grupos.

De los ensayos *in vivo* surge que el tratamiento combinado es el más eficiente para combatir, en este modelo, la infección por *T.cruzi*.

6.2.2 Evaluación de la citotoxicidad del Bnz *in vivo*

Habiendo demostrado *in vitro* que la Vitamina C (50 μ M) es capaz de aumentar alrededor de 40 veces la CC₅₀ del Bnz, nuestra propuesta es que el tratamiento conjunto Vit C + Bnz, resulta más efectivo que el tratamiento de Bnz solo, debido a que la Vitamina C es capaz de contrarrestar la citotoxicidad del Bnz. Para corroborar esta hipótesis, tratamos ratones de la cepa CF1, en primer lugar, con una inyección diaria de Bnz (0,7 o 1,4 mg/Kg/día) durante 5 días consecutivos en presencia y ausencia de vitamina C (1,5 mg/Kg/día). El tratamiento no produjo alteraciones a nivel hepático ni renal. La ausencia de citotoxicidad también fue observada con 2 dosis diarias de Bnz (3,33 mg/Kg) aplicadas durante 2, 3 o 4 días. En este último esquema de tratamiento, además de los parámetros mencionados anteriormente, se midió el nivel de glutatión reducido en el hígado. Ninguna manifestación de daño

fue observada. En ningún caso se evidenciaron modificaciones en el aspecto del pelaje y de la conducta de los animales. Estudios actualmente en curso están siendo llevados a cabo para establecer las condiciones en las cuales el Bnz manifieste su citotoxicidad, y así, poder evaluar el posible efecto de la Vitamina C.

Porfirina A4

6.3 Ensayos *in vitro*

6.3.1 Evaluación de la actividad anti-*T.cruzi*

Como se sabe, las porfirinas son moléculas que poseen un sistema de dobles enlaces conjugados en un núcleo tetrapirrol, que les confiere bandas de absorción características en el visible y en el ultravioleta cercano. Por esta razón se utilizan como fotosensibilizadoras en terapias de inactivación fotodinámica (IFD). La inactivación fotodinámica (IFD) es una técnica usada para el tratamiento de infecciones por microorganismos patógenos. Posee un amplio espectro de acción, es eficiente en cepas resistentes a antibióticos y tiene bajo potencial mutagénico. Se basa en la acumulación diferencial en las células de un fotosensibilizador (FS), que se activa con luz visible generando radicales libres que conducen a la muerte celular. La porfirina A4 es una aminoporfirina sintética cuyo efecto como antimicrobiano se está estudiando en diferentes microorganismos tales como *E.coli* y virus (Caminos *et al.*, 2006; Jori & Brown, 2004; Wainwright, 2004). En la figura 6.6 se puede observar la estructura de la porfirina sintética A4.

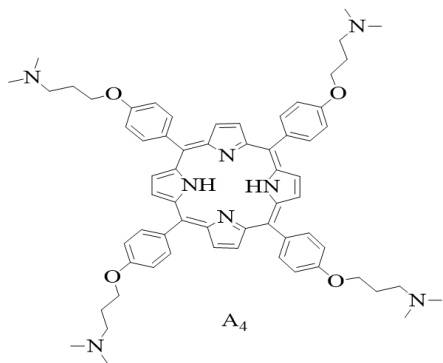


Figura 6.6: Estructura de la porfirina sintética A4.

Sabiendo que el parásito presenta una captación preferencial por los compuestos porfirínicos, evaluamos in vitro la actividad anti-*T. cruzi* de la porfirina A4. La figura 6.7 pone de manifiesto la actividad anti-*T. cruzi* de la droga en los estadios de epimastigote y tripomastigote. Para tripomastigote, el efecto tripanocida se potencia 1000 veces cuando la porfirina es iluminada durante 15 minutos. Cabe aclarar que, durante el tratamiento con la porfirina no se produjeron alteraciones visibles al microscopio óptico de las células presentes en la sangre.

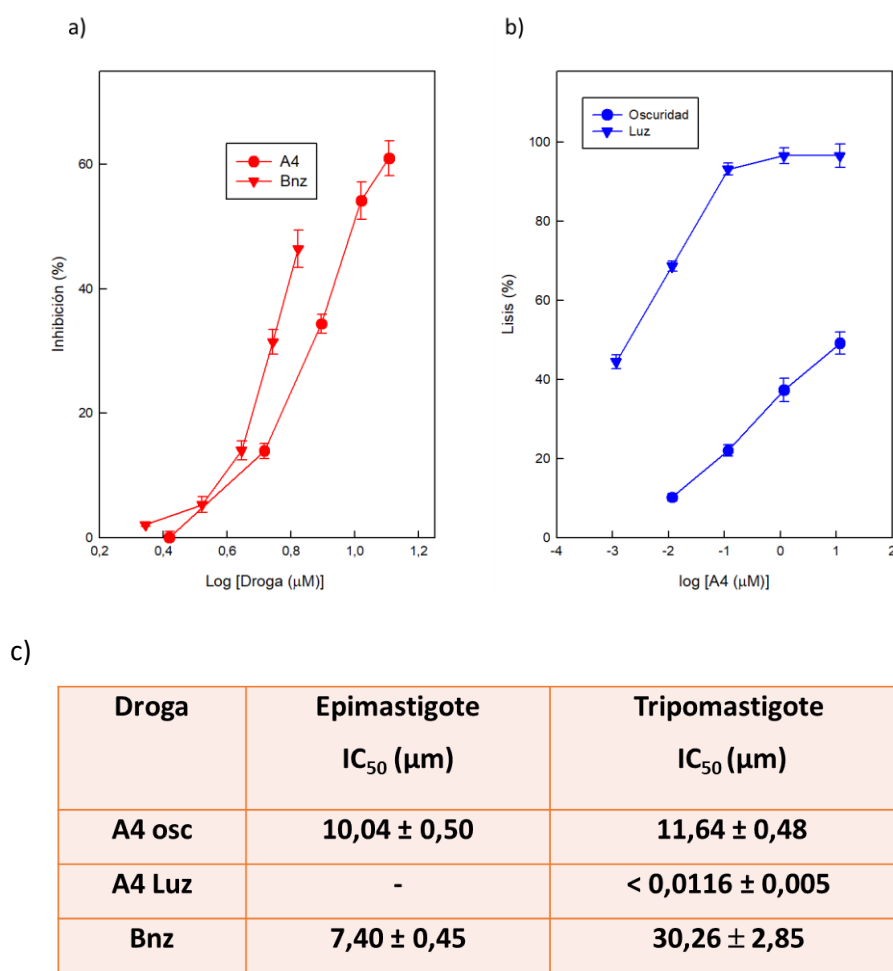


Figura 6.7: Efecto antiparasítico de A4 sobre epimastigotes (a) y tripomastigotes de *T. cruzi* (b) en presencia o ausencia de luz. c) Valores de IC₅₀ provenientes de las gráficas a y b.

