



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



# Caracterización funcional y análisis evolutivo de Prostaglandina Sintetasas de *Trypanosoma cruzi*

Tesis de Maestría

Florencia Díaz Viraqué

Programa de Posgrado en Biología de Pedeciba, sub-área Biología Celular y Molecular  
Institut Pasteur de Montevideo  
Universidad de la República

Montevideo – Uruguay  
Marzo de 2017



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



# Caracterización funcional y análisis evolutivo de Prostaglandina Sintetasas de *Trypanosoma cruzi*

Tesis de Maestría

Florencia Díaz Viraqué

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas del PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas), como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magister en Ciencias Biológicas.

Director:

D.Sc. Prof. Carlos Robello

Director académico:

D.Sc. Prof. Carlos Robello

Montevideo – Uruguay

Marzo de 2017

Díaz Viraqué, Florencia

Caracterización funcional y análisis evolutivo de Prostaglandina Sintetasas de *Trypanosoma cruzi* / Florencia Díaz Viraqué. - Montevideo: Universidad de la República, Institut Pasteur de Montevideo, 2017.

IX, 88 p. 29, 7cm.

Director:

Carlos Robello

Director académico:

Carlos Robello

Tesis de Maestría – Universidad de la República, Programa en Biología de Pedeciba, sub-área Biología Celular y Molecular, 2017.

Referencias bibliográficas: p. 73 – 85.

1. Enfermedad de Chagas, 2. *Trypanosoma cruzi*,  
3. Prostaglandina Sintetasas, 4. PGF<sub>2</sub>α sintasa, 5. Aldo-Keto Reductases, 6. Old Yellow Enzymes. I. Robello, Carlos, . II. Universidad de la República, Programa de Posgrado en Biología de Pedeciba, sub-área Biología Celular y Molecular. III. Título.

## INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

---

D.Sc. Prof. José Tort

---

D.Sc Prof. Lucía Piacenza

---

D.Sc. Prof. Pablo Smircich

Montevideo – Uruguay  
Marzo de 2017

## RESUMEN

Este trabajo buscó ampliar el conocimiento sobre la biología del parásito *Trypanosoma cruzi* para determinar posibles mecanismos pueden ser blancos para el desarrollo de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas. El proyecto se enmarcó en el estudio de dos enzimas de *T. cruzi*, *TcOYE* y *TcAKR*, relacionadas con la síntesis de prostaglandinas, las cuales a su vez metabolizan los fármacos que se utilizan actualmente en dicha enfermedad. La síntesis de prostaglandinas por parte de *T. cruzi* en el contexto de la infección es un proceso que ha sido poco estudiado y que posiblemente esté relacionado con los mecanismos de infección y patogénesis. En este trabajo se estudió la localización subcelular de *TcOYE* y *TcAKR*, la expresión a lo largo del ciclo de vida y la expresión en diferentes cepas. Por otro lado, se sobreexpresaron ambas proteínas y con los parásitos sobreexpresantes se realizaron ensayos de infectividad, se evaluó la actividad  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa, se estudió la resistencia a fármacos tripanocidas así como a reactivos oxidantes y se realizaron estudios en modelo murino. Paralelamente, en este proyecto se realizó una búsqueda de todos los genes pertenecientes a las familias proteicas Old Yellow Enzyme y Aldo-Keto Reductasa en protozoo, bacterias y archaeas, con el fin de determinar la distribución en las diferentes especies y estudiar sus relaciones filogenéticas para dilucidar cuál fue el evento evolutivo que determinó la particularidad de que *TcOYE* catalice la síntesis de  $\text{PGF}_2\alpha$  en *T. cruzi*. Este abordaje implicó el desarrollo de un conjunto de *scripts* cuyo uso en forma secuencial permitió la identificación de todos los ortólogos de un gen determinado en un conjunto de genomas de interés. Palabras claves:

Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Prostaglandina Sintasa,  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa, Aldo-Keto Reductasa, Old Yellow Enzymes.

# Lista de siglas

Lista de siglas y abreviaturas

- AA** ácido araquidónico 8
- ADN** ácido desoxirribonucleico 23
- AKR** Aldo-Keto Reductasa 12
- BLAST** Basic Local Alignment and Search Tool 20
- BSA** seroalbúmina bovina 24
- Bzn** Benznidazol 1
- DMEM** Dulbecco's Modified Eagle's Medium 22
- DTT** Ditiotreititol 33
- KEGG** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 19
- LIT** medio líquido de infusión hepática y triptosa 22
- NCBI** National Center for Biotechnology Information 19
- Nfx** Nifurtimox 1
- OYE** Old Yellow Enzyme 15
- PBS** buffer salino de fosfato 22
- PDB** Protein Data Bank 17
- PGs** prostaglandinas 8
- SBF** Suero Bovino Fetal 22
- SDS** Dodecil sulfato de sodio 33
- SDS-PAGE** geles desnaturalizantes de poliacrilamida 24
- TEMED** N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina 33
- Tris** Tris (hidroximetil) aminometano 23
- dNTPs** 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato 31
- kDa** kilo Dalton 27
- p/v** peso en volumen 23
- v/v** volumen en volumen 25

# Tabla de contenidos

<b>Lista de siglas</b>	<b>VI</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Enfermedad de Chagas . . . . .	1
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	3
1.2.1 Ciclo de vida . . . . .	3
1.2.2 Organización celular y características subcelulares relevantes . . . . .	5
1.3 Prostaglandinas . . . . .	8
1.4 Prostaglandinas en tripanosomátidos . . . . .	11
1.5 Familia proteica AKR . . . . .	14
1.6 Familia proteica OYE . . . . .	15
<b>2 Hipótesis y Objetivos</b>	<b>17</b>
2.1 Hipótesis . . . . .	17
2.2 Objetivo general . . . . .	17
2.3 Objetivos específicos . . . . .	17
<b>3 Materiales y Métodos</b>	<b>19</b>
3.1 Búsqueda de homólogos de <i>TcOYE</i> y <i>TcAKR</i> en los genomas disponibles de la familia Trypanosomatidae . . . . .	19
3.1.1 Selección de los genomas para la búsqueda de homólogos . . . . .	19
3.1.2 Generación de bases de datos . . . . .	19
3.1.3 Búsqueda de homólogos . . . . .	20
3.2 Estudios filogenéticos . . . . .	20
3.3 Estudios estructurales . . . . .	21
3.4 Generación de un diagrama de flujo para análisis filogenéticos de un determinado gen de interés . . . . .	22
3.5 Parásitos y células . . . . .	22
3.5.1 Transfección y selección de epimastigotas . . . . .	23
3.6 Análisis de proteínas . . . . .	23
3.6.1 Extractos proteicos . . . . .	23

3.6.2	Cuantificación de proteínas . . . . .	24
3.6.3	Separación de proteínas mediante electroforesis en SDS-PAGE . . . . .	24
3.7	Técnicas inmunológicas . . . . .	25
3.7.1	Análisis de proteínas mediante western blot . . . . .	25
3.7.2	Inmunofluorescencia indirecta (IFI) . . . . .	26
3.7.3	Purificación de anticuerpos a partir del suero . . . . .	27
3.7.4	Inmunoprecipitación . . . . .	27
3.8	Ensayos de infección a células de mamífero . . . . .	28
3.9	Estudios de secreción . . . . .	29
3.9.1	Estudio del efecto de <i>Tc</i> OYE secretada en infectividad . . . . .	29
3.10	Fármacos y oxidantes . . . . .	30
3.11	Detección de PGF <sub>2</sub> α . . . . .	30
3.12	Ensayos <i>in vivo</i> . . . . .	31
3.12.1	Extracción de ADN a partir de tejido animal . . . . .	31
3.12.2	PCR cuantitativo . . . . .	31
3.12.3	ELISA . . . . .	32
3.13	Análisis estadísticos . . . . .	33
3.14	Microscopia de Epifluorescencia y Confocal . . . . .	33
3.15	Medios de cultivos y soluciones . . . . .	33
3.15.1	Cultivo celular . . . . .	33
3.15.2	Geles de acrilamida . . . . .	33
3.15.3	Western blot . . . . .	34
<b>4</b>	<b>Resultados, análisis y Discusión</b> . . . . .	<b>35</b>
4.1	Búsquedas <i>in silico</i> . . . . .	35
4.1.1	Genomas y bases de datos . . . . .	36
4.1.2	Identificación de homólogos . . . . .	38
4.1.3	Análisis filogenéticos de las secuencias OYE y AKR recuperadas de los genomas . . . . .	39
4.2	Análisis estructurales . . . . .	41
4.3	Análisis funcionales . . . . .	43
4.3.1	Expresión de <i>Tc</i> OYE y <i>Tc</i> AKR en <i>T. cruzi</i> . . . . .	43
4.3.2	Localización subcelular de <i>Tc</i> OYE y <i>Tc</i> AKR en <i>T. cruzi</i> . . . . .	46
4.3.3	Sobreexpresión de <i>Tc</i> OYE y <i>Tc</i> AKR y ensayos de infectividad . . . . .	51
4.3.4	Estudios de secreción de <i>Tc</i> OYE y <i>Tc</i> AKR . . . . .	54
4.3.5	Metabolismo de fármacos y oxidantes . . . . .	56
4.3.6	Producción de PGF <sub>2</sub> α . . . . .	57
4.3.7	Estudios en modelo murino . . . . .	58
4.3.8	ELISA con suero de pacientes . . . . .	60



4.4	Discusión . . . . .	61
5	Consideraciones finales	69
	Referencias bibliográficas	73
	Anexos	86

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis endémica del continente americano causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Fue descubierta en 1909 por el doctor Carlos Chagas quien describió las manifestaciones clínicas agudas, los principales reservorios, el agente etiológico y el mecanismo de infección (Chagas, 1909). Es una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes debido a su alta morbilidad y mortalidad, no solo en áreas endémicas, sino también en zonas no endémicas, a través del flujo de inmigrantes llevando a la globalización de esta patología (Nunes et al., 2013; Connors et al., 2016). Se estima que afecta alrededor de 6-8 millones de personas y el 13% de la población residente en América Latina es considerada en riesgo de infección (Lee et al., 2013; WHO et al., 2015).



**Figura 1.1: Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.** En rojo se indican las regiones donde la enfermedad es endémica y en rosado las regiones donde la enfermedad esta presente pero no es endémica. Imagen modificada de <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>.

A pesar de la alta incidencia en las regiones endémicas y de la diseminación de la enfermedad de Chagas, no existe a la fecha una vacuna contra *T. cruzi* y solo hay dos fármacos aprobados para el tratamiento que fueron desarrollados hace más de 40 años, Benznidazol (Bzn) y Nifurti-

mox (Nfx). Estos nitrocompuestos heterocíclicos presentan mayor efectividad en la fase aguda de la enfermedad, siendo menos efectivos en la fase crónica. A su vez, poseen efectos secundarios indeseables, mayor toxicidad en adultos, eficiencia variable, sumado a casos de resistencia desarrollada por el parásito (Bermudez et al., 2016; R Wilkinson et al., 2011; Bern, 2011). Por otro lado se requieren múltiples pruebas serológicas para diagnosticar un paciente y la falta de concordancia de estas pruebas conduce a un alto grado de incertidumbre con respecto al estado de la enfermedad (Tarleton, 2016; Moure et al., 2016; Tanowitz & Weiss, 2017). Por lo tanto, es de vital importancia el desarrollo de nuevos fármacos que mejoren el tratamiento de la enfermedad a través del estudio de nuevos blancos.

Dada la ausencia de una vacuna y un tratamiento efectivo para la enfermedad, el control de la transmisión depende de estrategias de control vectorial, evaluación serológica de muestras en bancos de sangres y educación de población en riesgo (Pinazo & Gascon, 2015; Rassi & de Rezende, 2012). Tradicionalmente *T. cruzi* es transmitido a seres humanos, animales silvestres y animales domésticos a través de la picadura del insecto vector triatomino infectado y transmisión congénita. Sin embargo, existen también otras formas de transmisión como transfusión sanguínea, transmisión oral por alimentos contaminados, trasplante de órganos y contaminación accidental en laboratorios donde se trabaja con el parásito o se manipulan muestras infectadas (Rueda et al., 2014; Nunes et al., 2013; Moncayo, 2003; Shewan et al., 2016).