En base a estos resultados, la porfirina podría ser utilizada con el propósito de esterilizar la sangre que llega a los bancos de sangre. Para evaluar su selectividad por un lado, calculamos la CC₅₀

sobre células de mamífero (figura 6.8a) y por microscopia óptica investigamos posibles alteraciones en las células de la sangre. Los resultados de la CC_{50} para los estadios de epimastigote y tripomastigote en presencia o ausencia de luz se exponen en la figura 6.8b

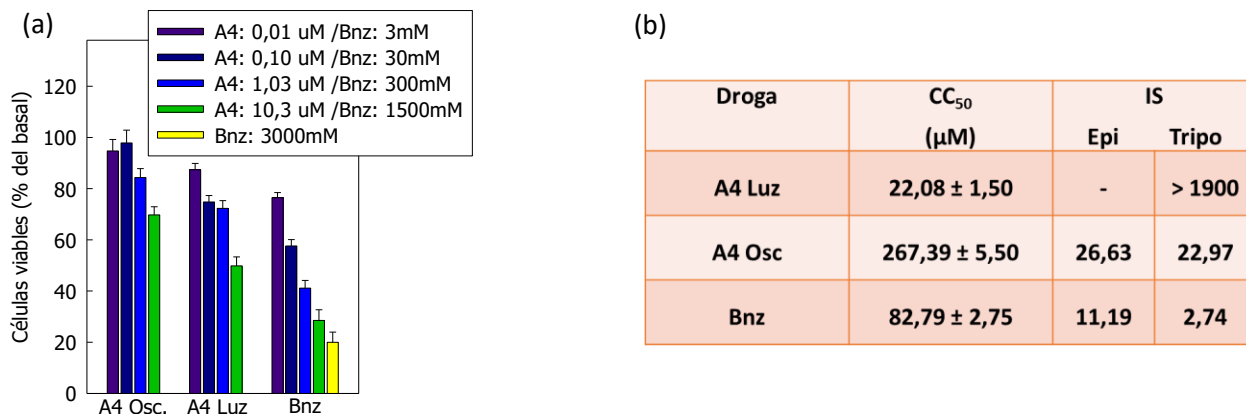


Figura 6.8: Efecto de la porfirina A4 y Bnz sobre la viabilidad de las células Vero. Luego del agregado de A4 las células fueron irradiadas o mantenidas en oscuridad durante 15 minutos (a) Histograma representando los resultados obtenidos donde también se adicionan los resultados obtenidos para Bnz, droga de referencia. (b) CC_{50} e IS obtenidos para A4 en oscuridad y luz

La citotoxicidad de la porfirina expuesta a la luz resultó ser casi 4 veces mayor que la de Bnz, pero teniendo en cuenta los IC_{50} de cada una de ellas (figura 6.8), se le adjudica el alto IS que la postula como una droga candidato muy eficiente para tratar la sangre infectada.

A continuación, evaluamos las características espectrales de la porfirina con el fin de establecer condiciones adecuadas de cuantificación que nos permitan monitorearla luego de ser agregada a sangre.

6.3.2 Comportamiento espectral de A4

En la Figura 6.9a se esquematiza el comportamiento espectral de A4 en la región UV-visible del espectro, empleando la porfirina A4 disuelta en DMSO. Se observa un máximo de absorción a 425 nm, cuyo valor de absorbancia guarda una relación lineal con la concentración de A4 entre 1 y 6 μM .

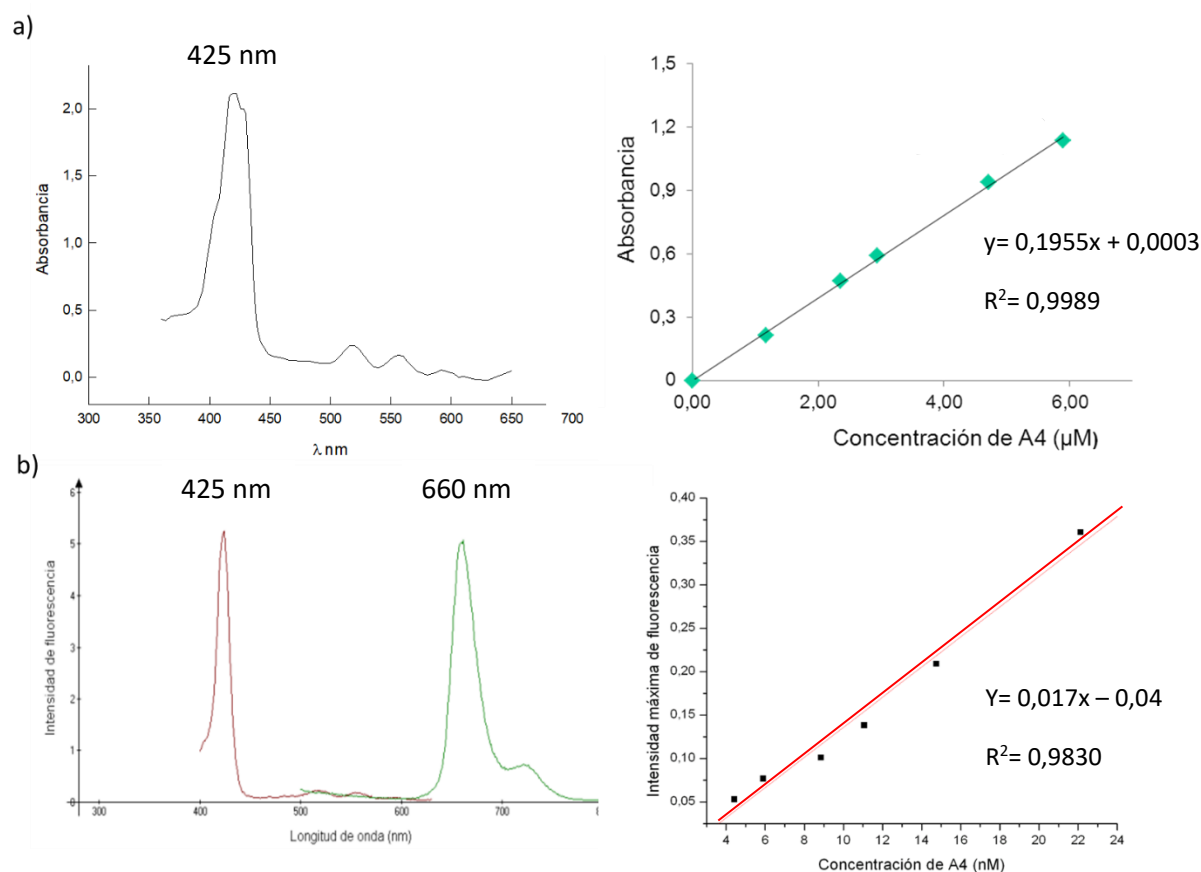


Figura 6.9. Comportamiento espectral de la porfirina A4. A) Espectros de absorción UV-visible y curva de calibración correspondiente. b) Espectro de fluorescencia de A4 disuelta en DMSO y curva de calibración correspondiente

Como parte de la caracterización fluorométrica se muestran los espectros de emisión (λ_{exc} 425 nm) y de excitación (λ_{em} 660 nm) de la porfirina disuelta en DMSO (Figura 6.10b). Excitando a 425 nm el valor de unidades de fluorescencia emitidos a 660 nm guarda una muy buena correlación lineal con la concentración de porfirina, en el rango de 4,4 a 22,13 nM. El límite de detección del método fluorométrico resultó ser 225 veces más bajo que el correspondiente a la espectrofotometría de absorción. Por esta razón el seguimiento de la porfirina en las muestras de sangre se llevó a cabo por fluorometría. La iluminación de la porfirina por 15 minutos no produce modificaciones espectrales.

6.3.3 Agregado de A4 en sangre

-Efecto sobre sangre entera

A pesar de haber observado que el agregado de porfirina A4 (0,118 μM) a sangre entera no afecta la morfología de las células de la sangre, evaluamos, la distribución de la A4 en plasma y glóbulos rojos. La porfirina fue agregada a la sangre y luego de 15 minutos de luz u oscuridad, por centrifugación, los glóbulos rojos fueron separados del plasma y lisados por 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento. El lisado fue diluido en DMSO. Esta solución fue, entonces, excitada a 425 nm y se registró el espectro de emisión. Los espectros tomados para las fracciones de glóbulos rojos no se muestran ya que no superaron la línea de base en ningún caso. Los controles realizados con sangre sin porfirina A4 tampoco presentaron fluorescencia entre 600 y 800 nm. En la figura 6.10, se muestran los espectros de emisión para plasma obtenido de las distintas condiciones de tratamiento y se compara con el espectro correspondiente a la misma concentración de A4 agregada a la sangre, pero disuelta en DMSO

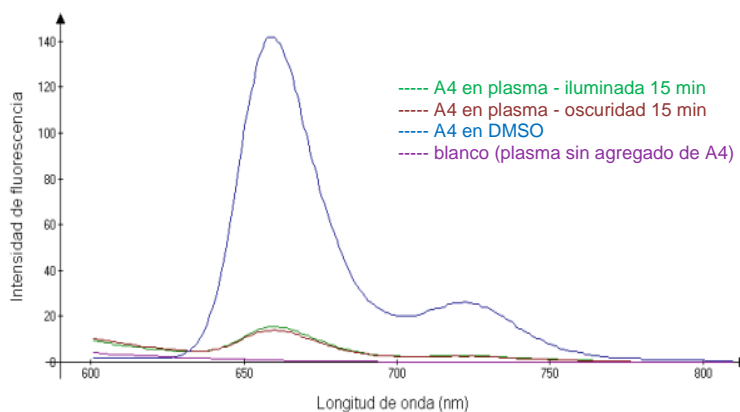


Figura 6.10: Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$) plasma proveniente de sangre adicionada con la porfirina A4, iluminada y sin iluminar, y diluido con DMSO (1:12,5). Se superpone con el espectro de la A4 en DMSO y con un blanco de plasma sin el agregado de A4.

La diferencia de intensidad de fluorescencia entre la solución irradiada y aquella mantenida en oscuridad es mínima. La intensidad máxima de fluorescencia respecto del control mostró una disminución que, según la curva de calibración, corresponde a la permanencia en plasma del 10% de los nmoles de porfirina administrada (0,14 nmoles). Estos resultados estarían indicando dos

posibilidades, que el 90% de la porfirina se haya metabolizado o que su fluorescencia esta enmascarada por algún componente del plasma o glóbulo rojo o una combinación de ambas

-Efecto de la albúmina sérica bovina sobre la fluorescencia de la porfirina

A continuación, se evaluó la posible interacción entre A4 y la albúmina sérica bovina, proteína mayoritaria del plasma. Para llevar adelante este ensayo, se varió la concentración de albúmina entre (0, 15, 30, 45, 60 y 75 mg/ml), se adicionó una concentración fija de porfirina 1,164 o 0,116 μM y se detectó la señal fluorescente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.11

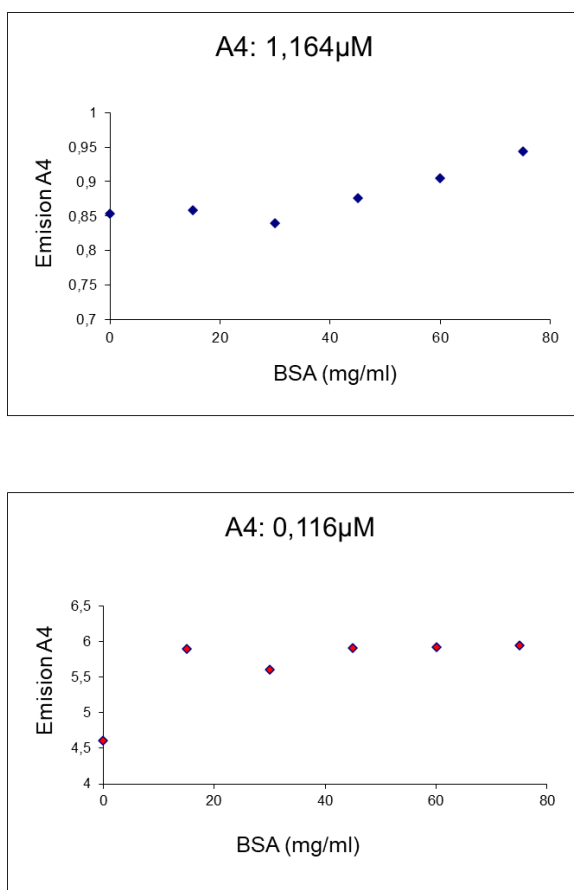


Figura 6.11: Efecto de distintas concentraciones de albumina sobre la señal espectral de A4. A dos concentraciones fijas de A4 se le adicionaron concentraciones variables de albúmina (BSA) y se detecto luego la señal fluorométrica de la porfirina de la manera habitual.

En base a estos resultados descartamos toda interacción de la albúmina con la porfirina como responsable de la pérdida de señal espectral en plasma.