La evolución de la enfermedad varía considerablemente entre individuos evidenciando la influencia de las diferencias genéticas del parásito y del hospedador en el desarrollo de la enfermedad. La tripanosomiasis americana se caracteriza por presentar dos fases, una fase aguda y una fase crónica. Durante la fase aguda el paciente presenta una elevada parasitemia y síntomas inespecíficos o ausencia de manifestaciones clínicas, lo que dificulta su detección. Las manifestaciones de la fase aguda se resuelven espontáneamente, incluso si la infección no es tratada con fármacos tripanocidas. En pocos casos esta etapa puede ser fatal pero la mayoría de los pacientes sobreviven y desarrollan la infección crónica. En la fase crónica la parasitemia disminuye a niveles indetectables y esta fase puede ser dividida en dos grandes grupos: la forma indeterminada de la enfermedad, la cual es asintomática; y la forma determinada, en la cual los pacientes presentan síntomas o anomalías. La forma indeterminada o latente se define por serología positiva y ausencia de signos o síntomas. Estos pacientes están infectados por *T. cruzi* pero no presentan alteraciones electrocardiográficas o radiológicas en corazón, esófago o colon. Mientras que la mayoría de los pacientes permanecen en esta fase de la enfermedad, alrededor del 40-50 % sufren una progresión clínica y desarrollan lesiones en diferentes órganos principalmente corazón, sistema digestivo o ambos (Bermudez et al., 2016; Rassi Jr et al., 2015).

La cardiomiopatía chagásica es la manifestación más severa y frecuente de la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Puede presentarse como insuficiencia cardíaca, trastornos en el ritmo

cardíaco o cardiomegalia. Estas complicaciones cardíacas ocurren generalmente en combinación, lo que aumenta la complejidad de la afección. La prevalencia de megaesófago y megacolon varía entre los países de acuerdo con la cepa del parásito, pero es mucho menor que la cardiomiopatía (Ribeiro et al., 2012; Benziger et al., 2017).

## 1.2. *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* presenta la siguiente ubicación taxonómica: Eukarya, Protista, Excavata, Discoba, Discricristata, Euglenozoa, Kinetoplastea, Tripanosomatida, Trypanosomatidae, *Trypanosoma*, *cruzi*. Es un parásito unicelular flagelado digenético<sup>1</sup> perteneciente a la familia Trypanosomatidae. En el sistema taxonómico actual la familia Trypanosomatidae contiene tres subfamilias descritas (figura 1.2): Leishmaniinae, compuesta por un género digenético (*Leishmania*) y tres monogenéticos<sup>2</sup> (*Crithidia*, *Leptomonas* y *Lotmaria*); Strigomonadinae que contiene tres géneros monogenéticos (*Angomonas*, *Kentomonas*, y *Strigomonas*); y Blechomonadinae que aloja el género monogenético *Blechomonas*. Por fuera de estos tres grupos existen otros géneros: *Trypanosoma*, *Phytomonas*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Sergeia*, *Paratrypanosoma* y *Wallacemonas*. (Votýpka et al., 2015; Lukeš et al., 2014)

### 1.2.1. Ciclo de vida

El parásito tiene un ciclo de vida complejo, alterna entre hospederos invertebrados y vertebrados, infecta diferentes especies, se encuentra en el torrente sanguíneo así como dentro de las células del hospedero e invade una gran variedad de tipos celulares. Para adaptarse a las diferentes situaciones adopta diferentes formas evolutivas: tripomastigota metacíclico, tripomastigota sanguíneo, amastigota y epimastigota. En el hospedero mamífero se encuentran las formas tripomastigota sanguíneo y amastigota, mientras que las otras dos se encuentran en el insecto vector. Las formas epimastigota y amastigota son replicativas (la segunda intracelular) mientras que los tripomastigotas no son replicativos y pueden infectar células activamente.

Los tripomastigotas metacíclicos contenidos en el intestino del insecto vector se depositan junto a las heces cerca de la herida ocasionada por el hematófago. Una vez en el hospedero son capaces de invadir células en el sitio de inoculación. Dentro de la célula se forma una vacuola conocida como vacuola parasitófora donde el parásito se diferencia al amastigota y luego la lisa para replicarse en el citoplasma celular. Cuando el número de parásitos es elevado se diferencian en tripomastigotas que finalmente se liberan al torrente sanguíneo para volver a infectar otras células. El ciclo se completa cuando un insecto vector se alimenta de un vertebrado infectado

---

<sup>1</sup>Parásito cuyo ciclo de vida alterna entre dos hospedadores de diferentes especies; por ejemplo transmisión entre vertebrados mediada por insectos.

<sup>2</sup>Parásito que se restringe a un solo hospedador (invertebrado o vertebrado) durante su ciclo de vida.

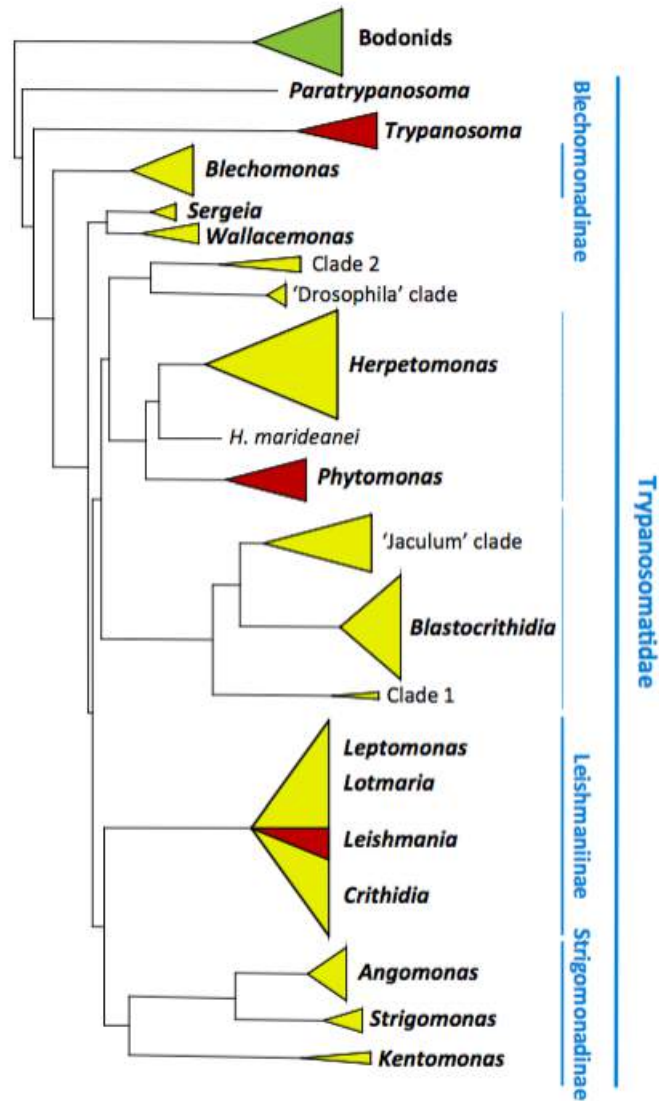
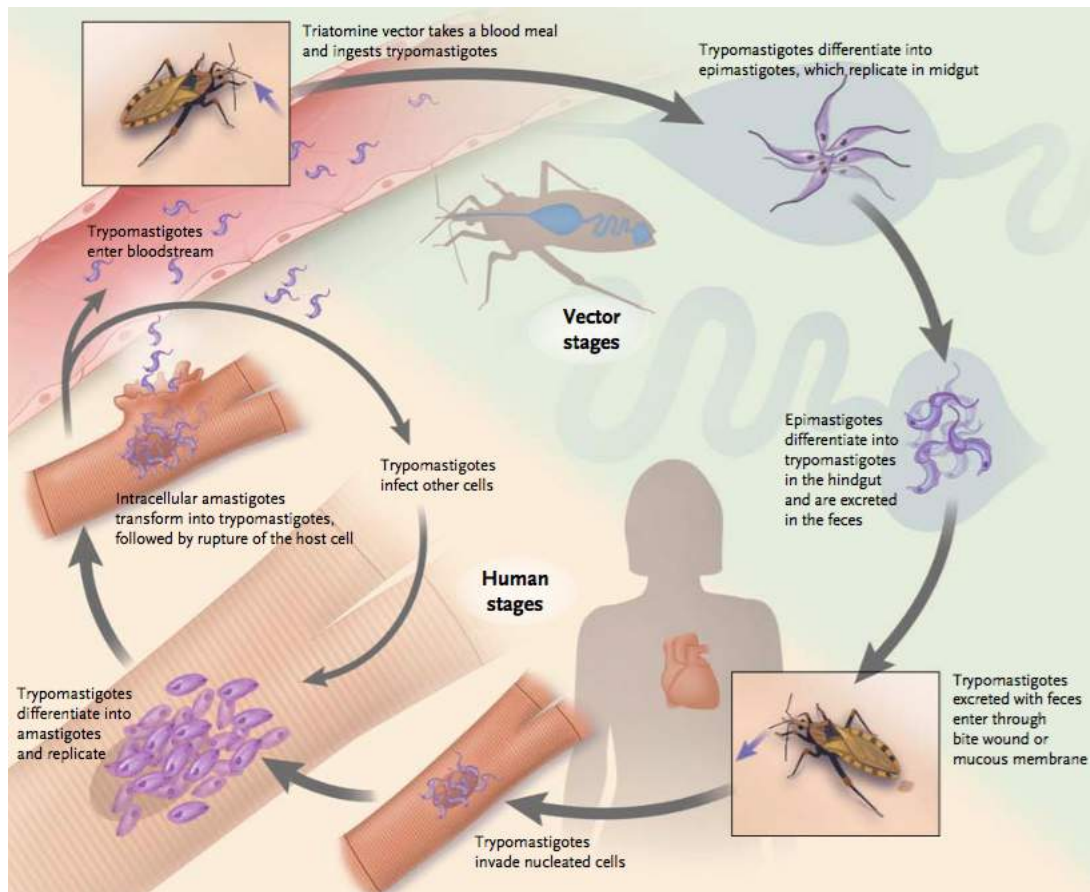


Figura 1.2: Árbol filogenético Bayesiano que demuestra relaciones evolutivas entre tripanosomátidos basados en secuencias de la subunidad pequeña del rARN. En amarillo se representan los parásitos monogenéticos y rojo los digenéticos. El color verde representa las especies de bodonidos usadas como grupo externo. Extraído de Votýpka et al. (2015).

con la forma tripomastigota circulando en el torrente sanguíneo. Una vez ingeridos, la mayoría de los tripomastigotas se lisan en el estómago del insecto. Los tripomastigotas supervivientes se transforman en epimastigotas y migran al intestino donde se dividen intensamente. Por último, se convierten en la forma infectiva tripomastigota metacíclico al final del tracto intestinal para volver a comenzar un nuevo ciclo de vida (Dias, 2017; de Souza et al., 2010). En la figura 1.3 se esquematiza el ciclo de vida.

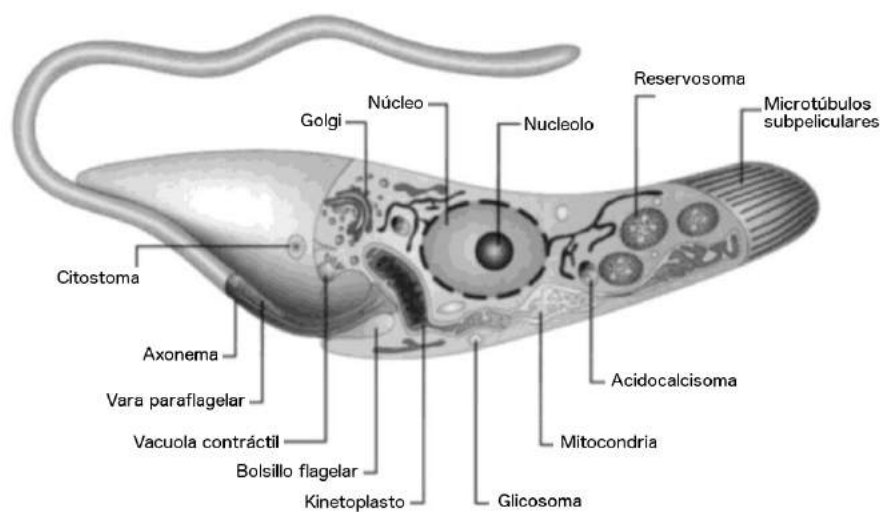


**Figura 1.3: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** El parásito se replica en el intestino del insecto vector y permanece en el intestino anterior antes de infectar al hospedador vertebrado. Una vez en este oscila entre dos formas, la forma replicativa intracelular y la forma sanguínea infectado a más células de hospedador. Extraído de Bern (2015).

### 1.2.2. Organización celular y características subcelulares relevantes

Los parásitos protozoarios de la familia Trypanosomatidae son células eucariotas que comparten muchos organelos con las células del hospedero mamífero. Sin embargo, también tienen organelos exclusivos que están ausentes en otros organismos eucariotas o tienen diferentes características. Éstos tienen particular interés como nuevos blancos quimioterapéuticos para el desarrollo de fármacos más selectivos y menos tóxicos. En esta sección se describen las principales características exclusivas de tripanosomátidos.

Todos los tripanosomátidos presentan un flagelo que emerge de un área de invaginación de la membrana llamada bolsillo flagelar, la cual se localiza en el extremo posterior de la célula en relación a la dirección del movimiento (figura 1.4). El bolsillo flagelar es un importante sitio de endocitosis y exocitosis en los tripanosomátidos. Además de los microtúbulos en la configuración clásica 9 + 2, el flagelo contiene una estructura compleja llamada vara paraflagelar que es esencial para la estructura del flagelo y la motilidad (Portman & Gull, 2010). En la forma amastigota el flagelo es muy corto y muchas veces permanece en el interior del bolsillo flagelar. La forma del parásito es mantenida por microtúbulos que giran en espiral alrededor del parásito. (de Souza, 2008; Rodrigues et al., 2014)



**Figura 1.4: Epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.** Vista esquemática de la forma epimastigota de *T. cruzi*. Modificado de Souza (2008).

*T. cruzi* posee un único núcleo. La tinción con intercalantes de ADN revelan un núcleo diploide aunque también se han visto aneuploidias (McCulloch & Navarro, 2016). En epimastigotas y amastigotas el núcleo es ligeramente esférico, mientras que en tripomastigotas es alargado y se localiza en el centro de la célula (Elias et al., 2001).

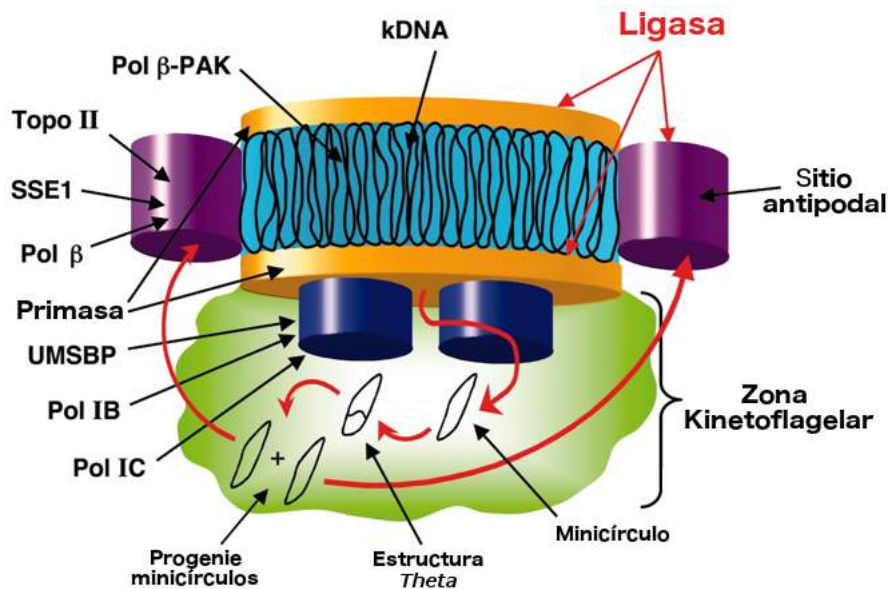
Los glicosomas son organelos electrón densos rodeados de membrana que se encuentran en parásitos protozoarios del orden Kinetoplastida. Participan en varias funciones como el metabolismo de carbohidratos, rescate de purinas, biosíntesis de pirimidinas y metabolismo de las especies reactivas del oxígeno (Oppendoes, 1987). Otra estructura celular importante en el metabolismo son los acidocalcisomas. Estos son organelos con características particulares como pH ácido, ricos en calcio, polifosfatos y otros iones. Posee bombas, canales y transportadores de iones que contribuyen a cumplir su función que es mantener la homeostasis intracelular. Este organelo es reservorio de cationes, mantiene la homeostasis del calcio, regula el pH intracelular y funciona como osmoregulador (Moreno & Docampo, 2003; Docampo et al., 2010).

Las formas epimastigota y amastigota presentan una invaginación profunda de la membrana plasmática en forma de embudo extendiéndose a una región próxima al núcleo y formando una estructura denominada complejo citostoma-citofaringe. Este complejo desempeña un rol importante en la endocitosis. Al penetrar en la abertura del citostoma, las moléculas siguen por la citofaringe donde son internalizadas en vesículas endocíticas que se unirán con una red de túbulos y vesículas (De Souza, 2002). Los reservosomas también son organelos de la vía endocítica. Están delimitados por membrana y son el destino de macromoléculas endocitadas constituyendo un lugar de reserva de lípidos, proteínas y proteasas (Cunha-e Silva et al., 2006).

La vacuola contráctil está localizada en estrecha asociación con el bolsillo flagelar. Tiene la función de osmoregulación (contiene acuaporinas y se asocia al acidocalcisoma). Presenta varias proteínas que están involucradas en muchos procesos celulares como metabolismo de proteínas y aminoácidos, metabolismo energético, metabolismo de fosfato y calcio, estructura y organización celular, transporte de proteínas, tráfico intracelular, entre otros. La presencia de este organelo es esencial para una rápida adaptación a las diferencias en la presión osmótica (Montalvetti et al., 2004; Rohloff et al., 2004).

*T. cruzi* al igual que el resto de los tripanosomátidos presenta una mitocondria única y ramificada en todo el citoplasma del parásito. El ADN mitocondrial (kADN) se organiza en maxicírculos y minicírculos que se asocian en forma concatenada en una determinada región de la mitocondria llamada kinetoplasto (figura 1.5). Esta región especializada de la matriz mitocondrial se ubica adyacente al cuerpo basal flagelar. Los maxicírculos son similares al ADN mitocondrial de eucariotas superiores y codifican para el ARN ribosomal y algunas proteínas mitocondriales. Por el contrario, los minicírculos codifican para ARN guías que participan en la transcripción de los maxicírculos en un proceso llamado edición del ARN (Clayton, 2016; Jensen & Englund, 2012). El metabolismo mitocondrial presenta diferencias entre epimastigotas y tripomastigotas sanguíneos. Los tripomastigotas presentan mayor actividad de los complejos II y III de la cadena respiratoria (lo cual facilita la entrada de electrones) pero menor actividad del complejo IV, restringiendo el transporte de los electrones a su destino final. Como consecuencia aumenta la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este mecanismo le confiere protección al parásito al acondicionarlo contra la explosión oxidativa inducida por la activación del sistema inmune del hospedero (Gonçalves et al., 2011). El kinetoplasto cuenta con proteínas que contribuyen a la condensación y replicación del ADN mitocondrial. Por microscopía electrónica de transmisión se reveló que el kADN está conectado a la membrana mitocondrial y al cuerpo basal por filamentos citoplasmáticos. Esta vinculación es responsable de la colocación del genoma mitocondrial y su correcta segregación durante la división celular (Jensen & Englund, 2012).





**Figura 1.5: Estructura del kinetoplasto en tripanosomátidos.** Vista esquemática del kinetoplasto, estructura intramitocondrial que contiene el ADN y se encuentra localizada debajo del cuerpo basal. Modificado de Klingbeil & Englund (2004).

### 1.3. Prostaglandinas

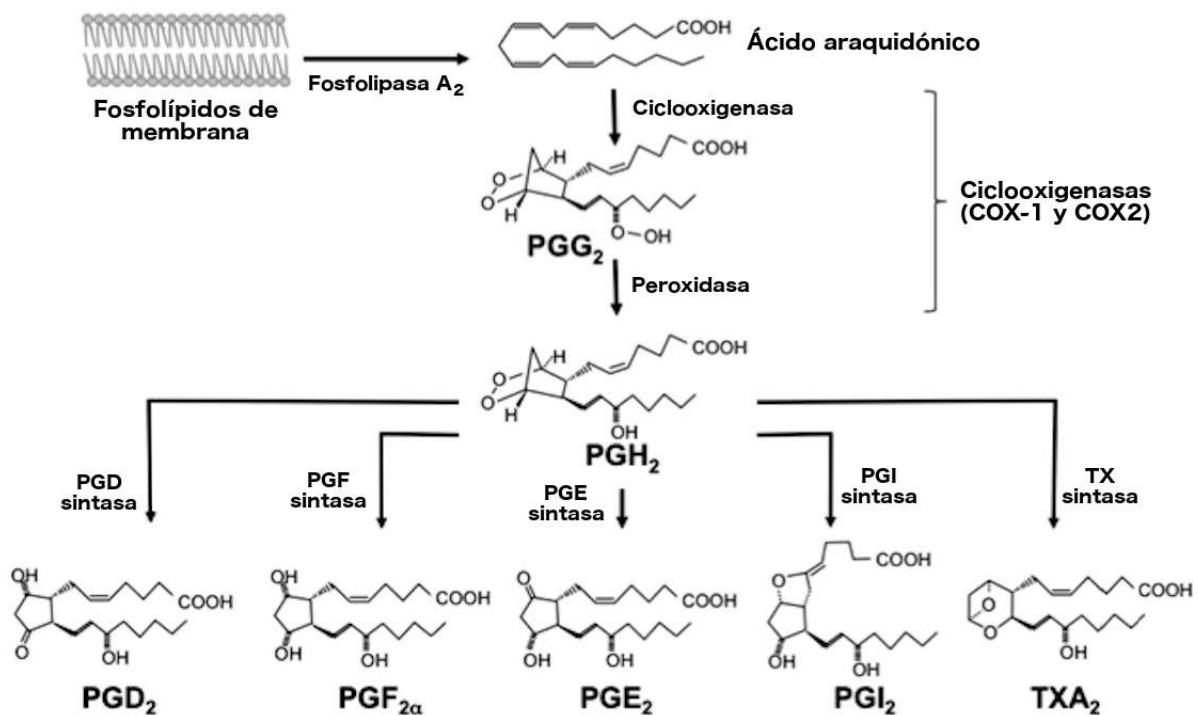
En este trabajo se estudiaron dos proteínas de *T. cruzi* relacionadas con la actividad enzimática prostaglandina  $F_2\alpha$  sintasa. La producción de prostaglandinas por parte del parásito durante la infección es un proceso que ha sido poco estudiado. Estudios en otras especies de la familia Trypanosomatidae dan indicios de que estas proteínas posiblemente estén relacionadas con el proceso de infección y patogénesis de *T. cruzi*. (Figarella et al., 2006; Kabututu et al., 2002)

Las prostaglandinas (PGs) son mediadores lipídicos autócrinos y parácrinos que modulan diversas respuestas fisiológicas y fisiopatológicas en mamíferos (Hirata & Narumiya, 2012; Yagami et al., 2016). La oxigenación de varios ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos en casi todos los tipos de células da lugar a la formación de varias clases de productos bioactivos denominados eicosanoides. Estos incluyen prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas. Las prostaglandinas y los tromboxanos, denominados colectivamente prostanoides, derivan del ácido araquidónico (AA), un ácido graso insaturado de 20 carbonos (Zurier, 2014; Ricciotti & FitzGerald, 2011).

Existen cuatro prostaglandinas principales: prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), prostaciclina ( $PGI_2$ ), prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ) y prostaglandina  $F_2\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ ). Se producen de forma ubicua (generalmente cada tipo de célula genera uno o dos PGs dominantes) y durante una respuesta inflamatoria, tanto el nivel como el perfil de la producción de prostaglandinas cambian drásticamente. La producción de prostaglandinas aumenta inmediatamente en la inflamación aguda y

cumplen un papel muy importante en el reclutamiento de leucocitos necesarios para la defensa del hospedero (Serhan et al., 2015; Ricciotti & FitzGerald, 2011). Sin embargo, la comprensión de las funciones fisiológicas de estos lípidos es compleja por los diferentes efectos que tienen en los diferentes tejidos (Dennis & Norris, 2015).