6.4 Conclusiones parciales del Capítulo 6

Vitamina C

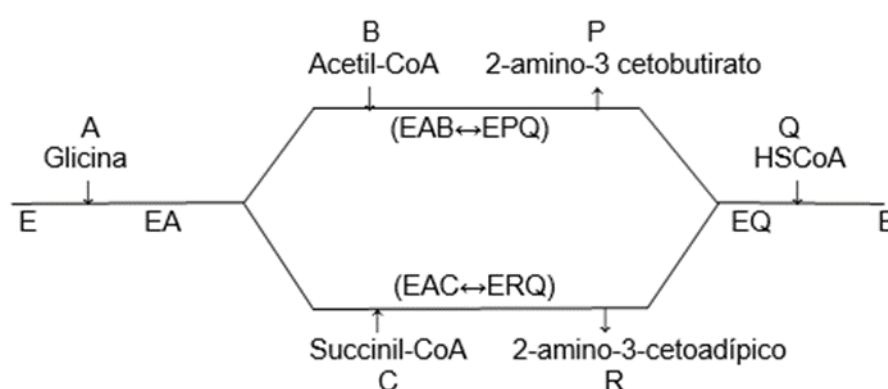
En los ensayos *in vitro*, la Vit C manifestó sobre los tres estadíos del parásito una actividad antiparasítica similar a la del Bnz. En base a la curva de parasitemia se puso de manifiesto la actividad anti-*T.cruzi* de la Vit C, la cual fue inferior a la de Bnz (aproximadamente un 40% menor). El tratamiento conjunto Vit C + Bnz no modificó los valores de parasitemia respecto al Bnz sólo, pero sí aumento sobrevida de los animales. Esta mejora en los animales tratados con la combinación Vit C + Bnz respecto a Bnz, podría justificarse por la disminución de citotoxicidad del Bnz en presencia del ácido ascórbico. Los ensayos de citotoxicidad *in vivo* realizados no arrojaron resultados capaces de confirmar o desestimar la hipótesis anteriormente planteada, ya que no hemos aún logrado establecer un modelo adecuado donde se manifieste la citotoxicidad del Bnz solo. Adjudicar los efectos benéficos de la vitamina C sobre la citotoxicidad del Bnz no excluye la posibilidad de una acción del ácido ascórbico sobre otros blancos, tales como el sistema inmune, que también, podrían explicar las mejoras observadas en los ratones.

Porfirina A4

Los valores de IC₅₀ de la amino porfirina A4 sobre tripomastigote la muestran como un potente agente tripanocida y como un fotosensibilizador prometedor para aplicar la inactivación fotodinámica como método de descontaminación de sangre, en las zonas endémicas de la enfermedad. Respecto al destino del fotosensibilizador luego de la inactivación fotodinámica, se requieren estudios adicionales para esclarecer el destino de la porfirina.

Conclusiones Finales

De este trabajo surgen como conclusiones finales la confirmación de que el parásito es capaz de sintetizar ALA, a pesar de no poder metabolizarlo a porfirina. En el intento de identificar la enzima encargada de sintetizarlo surgió la secuencia TcpHem1, como posible candidata. Los estudios realizados (bioinformáticos y bioquímicos) coinciden en que la proteína en cuestión es capaz de tomar de forma inespecífica tanto, la succinil CoA para generar ALA, como acetil CoA para formar AA. Con el ALA-S comparte que su expresión es regulada por hemo, pero a nivel de secuencia y estructura estaría más emparentada con una enzima del tipo AA-S. Estos resultados, junto con los reportes que indican que el genoma del parásito ha sufrido, a lo largo de su historia evolutiva, distintos episodios de reducción (un ejemplo claro es la ausencia de intrones en la mayoría de sus genes, así como de secuencias promotoras para la RNA pol II) nos llevarían a pensar que sería posible que, dada la gran homología entre el ALA-S y la AA-S, una misma proteína podría llegar a cumplir las dos funciones. Justificando los resultados obtenidos, pero no totalmente confirmado, postularíamos el siguiente mecanismo de acción para la proteína TcpHem1:



Donde: E representa la enzima libre unida a fosfato de piridoxal, EA y EQ complejos no centrales para el primer sustrato y último producto respectivamente, EAB y EAC los complejos centrales para los sustratos y EPQ y ERQ los complejos centrales para los productos. A partir de P se generaría la AA y de R el ALA. Cabe aclarar que se entiende por complejos centrales aquellos en los cuales la enzima tiene todos los sitios para sustratos o productos ocupados; por el contrario, en el caso de complejos no centrales estos sitios no están totalmente ocupados.

Respecto de la terapéutica de la enfermedad de Chagas se concluye que, la vitamina C, independientemente de su actividad tripanocida, su efecto más importante sería la capacidad de disminuir la citotoxicidad del Bnz. Esto nos lleva a concluir que la vitamina C no solo mejoraría el tratamiento con Bnz, sino que además, podría ser utilizada como suplemento para una terapia combinada con Bnz y otra droga con actividad anti-*T.cruzi*.

Finalmente, de este trabajo, también surge que la inactivación fotodinámica empleando porfirinas como fotosensibilizadores podría llegar a ser una estrategia adecuada para controlar la transmisión del parásito por transfusiones, principalmente en las zonas endémicas de la enfermedad.

Referencias

- Alexander, F. W., Sandmeier, E., Mehta, P. K., & Christen, P. (1994). Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes: Regio-specific α , β and γ families. *European journal of biochemistry*, 219(3), 953-960.
- Alves, E., Iglesias, B. A., Deda, D. K., Budu, A., Matias, T. A., Bueno, V. B., & Garcia, C. R. (2015). Encapsulation of metalloporphyrins improves their capacity to block the viability of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(2), 351-358.
- Anderson, K. E. (2001). Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. *The metabolic & molecular bases of inherited disease*, 2991-3062.
- Andrade, H. M., Murta, S. M., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirdé, P., & Romanha, A. J. (2008). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *Journal of proteome research*, 7(6), 2357-2367.
- Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Sanchez, G., Vargas, S. L., & Rodriguez, J. (2003). Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(1), 23-29.
- Araujo, L. S., Lombardo, M. E., & AM, D. C. B. (1998). Regulatory role of ALA-S and ALA-D in a haem-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 44(4), 591-595.
- Araújo, M. S. S., Martins-Filho, O. A., Pereira, M. E. S., & Brener, Z. (2000). A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6), 819-824.
- Astner, I., Schulze, J. O., Van den Heuvel, J., Jahn, D., Schubert, W. D., & Heinz, D. W. (2005). Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. *The EMBO journal*, 24(18), 3166-3177.
- Batlle M del C & Magnin P (1988) Actualizaciones médico bioquímicas. *Acta bioquímica clínica Latinoamericana Sup. Nro 2*. ISSN 0325-2957. Federación bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
- Batlle, A., Magnin, P. H., Rossetti, M. V., Parera, V. E., & Stella, A. M. (1997). Porfirias y porfirinas: aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular. In *Porfirias y porfirinas: aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular* (pp. x-171).
- Begum, K., Kim, H. S., Kumar, V., Stojiljkovic, I., & Wataya, Y. (2003). In vitro antimalarial activity of metalloporphyrins against *Plasmodium falciparum*. *Parasitology research*, 90(3), 221-224.