La biosíntesis de las prostaglandinas requiere que el AA sea liberado de su forma esterificada. El AA se encuentra esterificado en la posición sn2 de glicerofosfolípidos en membranas lipídicas y su disponibilidad limita la formación de prostanoides, siendo el principal punto de regulación. La cantidad de prostanoides incrementa cuando la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aumenta en respuesta a una activación celular mediada por diferentes factores como citoquinas pro inflamatorias, factores de crecimiento, trauma, infección e inflamación. Las fosfolipasas A<sub>2</sub> catalizan la hidrólisis de glicerofosfolípidos tanto en condiciones fisiológicas como después de la activación de las células, mediante la acción de una PLA<sub>2</sub> dependiente de calcio. (Smith et al., 2011; Dennis & Norris, 2015; Blanco et al., 2016). En la figura 1.6 se esquematiza la biosíntesis de prostanoides en mamíferos.



**Figura 1.6: Biosíntesis de prostanoides.** Los prostanoides son una subclase de eicosanoides derivados del AA, el cual es liberado de las membranas fosfolipídicas por acción de la PLA<sub>2</sub> y es convertido en PGH<sub>2</sub> vía un intermediario peróxido estable por ciclooxygenasas. Luego se generan los prostanoides por acción de las respectivas sintasas. Modificado de Kawahara et al. (2015).

El primer paso comprometido en la biosíntesis de prostanoides es catalizado por las prostaglandina endoperóxido sintasas (PHG-1 y PHG-2) también conocidas como ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2). Estas enzimas bifuncionales convierten el AA en prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>)

a través de la actividad ciclooxygenasa seguido por la síntesis de prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ) con la actividad peroxidasa. La isoforma COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de las células mientras que la COX-2 se induce frente a un estímulo inflamatorio, hormonal u otro. Sin embargo ambas contribuyen a la síntesis de prostanoides durante la inflamación (Blanco et al., 2016; Ricciotti & FitzGerald, 2011).

La conversión del intermediario endoperóxido  $PGH_2$  en los diferentes prostanoides requiere de la actividad de las respectivas sintasas. Tres  $PGE_2$  sintasas (PGES), una citosólica (cPGES) y dos PGES asociadas a membrana (mPGES-1 y el mPGES-2), producen  $PGE_2$  usando  $PGH_2$  como sustrato. La  $PGE_2$  es la PG más abundante en humanos y es la más caracterizada en animales. En condiciones fisiológicas es un mediador importante de muchas funciones biológicas, tales como la regulación de la respuesta inmune, la presión arterial, la integridad gastrointestinal y la fertilidad. La prostaciclina  $PGI_2$  es producida por la  $PGI_2$  sintasa (PGIS) y es el prostanoides más importante en la regulación de la homeostasis cardiovascular. Se produce en las células del endotelio vascular y en células de músculo liso cardíaco. La PGIS es miembro de la superfamilia citocromo P450 y se localiza en el retículo endoplasmático. Por otro lado,  $PGD_2$  se sintetiza en el sistema nervioso central y en células como mastocitos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos Th2. Es relevante en reacciones de hipersensibilidad e inflamatorias y está implicada en la agregación plaquetaria, la contracción del músculo liso, quimotaxis de células del sistema inmune y la regulación de los ciclos de sueño-vigilia. Es sintetizada por dos enzimas, una de origen hematopoyético (H-PGDS) y otra que se expresa en los tejidos cerebrales (L-PGDS). El tromboxano  $TXA_2$  es un mediador importante de la agregación plaquetaria y la activación de la respuesta inflamatoria endotelial que desencadena en vasoconstricción. A su vez, esta asociado a diversos procesos patológicos cardiovasculares. Es sintetizado por la  $TXA_2$  sintasa y tiene una vida media muy corta por lo que su acción se restringe a microambientes. Luego de su síntesis todas las PGs actúan alocadamente mediante la unión a sus respectivos receptores específicos. (Blanco et al., 2016; Ricciotti & FitzGerald, 2011; Smith et al., 2011)

La síntesis de  $PGF_2\alpha$  requiere la reducción del precursor mediante la transferencia dos electrones. Hay dos maneras posibles de sintetizar  $PGF_2\alpha$ , mediante la reducción del grupo 9,11-endoperóxido de  $PGH_2$  o mediante la reducción del grupo 9-keto de  $PGE_2$ . Adicionalmente, la reducción del grupo 11-keto de  $PGD_2$  conduce a la formación de un estereoisómero de  $PGF_2\alpha$  ( $9\alpha,11\beta$ - $PGF_2$ ) (Figura 1.7). Ambos epímeros tienen actividad biológica y se encuentran en fluidos corporales (Liston & Roberts, 1985). La  $PGF_2\alpha$  sintasa ( $PGH_2$  9,11-endoperóxido reductasa, PGFS) es la encargada de la conversión de  $PGH_2$  a  $PGF_2\alpha$ , mientras que las enzimas  $PGE_2$  9-ketoreductasa y  $PGD_2$  11-ketoreductasa son responsables de la reducción de  $PGE_2$  a  $PGF_2\alpha$  y de  $PGD_2$  al isómero  $9\alpha,11\beta$ - $PGF_2$ , respectivamente. La  $PGF_2\alpha$  está implicada en la reproducción estimulando la ovulación, la luteólisis, la contracción del músculo liso uterino y la iniciación del parto. También desempeña un papel importante en la función renal, contracción

de las arterias, disfunción miocárdica, lesión cerebral y dolor. Esta PG media sus efectos a través de receptores FP (Receptor de prostaglandina F) acoplados a proteína G, que activa la fosfolipasa C y conduce a un aumento del calcio intracelular y la activación de PKC. (Ricciotti & FitzGerald, 2011; Smith et al., 1991, 2011; Kawahara et al., 2015)

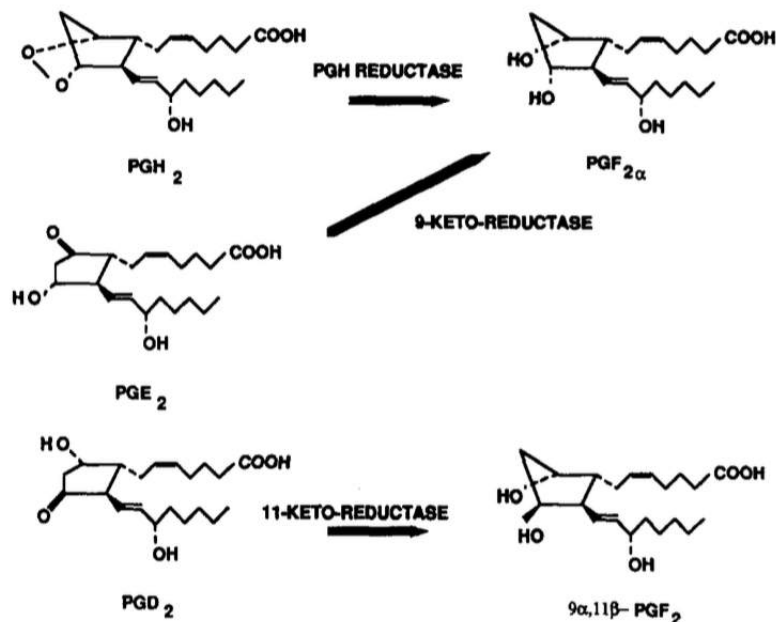


Figura 1.7: Síntesis de diferentes isómeros de PGF. Extraído de Smith et al. (1991)

## 1.4. Prostaglandinas en tripanosomátidos

La fase aguda de la infección por *T. cruzi* se caracteriza por inmunosupresión mediada por prostaglandinas y citoquinas (Michelin et al., 2005; Pinge-Filho et al., 1999). En particular aumentan los niveles de PGF<sub>2α</sub>, TXA<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> en ratones infectados (Cardoni & Antúnez, 2004; Pinge-Filho et al., 1999), siendo TXA<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> los principales lípidos bioactivos derivados de AA circulantes (Ashton et al., 2007).

Ha sido propuesto que *T. cruzi* utiliza las prostaglandinas como un mecanismo de persistencia (Nagajyothi et al., 2012) al actuar como inmunomoduladores en la fase aguda de la infección a favor de la progresión al estado crónico de la enfermedad (Mukherjee et al., 2011). En este sentido, los eicosanoides producidos pueden contribuir a la proliferación y diferenciación del parásito, la fagocitosis y la supervivencia del hospedero (Freire-de Lima et al., 2000; Ashton et al., 2007; Mukherjee et al., 2011).

A pesar que el metabolismo del AA está bien descrito en células de mamíferos, las vías metabólicas por las cuales el parásito produce prostaglandinas no están tan claras. Si bien se han caracterizado varias enzimas implicadas en el metabolismo del AA y en la producción de PGs

en tripanosomátidos, la vía de síntesis parece estar incompleta. Se han descrito las actividades enzimáticas PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub> y PGFS en *T. cruzi* (Bertello et al., 2000; Connelly & Kierszenbaum, 1984; Kubata et al., 2002b), *T. brucei* (Oppendoes & Van Roy, 1982; Eintracht et al., 1998; Kubata et al., 2000) y *Leishmania* (Belaunzarán et al., 2010; Smith et al., 1997; Kabututu et al., 2002). Por otro lado, se identificó la formación enzimática de TXA<sub>2</sub> en *T. cruzi* (Ashton et al., 2007) y de PGD<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> en *T. brucei* (Kubata et al., 2002a). Una particularidad es que parece no haber una enzima COX clásica implicada en la vía de síntesis de eicosanoides en los tripanosomátidos. Búsquedas bioinformáticas en varios genomas de hongos y parásitos no han revelado genes con identidad de secuencia significativa con las ciclooxigenasas de mamíferos (Noverr et al., 2003; Kubata et al., 2007).

La enzima *TbPGFS* ha sido muy estudiada y corresponde a una PGH 9,11-endoperóxido reductasa de la cual se conoce su estructura tridimensional (Okano et al., 2002; Kilunga et al., 2005). Al igual que la mayoría de las PGFS identificadas a la fecha es miembro de la familia proteica Aldo-Keto Reductasa (AKR). Sin embargo posee limitada identidad de secuencia con PGFS de otros mamíferos, plantas, hongos y procariotas (Kubata et al., 2000). Las PGFS caracterizadas en *L. major*, *L. tropica* y *L. donovani* también corresponden a 9,11-endoperóxido reductasas y tienen muy alta identidad aminoacídica entre ellas. La PGFS de *L. major* tiene localización citoplasmática al igual que *TbPGFS* y comparten un 61 % de identidad. Las tres PGFS caracterizadas en *Leishmania* corresponden a la superfamilia aldo-ceto reductasa, sin embargo no fue detectada ninguna proteína de esta familia en *L. mexicana* y *L. amazonensis* (especies de *Leishmania* del nuevo mundo) (Kabututu et al., 2002; Majanja et al., 2014).

En *T. cruzi*, donde la síntesis de prostaglandinas es relevante en el establecimiento de la infección, inmunomodulación y patogénesis (Gomes et al., 2014; Sharma et al., 2013), dos enzimas han sido asociadas a la síntesis de PGF<sub>2</sub>α: una con homología a las Old Yellow Enzymes de bacterias y levaduras (*TcOYE*) (Kubata et al., 2002b), y una segunda perteneciente a la familia de las aldo-ceto reductasas (*TcAKR*) (Garavaglia et al., 2010). *TcOYE* es una flavoproteína NAD(P)H oxidoreductasa que contiene FMN como grupo prostético y presenta actividad PGF<sub>2</sub>α sintasa y, si bien para *TcAKR* no se ha demostrado esta actividad, sí ha sido descrita por su homóloga en *T. brucei* (Kubata et al., 2000).

*TcOYE* es capaz de reducir 9,11-endoperóxido PGH<sub>2</sub> a PGF<sub>2</sub>α tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas pero no PGD<sub>2</sub> o PGE<sub>2</sub>, siendo exclusivamente 9,11-endoperóxido reductasa. Por otro lado, su versatilidad catalítica le permite reducir peróxidos (peróxido de hidrógeno y *t*-butil hidropéroxido) así como drogas tripanocidas tales como naftoquinonas, nitrocompuestos heterocíclicos y komaroviquinona (Kubata et al., 2002b; Uchiyama et al., 2005). Si bien se determinó que puede reducir Nfx en condiciones anaeróbicas y no así Bzn (Kubata et al., 2002b), la delección de copias del gen así como la disminución de transcritos ha sido asociada

a resistencia a Bzn adquirida *in vitro* en cepas de *T. cruzi* (Murta et al., 2006). De la misma manera, un aumento a nivel proteico fue asociado al fenotipo sensible en un estudio proteómico comparativo de cepas sensibles y resistentes a Bzn (Andrade et al., 2008). Se conoce la estructura de *TcOYE* con algunos de sus sustratos e inhibidores (Sugiyama et al., 2007; Yamaguchi et al., 2011; Okamoto et al., 2011; Murakami et al., 2013). Okamoto y colaboradores realizaron el estudio cristalográfico de rayos X de *TcOYE* con algunos de sus sustratos. En su publicación del año 2011 se presentó la estructura del complejo ternario de *TcOYE*/FMN/p-HBA con una resolución de 2,05 Å. El p-hidroxibenzaldehído (p-HBA) es uno de los sustratos de *TcOYE* y participa en una interacción de transferencia de carga para muchas enzimas de la familia OYE. La estructura muestra el sorprendente movimiento de un bucle que abarca el sitio activo después de la unión de p-HBA y revela el mecanismo de reconocimiento para una variedad de compuestos. Murakami y colaboradores realizaron cristalografía de rayos X, ultracentrifugación analítica y dinámica molecular. En este trabajo proporcionaron una descripción detallada de la estructura a partir de una resolución de 1,27 Å, y aportaron información sobre la especificidad y el comportamiento hidrodinámico. Definieron el sitio activo de la enzima como una cavidad positiva donde se une el grupo prostético FMN. Además, propusieron que *TcOYE* se comporta como un monómero en solución y que la proteína tiene cierta flexibilidad intrínseca, acorde con lo descrito por Okamoto y colaboradores.

Por su parte, *TcAKR* es una aldo-ceto reductasa dependiente de NADPH que posee homología con la PGFS de *T. brucei*. Sin embargo, Garavaglia y colaboradores postularon que no se trata de una PGFS ya que su actividad como tal no ha podido ser demostrada en *T. cruzi* (Garavaglia et al., 2010). Esta enzima también es responsable de la metabolización de fármacos en *T. cruzi*, en particular *o*-naftoquinonas con la concomitante generación de radicales libres, y Bzn. En nuestro grupo se identificó a *TcAKR* en un estudio de proteómica unida a un derivado de Bzn (Trochine et al., 2014a) y la sobreexpresión en epimastigotas permitió que los parásitos fueran más resistentes a este fármaco (Garavaglia et al., 2016). Nfx, PGH<sub>2</sub> y *p*-naftoquinonas no demostraron ser un sustratos de *TcAKR*. Esta enzima presenta localización citoplasmática y se conoce su estructura tridimensional (Garavaglia et al., 2010, 2016; Moen et al., 2015). Moen y colaboradores determinaron la estructura junto con la estructura de la PGFS de *L. major* con una resolución de 2,6 Å y 1,6 Å, respectivamente. Ambas presentan el dominio estructural clásico de oxidoreducetasas (“NADP-binding Rossmann-fold”) y tienen un movimiento significativo entre la apoenzima y la holoenzima en el mismo *loop* que es estabilizado por la interacción con el cofactor NADP<sup>+</sup> al igual que en la estructura de la PGFS humana (Moen et al., 2015).

Cabe señalar que si bien se sabe que ambas enzimas median la metabolización de fármacos en *T. cruzi*, no hay reportes hasta la fecha de su implicancia biológica. Resulta interesante el hecho de que *TcOYE* es una enzima exclusiva de *T. cruzi*, y no esta presente en el resto de

los tripanosomátidos; mientras que *TcAKR* presenta homólogos en todos los tripanosomátidos (Kubata et al., 2007). Esta particularidad única de *T. cruzi* le confiere un interés particular. Por su parte, la presencia de un enzima PGF sintasa identificable en todos los tripanosomátidos, siendo la única a la fecha, indica que es un enzima importante para estos parásitos. Asimismo, la síntesis de PGFS no se ve afectada por drogas anti inflamatorias no esteroideas (NSAIDS) como aspirina e indometacina (Kubata et al., 2000; Kabututu et al., 2002; Kubata et al., 2002b) comúnmente usadas como inhibidores de la actividad ciclooxigenasa en mamíferos. Esto evidencia que la vía de síntesis de eicosanoides en estos parásitos es diferente.

## 1.5. Familia proteica AKR

La mayor parte de las PGFS caracterizadas a fecha pertenecen a la superfamilia Aldo-Keto Reductasa (Kabututu et al., 2009). Las AKRs forman una superfamilia de proteínas caracterizadas por una estructura tridimensional en común y un mecanismo de reacción que comprende la oxidoreducción de grupos carbonilos dependiente de NAD(P)H. Catalizan la reducción de aldehídos, cetonas, monosacáridos y prostaglandinas, entre otros y están ampliamente distribuidas, se encuentran en vertebrados, invertebrados, plantas, protozoos, hongos, eubacterias y arqueobacterias (Penning, 2015; Jez & Penning, 2001)

Todas las proteínas de esta familia proteica tienen la conformación estructural barril triosafosfato isomerasa (TIM) o  $(\alpha/\beta)_8$ -barril que corresponde a ocho hélices  $\alpha$  antiparalelas a ocho hojas  $\beta$  centrales con la inserción de varias hélices adicionales. En la parte C-terminal hay tres *loops* que definen la especificidad del sustrato. Alineamientos de secuencias y comparaciones estructurales identifican un dominio de unión al cofactor común y una tetraedra catalítica conservada conformada por tirosina, lisina, histidina, aspartato. Las regiones que corresponden a los componentes de la estructura de barril no presentan *gaps* importantes en los alineamientos múltiples de secuencia. Los *gaps* más grandes aparecen en los *loops* del lado C-terminal del barril. De esta forma las AKRs mantienen conservada la estructura del barril mientras que adaptan la especificidad del sustrato a través de la modificación de los *loops* cerca del sitio activo (Jez et al., 1997; Penning, 2015; Sanli et al., 2003).

La superfamilia contiene 190 proteínas anotadas que se clasifican en 16 familias. Las familias a su vez se dividen en subfamilias y se definen por identidad de secuencia aminoacídica. Los miembros dentro de una familia tienen menos de 40% de identidad de secuencia con los miembros de otras familias y los miembros dentro de una subfamilia tienen una identidad de secuencia superior al 60%. Se estableció un sistema de nomenclatura que determina que el nombre debe empezar con “AKR”, seguido de un número que indica la familia, una letra que describe la subfamilia y un número que designa la secuencia única de la proteína (Hyndman et al., 2003; Mindnich & Penning, 2009; Penning, 2015)

En los mamíferos se identificaron proteínas de las subfamilias AKR1C (AKR1C3 humana) y AKR1B (AKR1B1 humana, AKR1B3 de ratón y AKR1B5 de bovino) con actividad PGFS. La PGFS caracterizada por Kubata y colaboradores en *T. brucei* fue designada como AKR5A2 y la de leishmanias del viejo mundo como AKR5A1 (Kabutu et al., 2009; Watanabe, 2011). La mayoría de las AKR conocidas son monómeros. Sin embargo, en los últimos años se han incluido proteínas multiméricas en las familias AKR2, AKR6 y AKR7.

## 1.6. Familia proteica OYE

La primer proteína OYE descrita fue aislada de levaduras por Warburg & Christian (1932). La familia proteica Old Yellow Enzyme (OYE) (EC 1.6.99.1) esta compuesta por oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H que contienen un mononucleótido de flavina (FMN) unido no covalentemente como cofactor. Se encuentran en bacterias, plantas, hongos y protozoos y son capaces de reducir estereoselectivamente varios compuestos como nitroésteres, compuestos nitroaromáticos y compuestos  $\alpha, \beta$ -insaturados. Estas proteínas aceptan un gran variedad de grupos funcionales activados como sustratos incluyendo cetonas, aldehídos, nitrilo, imida, nitro, ácidos carboxílicos, lactonas y ésteres carboxílicos (Hall & Bommarius, 2011; Williams & Bruce, 2002).

Toogood y colaboradores definieron como homólogos OYE aquellas enzimas que muestran una identidad de secuencia aminoacídica significativa y/o homología estructural con miembros OYE conocidos; y además catalizan la reducción dependiente de NAD(P)H de sustratos alqueno activados. Presentan diferentes estados de oligomerización, se han descrito monómeros, dímeros, tetrameros y octámeros o dodecámeros en una OYE termoestable. Todos los homólogos OYE monoméricos se pliegan adoptando un forma de barril  $(\alpha, \beta)_8$  (barril TIM) con elementos de estructura secundaria adicionales. Las diferencias más significativas entre las estructuras OYE se observan en los *loops* más superficiales. La reacción catalítica tiene lugar en dos etapas: primero ocurre la oxidación de NAD(P)H por la transferencia de un hidruro al cofactor FMN, luego se reduce el sustrato por la transferencia de dos hidrógenos desde la flavina reducida. Estos pasos se realizan mediante un mecanismo de bi-bi ping-pong donde los sustratos reductivos y oxidativos se unen dentro del mismo sitio activo. (Toogood et al., 2010; Williams & Bruce, 2002)

Debido a la diversidad de enzimas que pertenecen a la familia OYE no se les ha atribuido ningún rol fisiológico conservado. Cumplen diversas funciones en diferentes organismos asociadas a detoxificación, respuesta al estrés oxidativo, vías metabólicas específicas como la biosíntesis de alcaloides ergot, metabolismo aerobio del antranilato y la biosíntesis de prostaglandina  $F_2\alpha$  (*T. cruzi*). Las proteínas OYE de plantas han sido implicados en la biosíntesis



de la hormona vegetal ácido jasmónico, destoxificación de los lípidos oxigenados y metabolismo de los compuestos de carbonilo  $\alpha, \beta$ -insaturados que se producen durante el ataque de insectos y la patogénesis bacteriana. Curiosamente, también se demostró que las enzimas de tipo OYE (nitrorreductasas de Tipo I) en *T. cruzi* reducen una variedad de fármacos tripanocidas tales como las diterpenos komaroviquinona, Nfx y nitrobenilfosforamida (Toogood et al., 2010).

Debido a esta versatilidad catalítica y a la producción de compuestos quirales han sido muy utilizadas en la industria (Hall & Bommarius, 2011). Dado que la reducción de dobles enlaces activados conduce a la formación de hasta dos centros estereogénicos, las proteínas OYEs se han usado con catalizadores biológicos para la síntesis asimétrica de productos farmacéuticos, químicos y agroquímicos enantioméricamente puros (Toogood et al., 2010). Estas proteínas también se han empleado en fitorremediación de suelos contaminados por explosivos por su capacidad de nitroreducir TNT (2,4,6-Trinitrotolueno) (Smets et al., 2007; Williams et al., 2004).

# Capítulo 2

## Hipótesis y Objetivos

### 2.1. Hipótesis

Dado que estudios en otras especies de la familia Trypanosomatidae dan indicios de que las prostaglandinas posiblemente estén relacionadas con los procesos de infección y patogénesis, proponemos que las enzimas responsables de la síntesis de  $\text{PGF}_2\alpha$  tienen un rol crucial en el proceso de infección a células por *T. cruzi*. Por otro lado, planteamos que los parásitos sobreexpresantes de ambas enzimas tienen diferentes susceptibilidad a los fármacos empleados en la enfermedad de Chagas.

### 2.2. Objetivo general

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

### 2.3. Objetivos específicos

- Realizar una búsqueda de homólogos de ambas enzimas en los genomas disponibles de la familia Trypanosomatidae y realizar estudios filogenéticos.
- Análisis comparativo de las estructuras disponibles en la base de datos Protein Data Bank (PDB) de estas enzimas para determinar posibles diferencias en el sitio catalítico que expliquen las diferencias funcionales.
- Generar un diagrama de flujo para análisis filogenéticos de un gen en particular, a través de la incorporación de los *scripts* desarrollados y las herramientas bioinformáticas utilizadas.
- Estudiar la localización subcelular y expresión de ambas enzimas a través del ciclo de vida del parásito.

- Sobreexpresar ambas enzimas en *T. cruzi* para determinar si cambios en la proliferación, infectividad a células de mamíferos y resistencia a fármacos.

# Capítulo 3

## Materiales y Métodos

### 3.1. Búsqueda de homólogos de *TcOYE* y *TcAKR* en los genomas disponibles de la familia Trypanosomatidae

Se realizó una búsqueda de todos los genes pertenecientes a las familias proteicas OYE y AKR en genomas de interés para realizar una reconstrucción filogenética de *TcOYE* y *TcAKR* con sus homólogos.

#### 3.1.1. Selección de los genomas para la búsqueda de homólogos

Se obtuvieron las secuencias nucleotídica completas de 354 genomas de protozoos y 5.245 de bacterias sin la anotación disponible de la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible en <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/>.