- Belloti, G., Bocchi, E. A., De Moraes, A. V., de Lourdes Higuchi, M., Barbero-Marcial, M., Sosa, E., ... & Pileggi, F. (1996). In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *American heart journal*, 131(2), 301-307.
- Bonney, K. M., & Engman, D. M. (2008). Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?. *Current molecular medicine*, 8(6), 510-518.
- Braidotti, G., Borthwick, I. A., & May, B. K. (1993). Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinic acid synthase from rat. *Journal of Biological Chemistry*, 268(2), 1109-1117.
- Branche, C., Ochaya, S., Åslund, L., & Andersson, B. (2006). Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 147(1), 30-38.
- Branquinho, R. T., Mosqueira, V. C. F., Oliveira-Silva, J. C. V. D., Simões-Silva, M. R., Saúde-Guimarães, D. A., & Lana, M. D. (2014). Sesquiterpene lactone in nanostructured parenteral dosage form is efficacious in experimental Chagas disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(4), 2067-2075.
- Brown, B. L., Kardon, J. R., Sauer, R. T., & Baker, T. A. (2018). Structure of the mitochondrial aminolevulinic acid synthase, a key heme biosynthetic enzyme. *Structure*, 26(4), 580-589.
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(8), e0004792.
- Buckner, F. S., & Navabi, N. (2010). Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Current opinion in infectious diseases*, 23(6), 609. C. A. Hoare and F. G. Wallace, "Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology," *Nature*, vol. 212, no. 5068, pp. 1385-1386, 1966
- Callejas-Hernández, F., Gutierrez-Nogues, Á., Rastrojo, A., Gironès, N., & Fresno, M. (2019). Analysis of mRNA processing at whole transcriptome level, transcriptomic profile and genome sequence refinement of *Trypanosoma cruzi*. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Campos-Salinas, J., Cabello-Donayre, M., García-Hernández, R., Pérez-Victoria, I., Castanys, S., Gamarro, F., & Pérez-Victoria, J. M. (2011). A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. *Molecular microbiology*, 79(6), 1430-1444.
- Castro, E. (2009). Chagas' disease: lessons from routine donation testing. *Transfusion Medicine*, 19(1), 16-23.
- Cavalcanti, D. P., & de Souza, W. (2018). The kinetoplast of trypanosomatids: from early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. *Scanning*, 2018.
- Cenci, U., Moog, D., Curtis, B. A., Tanifuji, G., Eme, L., Lukeš, J., & Archibald, J. M. (2016). Heme pathway evolution in kinetoplastid protists. *BMC evolutionary biology*, 16(1), 1-18.
- Cencig, S., Coltel, N., Truyens, C., & Carlier, Y. (2012). Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. *International journal of antimicrobial agents*, 40(6), 527-532.
- Chen W, Dailey HA, Paw BH 2010. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood* 116: 628-630.

- Chernova, T., Smith, A.G. & Lloyd Raven, E. The regulatory role of heme in neurons. *Metallomics* 3(10), 955-962 (2011)
- Chiabrando, D., Mercurio, S., & Tolosano, E. (2014). Heme and erythropoiesis: more than a structural role. *haematologica*, 99(6), 973.
- Choi, H. P., Hong, J. W., Rhee, K. H., & Sung, H. C. (2004). Cloning, expression, and characterization of 5-aminolevulinic acid synthase from *Rhodopseudomonas palustris* KUGB306. *FEMS microbiology letters*, 236(2), 175-181.
- Chung, S. W., Hall, S. R., & Perrella, M. A. (2009). Role of haem oxygenase-1 in microbial host defence. *Cellular microbiology*, 11(2), 199-207.
- Ciccarelli, A. B., Frank, F. M., Puente, V., Malchiodi, E. L., Batlle, A., & Lombardo, M. E. (2012). Antiparasitic effect of vitamin B12 on *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(10), 5315-5320.
- Ciccarelli, A., Araujo, L., Batlle, A., & Lombardo, E. (2007). Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 134(7), 959-965.
- Cieslak JA, Cullen JJ. (2015). Treatment of pancreatic cancer with pharmacologic ascorbate. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16:759–770).
- Clayton, J. (2010). The promise of *T. cruzi* genomics. *Nature*, 465(7301), S16-S17.
- Cole, K. A., Ziegler, J., Evans, C. A., & Wright, D. W. (2000). Metalloporphyrins inhibit β -hematin (hemozoin) formation. *Journal of inorganic biochemistry*, 78(2), 109-115.
- Corwin, H. L., & Krantz, S. B. (2000). Anemia of the critically ill: "Acute" anemia of chronic disease. *Critical care medicine*, 28(8), 3098-3099.
- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 113-122.
- Cupello, M. P., De Souza, C. F., Buchensky, C., Soares, J. B. R. C., Laranja, G. A. T., Coelho, M. G. P., ... & Paes, M. C. (2011). The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta tropica*, 120(3), 211-218.
- Cupello, M. P., Souza, C. F., Menna-Barreto, R. F., Nogueira, N. P. A., Laranja, G. A. T., Sabino, K. C. C., & Paes, M. C. (2014). Trypanosomatid essential metabolic pathway: New approaches about heme fate in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and biophysical research communications*, 449(2), 216-221.
- Cupello, M. P., De Souza, C. F., Buchensky, C., Soares, J. B. R. C., Laranja, G. A. T., Coelho, M. G. P., ... & Paes, M. C. (2011). The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta tropica*, 120(3), 211-218.
- D'Angelo, J. G., Bordon, C., Posner, G. H., Yolken, R., & Jones-Brando, L. (2009). Artemisinin derivatives inhibit *Toxoplasma gondii* in vitro at multiple steps in the lytic cycle. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(1), 146-150.
- De Souza, W. (2000) O parasita e sua interacao com o hospedeiros em *Trypanosoma cruzi* e doenca de Chagas. Brener/Andrade/Barral-Netto. 2da ed., pág. 88-123