#### 3.1.2. Generación de bases de datos

Se generaron una base de datos con secuencias OYEs y otra con secuencias AKRs representativas, que posteriormente se utilizaron para la búsqueda de genes homólogos. Las secuencias aminoacídicas de OYEs y AKRs utilizadas para la generación de las bases de datos fueron extraídas de la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa et al., 2016) la cual está compuesta por secuencias ortólogas curadas. Dicha base de datos se encuentra disponible en la página <http://www.genome.jp/kegg/>. Posteriormente, las bases de datos de familias de proteínas Pfam (<http://pfam.xfam.org>) (Finn et al., 2016) y NCBI-CD search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer et al., 2015) se utilizaron para corroborar que las proteínas recuperadas de KEGG tuvieran los dominios característicos de cada familia proteica. En el caso de OYE estos dominios son “Oxidoreductase FMN” (detectado con Pfam) y “TIM\_phosphate\_binding superfamily” (NCBI-CD), mientras

que para AKR son “Aldo\_ket\_red”(Pfam) y “Aldo\_ket\_red superfamily”(NCBI-CD).

### 3.1.3. Búsqueda de homólogos

Las secuencias OYE y AKR se recuperaron de los genomas mediante Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST)x (Altschul et al., 1990), de manera de recuperar todas las secuencias independientemente de la anotación del genoma. El resultado de BLAST se filtró para descartar aquellas secuencias que no cumplieron con una cobertura del *query* mayor o igual a 90% y un porcentaje de identidad mayor o igual a 25%. Dado que muchas de las secuencias comprendidas en las bases de datos alinearon con la misma región del genoma pero no exactamente en las mismas coordenadas, se empleó la función IRanges del paquete de R GenomicRanges (Lawrence et al., 2013) para definir los rangos del genoma que abarcaron todos los hit encontrados por BLAST. Una vez definidos estos rangos se procedió a determinar el marco de lectura en el cual la secuencia es traducida correctamente. Para esto se tradujo cada rango en los tres marcos abiertos de lectura posibles y se compararon nuevamente con la base de datos mediante BLASTp para determinar cual de los tres es el correcto. Para asegurarnos que contábamos con las secuencias completas se buscaron codones de terminación en los extremos, aquellas secuencias carentes de codón de terminación en los 100 aminoácidos extremos se extendieron a lo largo de la hebra hasta encontrar un codón stop. Luego, estas nuevas secuencias se analizaron con programas de búsqueda de dominios (Pfam y NCBI-CD search) y se inspeccionaron manualmente aquellas secuencias con presencia de 'Xs' en lugar de aminoácidos debido a una baja calidad del genoma, eliminando aquellas con más de 1% de 'Xs' en el largo de la secuencia. Posteriormente, se identificó el comienzo y el final de los marcos abiertos de lectura resultantes mediante búsquedas por BLASTp contra la base de datos no redundante (nr) del Genbank. Este paso permitió definir el comienzo y final de la gran mayoría de secuencias. Dado que algunas secuencias no estaban anotadas y divergían mucho de las secuencias que se encuentran en la base de datos nr debieron ser inspeccionadas manualmente. Por último, una vez definidos los extremos de las proteínas se identificaron cuales eran pseudogenes mediante la búsqueda de codones stop dentro de la región codificante. Tanto el análisis de BLAST como todo el procesamiento posterior se implementó automáticamente usando funciones creadas en R (R Development Core Team, 2008). En cada etapa se conservó información de la secuencia en el nombre de la misma tal como el genoma al que pertenece, las coordenadas en el mismo, la hebra y el marco abierto de lectura.

## 3.2. Estudios filogenéticos

Las secuencias en las cuales los dominios proteicos característicos estaban presentes fueron utilizadas para realizar reconstrucciones filogenéticas. Se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias proteicas con el modo *accurate* de T-coffee (Notredame et al., 2000). Este

método toma en cuenta información estructural disponible en la base de datos PDB (Berman et al., 2000) para mejorar la calidad del alineamiento. Se aplicó ProtTest v3.2.2 (Darriba et al., 2011) para hallar un modelo de sustitución óptimo para cada alineamiento. Dependiendo del alineamiento, JTT (Jones-Taylor-Thornton), WAG (Whelan and Goldman) y Blosum62 fueron los modelos que mejor se ajustaron. Los estudios que determinaron las relaciones filogenéticas fueron realizados con el método *Maximum-Likelihood* (ML) empleando el programa PhyML (Guindon & Gascuel, 2003). La visualización se realizó empleando el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Para el caso del árbol filogenético realizado con secuencias OYE de bacterias, archaeas, plantas, hongos y protozoos el alineamiento múltiple se realizó con programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Para mejorar la calidad del mismo se empleó el modelo oculto de Markov (HMM) del dominio “Oxidored\_FMN” obtenido de Pfam. Se utilizó FastTree 2 (Price et al., 2010) para determinar las relaciones filogenéticas con el método ML. En este estudio se utilizaron las secuencias OYE de bacterias, archaeas y protozoo recuperadas de los genomas en esta tesis así como secuencias anotadas como OYE en la base de datos KEGG (incluyen secuencias de bacterias, plantas y hongos). Para completar la representación taxonómica se incluyeron las secuencias OYE recuperadas de genomas de hongos por Nizam y colaboradores (Nizam et al., 2014), así como secuencias OYE de plantas recuperadas por búsquedas manuales en la bibliografía. La visualización se realizó empleando el paquete de R ggtree (Yu et al., 2016)

### 3.3. Estudios estructurales

Se utilizaron las estructuras de las proteínas AKR de *Trypanosoma cruzi* (TcAKR, PDB: 4GIE), *Trypanosoma brucei* (AKR5A2, PDB: 1VBJ), *Leishmania major* (AKR5A, PDB: 4G5D), *Bacillus subtilis* (AKR5G1, PDB: 3D3F), *Rattus norvegicus* (AKR1B14, PDB: 3QKZ) y *Homo sapiens* (AKR1C3, PDB: 2F38 y AKR1B1, PDB: 1US0) para realizar un análisis filogenético basado en estructura. Para determinar la similaridad estructural entre los pares de proteínas se calculó el *score*  $Q_H$  (O’Donoghue & Luthey-Schulten, 2003) con el *plugin* MultiSeq (Roberts et al., 2006) de VMD (Humphrey et al., 1996).

Los potenciales electrostáticos fueron calculados con APBS (Baker et al., 2001) utilizando un *grid* cúbico de 120 Å por lado y 10 puntos por Å<sup>2</sup>, con una constante dieléctrica del agua de 75.54, un baño salino de 0.150 mM y una temperatura de 298 °K. El potencial fue forzado a converger en cero a los extremos. Los archivos PQR fueron creados con el servidor PDB2PQR (Dolinsky et al., 2007). Se utilizó el campo de fuerza AMBER y se establecieron los estados de protonación a pH 7.0 de acuerdo a PROPKA (Li et al., 2005).

Estos estudios se realizaron en colaboración con el Doctor Matías Machado de la Unidad

### 3.4. Generación de un diagrama de flujo para análisis filogenéticos de un determinado gen de interés

Para la caracterización de los genes homólogos de *TcOYE* y *TcAKR* en genomas de interés se desarrolló una estrategia de búsqueda *in silico* con BLAST como herramienta principal. El *pipeline* de análisis bioinformático con los *scripts* desarrollados en este trabajo que permite su implementación en serie de forma semi-automática. La implementación de este *pipeline* a partir de una base de datos curada y un conjunto de genomas de interés (por el momento no funciona con organismos que poseen intrones) permite obtener un conjunto de secuencias depuradas pertenecientes a la familia proteica de interés. La ventaja de esta aproximación es que la búsqueda de homólogos no depende de la anotación del genoma. Este aspecto es fundamental en este tipo de organismos ya que la anotación posee ciertos errores o no es completa.

### 3.5. Parásitos y células

En este estudio se trabajó con distintos estadios de las cepas Dm28c y TCC de *T. cruzi* (Contreras et al., 1988; Basombrío et al., 1982). Las formas epimastigotas fueron mantenidas en cultivos axénicos en medio líquido de infusión hepática y triptosa (LIT) (sección 3.15) suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado (*Gibco*) a 28 °C. Los pasajes a medio fresco se realizaron cada 4-5 días.

Por otro lado también se trabajó con las siguientes líneas celulares:

- Células Vero (Células de riñón de mono verde africano) (Simizu et al., 1967)
- Células HeLa (Células epiteliales de adenocarcinoma de cérvix de útero humano) (Scherer, 1953)
- Macrófagos J774 (Macrófagos monocíticos de ratones BALB/c) (Ralph et al., 1975)

Las mismas fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (sección 3.15) suplementado con 10% de SBF inactivado (*Gibco*) y estreptomycin a 37 °C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para la obtención de tripomastigotas derivados de células se realizó la infección *in vitro* de células Vero usando parásitos metacíclicos obtenidos mediante estrés nutricional a partir de cultivos de epimastigotas envejecidos por 10-15 días. Las células fueron crecidas en frascos de cultivo y al alcanzar un crecimiento de alrededor de 75% de confluencia fueron infectadas con una relación 10:1 de tripomastigotas por células. Se realizó la infección durante 4 horas a 37 °C

en medio DMEM con 10 % de SBF. Luego de las 4 horas se lavó tres veces con buffer salino de fosfato (PBS) 1X y el medio fue reemplazado por DMEM con 2 % de SBF. Aproximadamente a los 3 días se observaron los amastigotas dentro de las células y a los 7-8 días se recolectaron del medio de cultivo los tripomastigotas derivados de células.

### 3.5.1. Transfección y selección de epimastigotas

Epimastigotas de Dm28c y TCC fueron transformados con pTREX-n (Vazquez & Levin, 1999) (vector vacío) y la construcción pTREX-n/*TcOYE* para la producción de líneas celulares sobreexpresantes de *TcOYE*. Por otro lado, también se realizó la transformación de parásitos Dm28c con pTREX, pTREX-n y las construcciones pTREX/*TcAKR* y pTTEREX-n/*TcAKR*. Por cada transfección se cosecharon  $8 \times 10^7$  parásitos de un cultivo en fase exponencial tardía. Se lavaron tres veces con PBS 1X y se resuspendieron en el buffer HBS (HEPES 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, glucosa 6 mM, pH 7,4). A continuación se incubó en hielo durante 10 minutos con 100  $\mu$ g de ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmídico purificado con el sistema comercial “Illustra plasmidPrep Midi Flow Kit” de *GE Healthcare Life Sciences* (28904267). Posteriormente, los parásitos fueron electroporados junto con el plásmido en cubetas de 4 mm con dos pulsos de 450 V, 1300  $\mu$ F y 13  $\Omega$  en *BTX ElectroCell Manipulator 600*. Los parásitos se recuperaron 10 minutos a temperatura ambiente y luego se transfirieron a 2 ml de medio fresco. A las 24 horas se agregó antibiótico y los parásitos fueron seleccionados con concentraciones crecientes de Geneticina (G418, A1720 *Sigma*) hasta 1 mg/ml. La sobreexpresión en epimastigotas fue confirmada mediante western blot. Para cuantificar la sobreexpresión en amastigotas extracelulares y tripomastigotas derivados de células, los parásitos fueron fijados con 4 % peso en volumen (p/v) de *p*-formaldehído para IFI. Se realizó microscopía confocal y la intensidad de fluorescencia fue medida con la plataforma Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org>).

## 3.6. Análisis de proteínas

### 3.6.1. Extractos proteicos

#### Extractos proteicos totales

Para la obtención de extractos proteicos totales los parásitos fueron lavados tres veces con buffer PBS 1X frío y una vez con 1 ml de Tris 10 mM pH 7 para eliminar las sales. Luego se agregó 50  $\mu$ l de buffer de lisis (sección 3.15) por cada  $1 \times 10^6$  parásitos, sin pipetear. Se utilizó vortex 1-3 minutos hasta que se aclaró la solución y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente con una leve agitación para permitir completar la lisis. Se centrifugó 30 minutos a 10.000 x g y el sobrenadante se conservó a -80 °C.



## Extractos proteicos obtenidos con digitonina

Para obtener una permeabilización diferencial de las membranas de los parásitos se trató  $5 \times 10^8$  de epimastigotas con concentraciones crecientes de digitonina (0–4 mg/ml) (Arias et al., 2013). Los parásitos se lavaron una vez con PBS 1X y dos veces con el buffer de extracción (Tris (hidroximetil) aminometano (Tris)-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM, pH 7,5). Luego se resuspendieron en 850  $\mu$ l del buffer de extracción y 80  $\mu$ l de esta suspensión se incubó durante 5 minutos a 30 °C con la correspondiente dilución de digitonina (*AppliChem*). Las fracciones proteicas se centrifugaron a 15.500 x g por 10 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se mezclaron con buffer de carga para proteínas (sección 3.15). Se incubó la muestra a 100 °C por 5 minutos y se conservó a -20 °C. Los extractos proteicos se utilizaron en western blot con diferentes sueros policlonales como marcadores de localización específicos: *TcCPX* (Triparredoxina Peroxidasa Citosólica; citoplasmática; 1/20.000), *TcGlcK* (Glucosaminasa; glicosomal; 1/2.000), *TcMPX* (Triparredoxina Peroxidasa Mitocondrial; matriz mitocondrial; 1/2.000), *TcCz* (Cruzipaina; reservosoma; 1/1.000) y *TcAPX* (Ascorbato peroxidasa; retículo endoplásmico; 1/4.000)

### 3.6.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación proteica se basó en el método de Bradford (Bradford, 1976). Se incubó 5  $\mu$ l de muestra o estándar con 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford (Sigma). El ensayo se realizó en placas de 96 wells y como patrón se empleó seroalbúmina bovina (BSA) de *Sigma*. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente con el reactivo de Bradford se midió la absorbancia a 595 nm en lector de microplacas *Multiskan EX* de *Thermo SCIENTIFIC*. También se cuantificó la concentración de proteínas midiendo la absorbancia a 280 nm de acuerdo a la relación  $1U_{Abs} = 1mg/ml$  en *NanoDrop*<sup>TM</sup>1000 de *Thermo SCIENTIFIC* versión V3.7.1. Para el caso de las muestras de purificación de vesículas se empleó el kit comercial *Qubit*® *Protein Assay Kit* (Q33211, *Life technologies*<sup>TM</sup>) según las instrucciones del fabricante.

### 3.6.3. Separación de proteínas mediante electroforesis en SDS-PAGE

La separación de proteínas de acuerdo a su tamaño en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles discontinuos, un gel concentrador y un gel separador al 12 %, en sistemas *Might Small II for 8X9CM Gels* de *Amersham Biosciences* con fuente de electricidad *Electrophoresis Power Supply-EPS601* de *GE Healthcare*.

Las muestras se desnaturizaron por calor (100 °C durante 5-10 minutos), salvo los casos en los que se indica lo contrario, y se tratan con buffer de carga para proteínas 1X (sección 3.15).

Las corridas se hicieron con buffer de corrida de geles de acrilamida 1X preparado a partir del 10X (sección 3.15) a intensidad constante de 25-30 mA, hasta que el frente de corrida llegara al final del gel. Se utilizaron tres maneras diferentes para la tinción de los geles de acrilamida.

- Tinción con Coomassie. Solución de coomassie: 1 % (p/v) *Brilliant Blue R* (B7920, *Sigma*) en ácido acético:EtOH:agua en relación 1:4:4. La solución de trabajo es: 50 % volumen en volumen (v/v) solución de coomassie, 20 % (v/v) EtOH y 30 % (v/v) agua. Las tinciones se realizaron en agitación durante 1-4 horas y luego se decoloraron con agua.
- Tinción con nitrato de plata. Una vez finalizada la corrida electroforética se dejó el gel en la solución de fijación (12 % ácido acético, 50 % etanol, 0,5 ml/l de formaldehído 37 %) por 16 horas a temperatura ambiente. Luego se lavó tres veces (durante 5, 10 y 15 minutos) con la solución de lavado (50 % de etanol) y se sometió a reducción con tiosulfato de sodio (0,2 g/l  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ ) durante 30 segundos, seguido de tres enjuagues con agua. A continuación, se incubó 20 minutos con solución de nitrato de plata (2 g/l  $AgNO_3$ , 0,75 ml/l de formaldehído 37 %) y se enjuagó tres veces con agua. Por último, se agregó la solución de revelado (30 g/l  $Na_2CO_3$ , 20 ml/l de solución de tiosulfato, 0,5 ml/l de formaldehído 37 %) hasta visualizar las bandas y la reacción se inactivó con la solución de fijación.

Los tamaños de las proteínas fueron estimados por comparación con marcadores de peso molecular de *Thermo SCIENTIFIC* (26616 y 26619). Alternativamente, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa para su inmunodetección por western blot.

## 3.7. Técnicas inmunológicas

### 3.7.1. Análisis de proteínas mediante western blot

Las proteínas resueltas en electroforesis en geles de acrilamida bajo condiciones reductoras se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa *Amersham*<sup>TM</sup> *Hybond*<sup>TM</sup>-ECL (*GE Healthcare*). Se utilizó la técnica de electrotransferencia húmeda en el sistema *Mighty Small Transphor* de *Amersham Biosciences* con fuente de electricidad *Electrophoresis Power Supply-EP601* de *GE Healthcare*. Los geles de acrilamida, las membranas de nitrocelulosa, 6 piezas de papel Whatman y esponjas se sumergieron en el buffer de transferencia (sección 3.15) para el montaje dentro del cassette. La transferencia se llevó a cabo a una intensidad constante de 40 mA durante 16 horas. Las membranas fueron teñidas con el reactivo rojo Ponceau 0,2 % (v/v) en ácido acético 10 % (v/v) para recortarlas y evaluar la eficiencia de la transferencia. Se destiñeron con PBS 1X y se bloquearon los grupos reactivos de la membrana por 1-3 horas con solución de bloqueo (sección 3.15). Se incubó las membranas con la dilución apropiada del anticuerpo primario purificado o suero por 1-3 horas y luego se lavó tres veces por 10 minutos. Se incubó durante 1 hora con el

anticuerpo secundario comercial contra IgG de conejo o de ratón conjugado a HRP generado en cabra de *Sigma* (A0545) o *DAKO* (P0260), respectivamente. A continuación, las membranas se lavaron tres veces por 10 minutos y posteriormente se revelaron con placas autorradiográficas (*KODAK*) utilizando el *Kit Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate* de *Thermo SCIENTIFIC* siguiendo las instrucciones del fabricante. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente. La normalización se realizó con el anticuerpo anti-tubulina comercial de *Sigma* (T5168) y las bandas escaneadas se analizaron usando el software *ImageJ* (versión 1.410)

### 3.7.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

#### Fijación, adhesión y permeabilización

Para las citolocalizaciones por inmunofluorescencia los parásitos (epimastigotas, amastigotas o tripomastigotas) se lavaron tres veces con PBS 1X y se fijaron durante 16 horas con *p*-formadehído 4% (v/v) en PBS 1X a 4 °C. Luego se lavaron con PBS 1X y se incubaron con 50 mM de cloruro de amonio (*Sigma*) por 10 minutos a temperatura ambiente para bloquear los grupos aldehído. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X, se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/pocillo y se colocaron en portaobjetos pre-tratados con polilisina 0,1 mg/ml (poli-Lys, *Sigma*). Trascorridos 20 minutos a temperatura ambiente se lavó el portaobjetos con PBS 1X para retirar los parásitos no adheridos. Para la permeabilización se utilizó 0,5% (v/v) Tritón-X100 (*Sigma*) en PBS 1X durante 5 minutos y se lavó dos veces con PBS 1X. Para el caso de las inmunolocalizaciones sobre monocapas de células se lavó con PBS 1X tres veces y se fijó con 4% (v/v) de *p*-formadehído en PBS 1X 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavó las células con PBS 1X y se incubó con 50 mM de cloruro de amonio (*Sigma*) para bloquear los grupos aldehídos libres por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con PBS 1X se procedió a la inmunodetección.

#### Inmunodetección

Una vez permeabilizada la muestra se realizó el bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA 2% (p/v)-PBS 1X-Tween 20 0,1% (v/v). Después de dos lavados de 5 minutos con PBS 1X-Tween 20 0,1% (v/v) se incubó el anticuerpo primario diluido en BSA 1% (p/v)-PBS 1X-Tween 20 0,1% (v/v) por 1-5 horas a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS 1X-Tween 20 0,1% (v/v) se incubó los parásitos durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. Como anticuerpo secundario se empleó los anticuerpos comerciales anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor®488 generado en cabra de *Invitrogen* (A11034), anticuerpo comercial anti-IgG de ratón conjugado a Cy3® generado en cabra de *Invitrogen* (M30010), o anticuerpo comercial anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor®546 generado en cabra de *Invitrogen* (A11010). Todos se incubaron 1 hora a temperatura

ambiente en una relación 1/1000 (v/v) en BSA 1% (p/v)-PBS 1X-Tween 20 0,1% (v/v). Culinada la incubación se lavó cuatro veces con PBS 1X-Tween 20 0,1% (v/v) y una vez con PBS 1X. Como líquido de montaje y para poder visualizar el ADN se empleó “*Fluoroshield<sup>TM</sup> with DAPI*” de *Sigma*. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5 usando un lente 63X en aceite con los láser de excitación Argon (488 nm), HeNe (543 nm) y Diode (405 nm).

### 3.7.3. Purificación de anticuerpos a partir del suero

Para la purificación de anticuerpos contra *TcOYE* recombinante a partir de suero de conejo se empleó una membrana de nitrocelulosa *Amersham<sup>TM</sup> Protran<sup>TM</sup> Premium 0.45  $\mu$ m NC* de *GE Healthcare Life Sciences* (cat No 10600003) de dimensiones 0.5 cm x 4 cm. Se colocaron 400  $\mu$ g de proteína recombinante sobre la membrana en una superficie a 40 °C para facilitar la adsorción. La cantidad de proteína agregada fue calculada teniendo en cuenta las especificaciones del fabricante de manera de saturar la capacidad de la membrana. Se bloqueó la membrana con BSA 3% (p/v)-PBS 1X-Tween 20 0,1% durante 1 hora, se lavó dos veces con PBS 1X y se colocó la membrana en un eppendorf de 5 ml. Luego se colocó 400  $\mu$ l del suero a purificar diluido 1/10 en PBS 1X y se dejó interaccionando 16 horas a 4 °C ó 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el suero y se lavó tres veces con 4 ml de PBS 1X. A continuación se agregó 500  $\mu$ l de glicina 100 mM pH 2,5 y se pipeteo durante 5 minutos para la elución de los anticuerpos. Posteriormente, se transfirió los 500  $\mu$ l a un eppendorf ya preparado con 200  $\mu$ l de Tris 1 M pH 8 para neutralizar la glicina. Se repitió este paso 3 veces. Por último se lavó la membrana con PBS 1X. Este procedimiento desde el agregado del suero a purificar se repitió al menos 5 veces. Al final, se juntaron todos los eluatos y se concentraron usando un centricon de 30 kilo Dalton (kDa) hasta 500  $\mu$ l. Se le agregó 500  $\mu$ L de glicerol 100% de manera que los anticuerpos purificados se almacenaron en 50% de glicerol.

### 3.7.4. Inmunoprecipitación

La precipitación selectiva de *TcOYE* utilizando el anticuerpo específico purificado se realizó con *beads* superparamagnéticas uniformes que tienen unida covalentemente proteína G recombinante en su superficie (*Dynabead<sup>®</sup> Protein G* de *Invitrogen*, Cat. No. 100.03D). El anticuerpo se une a las *Dynabeads<sup>®</sup>* a través de su región Fc y mediante la utilización de un imán, las *beads* migran al lado del tubo frente al imán y permiten una fácil eliminación del sobrenadante. En este experimento se utilizó 10  $\mu$ L de *Dynabeads<sup>®</sup>* para cada condición experimental:

- anticuerpo y extracto proteico total de epimastigotas
- anticuerpo y *TcOYE* recombinante (control positivo)
- anticuerpo (control negativo)

- extracto proteico total de epimastigotas (control negativo)

Se agregó 20  $\mu\text{L}$  de anticuerpo purificado diluído en PBS 1X (1/50) a las *Dynabeads*® y se dejó interaccionando 2,5 horas. Luego se lavó cuatro veces con PBS 1X para sacar anticuerpo no unido y proteína sérica. Se entrecruzó con formaldehído 0,5 % (v/v) en agitación durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a lavar cuatro veces con PBS 1X y se neutralizó con Tris-HCl 0,1 M pH 8 durante 5 minutos en agitación, seguido por dos lavados con PBS 1X. Una vez acoplado el anticuerpo a la proteína G de las *Dynabeads*® se realizó el extracto proteico total de epimastigotas por sonicación. Se lavaron  $5 \times 10^9$  parásitos tres veces con PBS 1X y se entrecruzaron con formaldehído 0,4 % (v/v) por 5 minutos. Se lavó con PBS 1X una vez y se neutralizó por 5 minutos con Tris-HCl 0,1 M pH 8. Se lavó con PBS 1X y se sonicó en hielo hasta que la apariencia de solución aclaró. Luego se centrifugó durante 30 minutos a 14.000 rpm 4 °C y el sobrenadante se incubó con las *Dynabeads*® conjugadas con el anticuerpo 16 horas a 4 °C . Se lavó el complejo *Dynabeads*®-Anticuerpo-Antígeno con PBS 1X tres veces, se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de PBS 1X y se transfirió a un tubo eppendorf nuevo para la elución. La elución se realizó incubando 5 minutos con glicina 20 mM pH 2,5. Al sobrenadante se le agregó Tris-HCl 1 M pH 8 y buffer de la muestra para proteínas (sección 3.15). Previó a correr el gel se calentó la muestra 10 minutos a 70 °C.