- Deubzer B, Mayer F, Kuci Z, Niewisch M, Merkel G, Handgretinger R, Bruchelt G. (2010). H₂O₂-mediated cytotoxicity and pharmacologic ascorbate concentrations of neuroblastoma cells: potential role of lactate and ferritin, *Cell. Physiol. Biochem.* 25:767–774
- Díaz-Viraqué, F., Pita, S., Greif, G., De Souza, R. D. C. M., Iraola, G., & Robello, C. (2019). Nanopore sequencing significantly improves genome assembly of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Genome biology and evolution*, 11(7), 1952-1957.
- Docampo, R., & Moreno, S. N. (1986, September). Free radical metabolism of antiparasitic agents. In *Federation proceedings* (Vol. 45, No. 10, pp. 2471-2476).
- Du J, Cullen JJ, Buettner GR. (2012). Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1826: 443–457.
- Duschak, V. G. (2019). Major kinds of drug targets in Chagas disease or American Trypanosomiasis. *Current drug targets*, 20(11), 1203-1216.
- Edgar, A. J., & Polak, J. M. (2000). Molecular cloning of the human and murine 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase cDNAs. *European Journal of Biochemistry*, 267(6), 1805-1812.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., ... & Andersson, B. (2005a). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), 409-415.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., ... & Hall, N. (2005b). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*, 309(5733), 404-409.
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (38), e1918.
- Espuelas, S., Plano, D., Nguewa, P., Font, M., Palop, J. A., Irache, J. M., & Sanmartín, C. (2012). Innovative lead compounds and formulation strategies as newer kinetoplastid therapies. *Current medicinal chemistry*, 19(25), 4259-4288.
- Fairlamb, A. H., & Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual review of microbiology*, 46(1), 695-729.
- Furuyama, K., & Sassa, S. (2002). Multiple mechanisms for hereditary sideroblastic anemia. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 48(1), 5-10.
- Gafter-Gvili A, Zingerman B, Rozen-Zvi B, Ori Y, Green H, Lubin I, Malachi T, Gafer U, Herman-Edelstein M 2013. Oxidative stress-induced DNA damage and repair in human peripheral blood mononuclear cells: protective role of hemoglobin. *PLoS One* 8: e68341.
- Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D. D. S., & Jurberg, J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 202(1), 1-36.
- Gilbert, D. N., Moellering, R. C., Eliopoulos, G. M., & Sande, M. A. (2003). *The Sanford guide to antimicrobial therapy*, Antimicrobial Therapy. Inc., Hyde Park, VT.

- Gonçalves, C. S., Ávila, A. R., De Souza, W., Motta, M. C. M., & Cavalcanti, D. P. (2018). Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-14.
- Gutierrez, F. R., Pavanelli, W. R., Medina, T. S., Silva, G. K., Mariano, F. S., Guedes, P. M., ... & Silva, J. S. (2014). Haeme oxygenase activity protects the host against excessive cardiac inflammation during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and Infection*, 16(1), 28-39.
- Hamilton, J. W., Bement, W. J., Sinclair, P. R., Sinclair, J. F., Alcedo, J. A., & Wetterhahn, K. E. (1991). Heme regulates hepatic 5-aminolevulinate synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription. *Archives of biochemistry and biophysics*, 289(2), 387-392.
- Hunter, G. A., & Ferreira, G. C. (2009). 5-Aminolevulinate synthase: catalysis of the first step of heme biosynthesis. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 55(1), 102.
- Huy, N. T., Kamei, K., Kondo, Y., Serada, S., Kanaori, K., Takano, R., ... & Hara, S. (2002). Effect of antifungal azoles on the heme detoxification system of malarial parasite. *The Journal of Biochemistry*, 131(3), 437-444.
- Huy, N. T., Takano, R., Hara, S., & Kamei, K. (2004). Enhancement of heme-induced membrane damage by the anti-malarial clotrimazole: the role of colloid-osmotic forces. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(3), 361-365.
- Ikushiro, H., Nagami, A., Takai, T., Sawai, T., Shimeno, Y., Hori, H., ... & Yano, T. (2018). Heme-dependent inactivation of 5-aminolevulinate synthase from *Caulobacter crescentus*. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Imaizumi, S., Kay, A. & Schroeder, J.I. Circadian rhythms. Daily watch on metabolism. *Science* 318, 1730-1731 (2007)
- Imaz-Iglesia, I., García San Miguel, L., Blasco-Hernandez, T., Martín Águeda, M. B., Gonzalez-Enriquez, J., Ayala Morillas, L. E. & Sarriá-Santamera, A. (2015). Evaluación económica de distintas estrategias de cribado de la enfermedad de Chagas en España.
- Kayser, O., Olbrich, C., Croft, S. L., & Kiderlen, A. F. (2003). Formulation and biopharmaceutical issues in the development of drug delivery systems for antiparasitic drugs. *Parasitology research*, 90(2), S63-S70.
- Kikuchi, G., Yoshida, T., & Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 558-567.
- Kořený L, LukešJ, Oborník M. (2010) Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all?. *Int. J Parasitol*, 40: 149-156.
- Kořený, L., Oborník, M., & Lukeš, J. (2013). Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites. *PLoS pathogens*, 9(1), e1003088.
- Krishnamurthy, P., Xie, T., & Schuetz, J. D. (2007). The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacology & therapeutics*, 114(3), 345-358.
- Kubota, Y., Nomura, K., Katoh, Y., Yamashita, R., Kaneko, K., & Furuyama, K. (2016). Novel mechanisms for heme-dependent degradation of ALAS1 protein as a component of negative feedback regulation of heme biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 291(39), 20516-20529.

Kuhl T, Imhof D 2014. Regulatory Fe(II/III) heme: the reconstruction of a molecule's biography. *Chembiochem* 15: 2024-2035. doi: 10.1002/cbic.201402218

Kumar S, Bandyopadhyay U 2005. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 157: 175-188.

Lathrop, J. T., & Timko, M. P. (1993). Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science*, 259(5094), 522-525.

Lauria-Pires, L., de Castro, C. N., Emanuel, A., & Prata, A. (1988). Ineffectiveness of allopurinol in patients in the acute phase of Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 21(2), 79-79.

Lechuga, G. C., Borges, J. C., Calvet, C. M., de Araújo, H. P., Zuma, A. A., do Nascimento, S. B., ... & Bourguignon, S. C. (2016). Interactions between 4-aminoquinoline and heme: promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(3), 154-164.

Lechuga, G. C., Pereira, M. C., & Bourguignon, S. C. (2019). Heme metabolism as a therapeutic target against protozoan parasites. *Journal of Drug Targeting*, 27(7), 767-779.

Leonardi, D., Bombardiere, M. E., & Salomon, C. J. (2013). Effects of benznidazole: cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. *International journal of biological macromolecules*, 62, 543-548.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., & Wallace, F. G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa* The committee on systematics evolution of the society of protozoologists. *The Journal of protozoology*, 27(1), 37-58.

Lien, L. F., & Beattie, D. S. (1982). Comparisons and modifications of the colorimetric assay for delta-aminolevulinic acid synthase. *Enzyme*, 28(2-3), 120-132.

Liu, J., Kaganjo, J., Zhang, W., & Zeilstra-Ryalls, J. (2018). Investigating the bifunctionality of cyclizing and “classical” 5-aminolevulinic acid synthases. *Protein Science*, 27(2), 402-410.

Lombardo, M. E., Araujo, L. S., & Batlle, A. (2003). 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(8), 1263-1271.

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA (2015). *Brock. Microbiologia de los microorganismos*. 14ª edición. ISBN 9788490352793. Pearson

Maines, M. D., & Gibbs, P. E. (2005). 30 some years of heme oxygenase: from a “molecular wrecking ball” to a “mesmerizing” trigger of cellular events. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 568-577.

Manarin, R., Bottasso, E., Bottasso, O., Serra, E., & Revelli, S. (2008). Beneficial effects of benznidazole during an infectious-based situation of systemic inflammatory response: cecal ligation and puncture. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(5), 793-796.

Manarin, R., Lamas, M. C., Bottasso, E., Serra, E., Revelli, S., & Salomón, C. J. (2013). Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology international*, 62(1), 79-81.

Marver, H. S., Tschudy, D. P., Perlroth, M. G., Collins, A., & Hunter Jr, G. (1966). The determination of aminoketones in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 14, 53-60.

Mastrangelo D, Pelosi E, Castelli G, Lo-Coco F, Testa U. (2017). Mechanisms of anti-cancer effects of ascorbate: Cytotoxic activity and epigenetic modulation. *Blood Cells Mol Dis*. pii: S1079-9796(17)30327-3.

Mauzerall, D., & Granick, S. (1956). The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *Journal of Biological Chemistry*, 219(1), 435-446.

Maximiano, F. P., de Paula, L. M., Figueiredo, V. P., de Andrade, I. M., Talvani, A., Sá-Barreto, L. C., & Cunha-Filho, M. S. (2011). Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 78(3), 377-384.

Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., ... & Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 601-620.

Merli, M. L., Pagura, L., Hernández, J., Barisón, M. J., Pral, E. M., Silber, A. M., & Cricco, J. A. (2016). The *Trypanosoma cruzi* protein TcHTE is critical for heme uptake. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(1), e0004359.

Milei, J., Guerri-Guttenberg, R. A., Grana, D. R., & Storino, R. (2009). Prognostic impact of Chagas disease in the United States. *American heart journal*, 157(1), 22-29.

Mishina, Y. V., Krishna, S., Haynes, R. K., & Meade, J. C. (2007). Artemisinins inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro growth. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(5), 1852-1854.

Morilla, M. J., Montanari, J. A., Prieto, M. J., Lopez, M. O., Petray, P. B., & Romero, E. L. (2004). Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. *International journal of pharmaceuticals*, 278(2), 311-318.

Morilla, M. J., Montanari, J., Frank, F., Malchiodi, E., Corral, R., Petray, P., & Romero, E. L. (2005). Etanidazole in pH-sensitive liposomes: design, characterization and in vitro/in vivo anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Journal of controlled release*, 103(3), 599-607.

Mosqueira, V. C. F., Lana, M., Guimarães, D. A. S., & Branquinho, R. T. (2013). Pharmaceutical compositions containing sesquiterpene lactones belonging to the class of furan heliangolides for the treatment of parasitic infections and tumours. WO2013059898.

Mukherjee, J. J., & Dekker, E. E. (1987). Purification, properties, and N-terminal amino acid sequence of homogeneous *Escherichia coli* 2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 262(30), 14441-14447. Muscia et al, 2011

Muscia, G. C., Cazorla, S. I., Frank, F. M., Borosky, G. L., Buldain, G. Y., Asís, S. E., & Malchiodi, E. L. (2011). Synthesis, trypanocidal activity and molecular modeling studies of 2-alkylaminomethylquinoline derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 46(9), 3696-3703.

Navarro, M. C., De Lima, A. R., Askue, J., & Contreras, V. T. (2003). Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 83-91.

O'Neill, P. M., Barton, V. E., & Ward, S. A. (2010). The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. *Molecules*, 15(3), 1705-1721.

Oh-Hama, T. (1997). Evolutionary consideration on 5-aminolevulinate synthase in nature. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 27(4), 405-412.

Okayama, A., Fujli, S., & Miura, R. (1990). Optimized fluorometric determination of urinary delta-aminolevulinic acid by using pre-column derivatization, and identification of the derivative. *Clinical chemistry*, 36(8), 1494-1497.

Oishi, H., Nomiyama, H., Nomiyama, K., & Tomokuni, K. (1996). Fluorometric HPLC determination of δ -aminolevulinic acid (ALA) in the plasma and urine of lead workers: biological indicators of lead exposure. *Journal of analytical toxicology*, 20(2), 106-110.

Oliveira, E. C., Fujisawa, M. M., Longo, D. E. H., Farias, A. S., Moraes, J. C., Guariento, M. E., & Santos, L. M. (2009). Neuropathy of gastrointestinal Chagas' disease: immune response to myelin antigens. *Neuroimmunomodulation*, 16(1), 54-62.

Owens, C. P., Chim, N., & Goulding, C. W. (2013). Insights on how the *Mycobacterium tuberculosis* heme uptake pathway can be used as a drug target. *Future medicinal chemistry*, 5(12), 1391-1403.

Paiva, C. N., Feijó, D. F., Dutra, F. F., Carneiro, V. C., Freitas, G. B., Alves, L. S., ... & Bozza, M. T. (2012). Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2531-2542.

Pandey, N., & Pandey-Rai, S. (2016). Updates on artemisinin: an insight to mode of actions and strategies for enhanced global production. *Protoplasma*, 253(1), 15-30.

Pereira, C. A., Carrillo, C., Miranda, M. R., Bouvier, L. A., & Canepa, G. E. (2008). *Trypanosoma cruzi*: transport of essential metabolites acquired from the host. *Medicina*, 68(5), 398-404.

Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4331.

Puente, V., Sülsen, V. P., Papademetrio, D., Batlle, A., Martino, V. S., Frank, F. M., & Lombardo, M. E. (2016). Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, 11(3), e0150526.

Reis-Cunha, J. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Valdivia, H. O., Baptista, R. P., Mendes, T. A., de Moraes, G. L., & Bartholomeu, D. C. (2015). Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *BMC genomics*, 16(1), 1-15.

Reis-Cunha, J. L., Valdivia, H. O., & Bartholomeu, D. C. (2018). Gene and chromosomal copy number variations as an adaptive mechanism towards a parasitic lifestyle in trypanosomatids. *Current genomics*, 19(2), 87-97.

Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The origin and diversification of mitochondria. *Current Biology*, 27(21), R1177-R1192.

Ross, S. J., Findlay, V. J., Malakasi, P., & Morgan, B. A. (2000). Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. *Molecular biology of the cell*, 11(8), 2631-2642.

Rossetti, M. V., Buzaleh, A. M., Parera, V. E., Fukuda, H., Lombardo, M. E., Lavandera, J., ... & Batlle, A. M. D. C. (2016). Metabolismo del hemo: las dos caras de los efectos de la acumulación de precursores y porfirinas. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 50(4), 547-573.

Salzman, T. A., & Batlle, A. M. (1986b). Heme synthetase in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 85(3), 537-541.

Salzman, T. A., Batlle, A. M. D. C., & de Souza, W. (1986a). Heme synthesis in *Trypanosoma cruzi*: Influence of the strain and culture medium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 83(1), 57-61.

Salzman, T. A., Stella, A. M., de Xifra, E. A. W., Batlle, A. M. D. C., Docampo, R., & Stoppani, A. O. (1982). Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 72(4), 663-667.

Sanchez-Sancho, F., Campillo, N. E., & Páez, J. A. (2010). Chagas disease: progress and new perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 17(5), 423-452.

Sato, H., Higashimoto, Y., Sakamoto, H., Sugishima, M., Takahashi, K., Palmer, G., & Noguchi, M. (2007). Electrochemical reduction of ferrous α -verdoheme in complex with heme oxygenase-1. *Journal of inorganic biochemistry*, 101(10), 1394-1399.

Schmidt, A., Sivaraman, J., Li, Y., Larocque, R., Barbosa, J. A., Smith, C., & Cygler, M. (2001). Three-Dimensional Structure of 2-Amino-3-ketobutyrate CoA Ligase from *Escherichia coli* Complexed with a PLP- Substrate Intermediate: Inferred Reaction Mechanism. *Biochemistry*, 40(17), 5151-5160.

Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 75-86.

Schofield, C. J., Jannin, J., & Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends in parasitology*, 22(12), 583-588.

Schulze, J. O., Schubert, W. D., Moser, J., Jahn, D., & Heinz, D. W. (2006). Evolutionary relationship between initial enzymes of tetrapyrrole biosynthesis. *Journal of molecular biology*, 358(5), 1212-1220.

Sen, R., Ganguly, S., Saha, P., & Chatterjee, M. (2010). Efficacy of artemisinin in experimental visceral leishmaniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(1), 43-49.

Shibahara, S. (2003). The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 200(4), 167-186.

Singh, K., Kaur, H., Smith, P., de Kock, C., Chibale, K., & Balzarini, J. (2014). Quinoline-pyrimidine hybrids: synthesis, antiplasmodial activity, SAR, and mode of action studies. *Journal of medicinal chemistry*, 57(2), 435-448.

- Smirnova, G. V., Muzyka, N. G., Glukhovchenko, M. N., & Oktyabrsky, O. N. (2000). Effects of menadione and hydrogen peroxide on glutathione status in growing *Escherichia coli*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(7), 1009-1016.
- Srivastava, G., Borthwick, I. A., Maguire, D. J., Elferink, C. J., Bawden, M. J., Mercer, J. F., & May, B. K. (1988). Regulation of 5-aminolevulinate synthase mRNA in different rat tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 263(11), 5202-5209.
- Srivastava, P., Sharma, G. D., Kamboj, K. K., Rastogi, A. K., & Pandey, V. C. (1997). Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Molecular and cellular biochemistry*, 171(1), 65-68.
- Sülßen VP, Frank FM, Cazorla SI, Barrera P, Freixa B, Vila R, Sosa MA, Malchiodi EL, Muschietti LV, Martino VS. (2011). Psilostachyin C: a natural compound with trypanocidal activity. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37:536-543.
- Tang, X.D., Xu, R., Reynolds, M.F., Garcia, M.L., Heinemann, S.H. & Hoshi, T. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium dependent Slo1 BK channels. *Nature* 425, 531-535 (2003)
- Tanowitz, H. B., Machado, F. S., Jelicks, L. A., Shirani, J., de Carvalho, A. C. C., Spray, D. C., ... & Weiss, L. M. (2009). Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Progress in cardiovascular diseases*, 51(6), 524-539.
- Teixeira, A. R., Calixto, M. A., & Teixeira, M. L. (1994). Chagas' disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 305(2), 189-196.
- Teixeira, A. R., Nascimento, R. J., & Sturm, N. R. (2006). Evolution and pathology in Chagas disease: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 463-491.
- Tian, Q., Li, T., Hou, W., Zheng, J., Schrum, L. W., & Bonkovsky, H. L. (2011). Lon peptidase 1 (LONP1)-dependent breakdown of mitochondrial 5-aminolevulinic acid synthase protein by heme in human liver cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26424-26430.
- Tiffert, T., Ginsburg, H., Krugliak, M., Elford, B. C., & Lew, V. L. (2000). Potent antimalarial activity of clotrimazole in in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1), 331-336.
- Tishler PV, Winston SH. (1984). Simple screening test for qualitative detection of increased delta-aminolevulinic acid in urine *Clin Chem*. Aug;30(8):1372-3.
- Tomaro, M. L., & del C Batlle, A. M. (2002). Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(3), 216-220.
- Tripodi, K. E., Menendez Bravo, S. M., & Cricco, J. A. (2011). Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. *Enzyme research*, 2011.
- Trochine, A., Creek, D. J., Faral-Tello, P., Barrett, M. P., & Robello, C. (2014). Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(5), e2844.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.

- Turrens, J. F. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular aspects of medicine*, 25(1-2), 211-220.
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 472-481.
- Urbina, J. A. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta tropica*, 115(1-2), 55-68.
- Urbina, J. A., & Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in parasitology*, 19(11), 495-501.
- Vallejo, G. A., Guhl, F., & Schaub, G. A. (2009). Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: Vector–parasite interactions. *Acta tropica*, 110(2-3), 137-147.
- Vanderesse, R., Colombeau, L., Frochot, C., & Acherar, S. (2016). Inactivation of malaria parasites in blood: PDT vs inhibition of hemozoin formation. *IntechOpen*.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics*, 3(3), 1-10.
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M. G., Petti, M., Bertocchi, G., & Armenti, A. (2009). Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert review of anti-infective therapy*, 7(2), 157-163.
- Vitek, L., & Schwertner, H. A. (2007). The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Advances in clinical chemistry*, 43, 1-57.
- Weng, Y. H., Yang, G., Weiss, S., & Dennery, P. A. (2003). Interaction between heme oxygenase-1 and-2 proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 50999-51005.
- World Health Organization (WHO), 2021. Chagas Disease (American Trypanosomiasis), https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1.
- Yamamoto, M., Hayashi, N., & Kikuchi, G. (1982). Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the synthesis of δ -aminolevulinate synthase in rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 105(3), 985-990.
- Yamamoto, M., Hayashi, N., & Kikuchi, G. (1983). Translational inhibition by heme of the synthesis of hepatic δ -aminolevulinate synthase in a cell-free system. *Biochemical and biophysical research communications*, 115(1), 225-231.
- Yamauchi, K., Hayashi, N., & Kikuchi, G. (1980). Translocation of delta-aminolevulinate synthase from the cytosol to the mitochondria and its regulation by hemin in the rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 255(4), 1746-1751.
- Zaidenberg, A., Tournier, H. A., Schinella, G. R., & Buschiazzi, H. O. (2000). *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Revista latinoamericana de microbiología*, 42(1), 21-26.
- Zhang, S., & Gerhard, G. S. (2008). Heme activates artemisinin more efficiently than hemin, inorganic iron, or hemoglobin. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(16), 7853-7861.
- Zhang, Y., Furuyama, K., Kaneko, K., Ding, Y., Ogawa, K., Yoshizawa, M., ... & Shibahara, S. (2006). Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines: A

possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. The FEBS journal, 273(14), 3136-3147.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. D. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O. & Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 104(7), 1051-1054.