### 3.8. Ensayos de infección a células de mamífero

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de *TcOYE* en la infección a células de mamífero se realizó la infección *in vitro* de células HeLa y macrófagos J774. Las células fueron cultivadas en cubreobjetos de vidrio redondos de 18 mm esterilizados colocados en placas de cultivo de 12 pocillos (Corning Inc., Corning, USA). Se paqueó 30.000 células por pocillo para el caso de HeLa y 50.000 células por pocillo para el caso de macrophage-like cell line J774. La infección se realizó con tripomastigotas Dm28c y TCC transfectados con pTREX-n ó pTREX-n/*TcOYE* en una proporción de 5 parásitos por célula en DMEM sin SBF. Luego de 4 horas de infección, los parásitos no internalizados fueron removidos con tres lavados con PBS 1X y se agregó DMEM suplementado con 2 % de SBF. Se lavó los cubreobjetos con PBS 1X a diferentes tiempos post infección (0 y 48 horas) y se fijaron con etanol absoluto durante 5 minutos. Las células se montaron sobre portaobjetos con “*Fluoroshield*<sup>TM</sup> with DAPI” (*Sigma*). El número de células infectadas y el número de amastigotas por célula fue determinado por microscopía de epifluorescencia mediante la visualización de los kinetoplastos y núcleos de los parásitos y células teñidos con DAPI. La capacidad infectiva de los parásitos también se evaluó contando los tripomastigotas que completaron el ciclo infectivo presentes en el sobrenadante de la monocapa de células cada 24 horas.

## 3.9. Estudios de secreción

La purificación de vesículas extracelulares (EV) derivadas de epimastigotas se realizó empleando estrés nutricional seguido de centrifugación diferencial. Los parásitos se crecieron en 400 ml de medio LIT suplementado con 10 % de SBF hasta alcanzar una densidad de  $5 \times 10^7$ /ml. El *pellet* de parásitos se lavó dos veces con el medio RPMI (sección 3.15) y se incubaron por 24 horas en RPMI sin suero en una densidad de 200 millones/ml a 28 °C. Después del estrés nutricional, los parásitos se removieron mediante dos centrifugaciones a  $1.100 \times g$  por 20 minutos seguido de una filtración utilizando un filtro de  $0,45 \mu m$ , se guardó una alícuota del sobrenadante el cual se llamó SN1. Este sobrenadante libre de células se centrifugó a  $14.500 \times g$  por 45 minutos a 4 °C, el *pellet* obtenido se resuspendió en 100  $\mu l$  de PBS 1X y se almacenó como P1. Las EV más chicas fueron obtenidas ultracentrifugando ( $100.000 \times g$  por 90 minutos a 4 °C), el sobrenadante se guardó como SN2 y el P2 se lavó una vez con PBS 1X y se centrifugó dos veces a  $100.000 \times g$  durante 90 minutos. Por último se centrifugó a  $100.000 \times g$  durante 16 horas a 4 °C para obtener la fracción libre de vesículas. A este último sobrenadante se le llamo SN3.

Adicionalmente, se estudió la secreción en condiciones de no estrés nutricional, para ello epimastigotas sincronizados crecidos en LIT con 10 % de SBF y en la fase exponencial temprana de crecimiento se removieron por centrifugación y filtrado, tal como fue descrito en el párrafo anterior. Al momento del análisis por western blot, se precipitaron las proteínas tanto de este sobrenadante de cultivo de epimastigotas no estresados como de los sobrenadantes SN1, SN2 y SN3 con acetona fría en un relación 1:5 (sobrenadante:acetona). Se incubó por 1 hora a -20 °C, se centrifugo a  $13.000 \times g$  por 15 minutos y se resuspendió el precipitado en 1 ml de PBS 1X. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C con cocktail inhibidor de proteasas (*Sigma*), nucleasa mix y PMSF 1mM. Para todo el procedimiento se usó PBS estéril. La cuantificación se realizó por Qubit (sección 3.6.2).

### 3.9.1. Estudio del efecto de *TcOYE* secretada en infectividad

En primer lugar se estudió la internalización de *TcOYE* en células HeLa. Se plaquearon 40.000 células por pocillo en placas de cultivo y se ensayó la incubación de dos concentraciones diferentes de la proteína recombinante (1 y 2  $\mu M$ ). Se incubó la proteína con las células durante 3 horas a 37 °C, luego se lavó tres veces con PBS 1X y se procesó la muestra para inmunofluorescencia indirecta tal como se detalla en la sección 3.7.2 para inmunolocalizaciones sobre monocapas de células.

Una vez confirmada la internalización de la proteína *TcOYE* recombinante se estudió el efecto en la susceptibilidad a la infección en células de mamífero. Para ello se incubaron 40.000 células HeLa con 0,1  $\mu M$  de *TcOYE* recombinante y luego se infectó con tripomastigotas

Dm28c *wild type*. Como control se realizó la infección a células incubadas con medio y a células que fueron pre-incubadas con una proteína inerte ( $1 \mu\text{M}$  de BSA). La pre-incubación con las proteínas se realizó durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  en medio DMEM suplementado con 10 % de SBF. A continuación se infectó con una relación 5:1 (parásitos:células) sin retirar las proteínas. Luego de 4 horas de interacción se lavó la infección tres veces con PBS 1X y se mantuvo las células infectadas con DMEM suplementado con 1 % de SBF. Una vez que los parásitos completaron el ciclo intracelular y comenzaron a salir, se contaron los tripomastigotas derivados de células en el sobrenadante de cultivo cada 24hs para ver como evolucionaba en el tiempo.

### 3.10. Fármacos y oxidantes

Con el objetivo de estudiar el efecto de la sobreexpresión *TcOYE* y *TcAKR* en la sensibilidad a fármacos tripanocidas y reactivos oxidantes se incubó los parásitos sobreexpresantes con concentraciones crecientes de Bzn, Nfx, y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los parásitos se lavaron con PBS-glucosa 1 % y se incubaron por 24 horas con Bzn o Nfx (20, 50 y  $100 \mu\text{M}$ ). Para el caso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se incubaron por 48 horas con 200, 300 y  $400 \mu\text{M}$ . Se utilizaron  $5 \times 10^6$  epimastigotas en cada condición y como control se emplearon los parásitos transfectados con el vector vacío. La viabilidad se evaluó con el reactivo resazurina (R7017, *Sigma*) y se midió la absorbancia a 490 y 595 nm.

### 3.11. Detección de $\text{PGF}_2\alpha$

#### Preparación de muestras

Se colectaron epimastigotas en cultivo durante la fase exponencial de crecimiento y tripomastigotas de sobrenadante de monocapa de células infectadas. Se trabajó en ambos estadíos con parásitos transfectados con las construcciones pTREX-n *TcOYE* y pTREX-n *TcAKR*, así como con parásitos transfectados con el vector vacío pTREX-n como control. Los parásitos se lavaron una vez con PBS 1X y se resuspendieron en  $500 \mu\text{L}$  de PBS 1X. Se incubaron 2 horas con  $50 \mu\text{M}$  de AA (ab120916, *Abcam*) a  $28^\circ\text{C}$  los epimastigotas y a  $37^\circ\text{C}$  los tripomastigotas. Luego el sobrenadante fue depletado de parásitos mediante centrifugación y se guardó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su medición. A su vez, el *pellet* de parásitos se resuspendió en PBS 1X y se realizó un extracto por shock térmico (15 minutos a  $-80^\circ\text{C}$  y 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  tres veces). Por último, se centrifugó a 14.000 rpm durante media hora a  $4^\circ\text{C}$  y se utilizó el sobrenadante para la determinación de  $\text{PGF}_2\alpha$ .

#### Determinación de $\text{PGF}_2\alpha$

La determinación de  $\text{PGF}_2\alpha$  se realizó empleando el kit de ELISA comercial “ $\text{PGF}_2$  alpha High Sensitivity ELISA Kit” (ab133056, *Abcam*) según las instrucciones del fabricante. Para el análisis de los datos se utilizó el paquete de R “drc” (Ritz et al., 2015) con el cual se realizó una

regresión no lineal de la curva estándar. Se ajustó a una regresión del tipo 4PL (ecuaciones 3.1 y 3.2) tal como lo sugiere el fabricante.

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} \quad (3.1)$$

$$x = c \left( \frac{-a + y}{d - y} \right)^{\frac{1}{b}} \quad (3.2)$$

### 3.12. Ensayos *in vivo*

Se realizó la infección intraperitoneal de ratones BALB/c machos de dos meses de edad con parásitos Dm28c sobreexpresantes de *TcOYE* y *TcAKR*. Se infectaron 22 ratones con 20.000 parásitos distribuidos en 5 grupos: dos ratones infectados con parásitos *wild type*, 5 ratones infectados con parásitos transfectados con el vector pTREX vacío, 5 ratones con parásitos transfectados con el vector pTREX-n, 5 parásitos transfectados con la construcción pTREX-*TcAKR* y 5 parásitos transfectados con la construcción pTREX-n *TcOYE*. En primer lugar se midió la parasitemia cada tres días durante un mes. A los 30 días se sacrificaron los ratones y se obtuvo el corazón y el suero de cada animal para evaluar la infección aguda. Los corazones obtenidos se procesaron para extracción de ADN genómico. Con el ADN genómico se realizó PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos para *T. cruzi* con el objetivo de determinar la carga parasitaria en el corazón.

#### 3.12.1. Extracción de ADN a partir de tejido animal

Los corazones se colectaron en etanol absoluto y se almacenaron a -80 °C. Al momento de su procesamiento se lavó dos veces con PBS 1X y se agregó 500  $\mu$ l de 1,19 % (p/v) de cloruro de potasio. Se homogenizó el tejido con un homogenizador potter-Elvehjem *Homogenizer variable speed - reversible* de *Glas-Col* 400 rpm. Una vez homogeneizado el tejido se extrajo ADN con el kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* de *Promega* (A1120) según las instrucciones del fabricante.

#### 3.12.2. PCR cuantitativo

Para la cuantificación mediante PCR (qPCR) se utilizaron los oligonucleótidos cebadores específicos para *T. cruzi*, TCZ1 y TZCZ2, que amplifican un segmento de 188 pb de una secuencia repetida de ADN nuclear (Moser et al., 1989). Como control interno para la normalización de los resultados se usaron los cebadores TNF1 y TNF2 que amplifican el gen que codifica para el factor de necrosis tumoral (TNF). Se utilizó la mezcla comercial KAPA SYBR®FAST qPCR Master Mix 2X (*KAPA BIOSYSTEMS*, KM4101) que contiene la enzima KAPA SYBR



FAST ADN polimerasa, el buffer de reacción, los 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTPs), la sonda fluorescente SYBR Green I dye y  $MgCl_2$ . A la mezcla se le adicionó 1  $\mu g$  de ADN molde y 10  $\mu M$  de cada oligonucleótido cebador. El volumen final de reacción fué de 25  $\mu l$  y para cada reacción se realizó un duplicado técnico. Las características del ciclado usadas fueron:

1. Desnaturalización inicial: 10 minutos a 95 °C
2. Desnaturalización del molde: 10 segundos a 95 °C
3. Hibridación de los cebadores y polimerización de los nucleótidos: 30 segundos a 60 °C
4. 15 segundos a 95 °C

Los pasos 2 y 3 se repitieron 40 veces.

### 3.12.3. ELISA

Para evaluar la reactividad de sueros de pacientes contra la proteína *TcOYE* recombinante se realizaron ensayos de ELISA sensibilizando la placa con 100 $\mu l$  de una solución 5  $\mu g/ml$  de proteína durante 16 horas a 4 °C. Se lavó dos veces con PBS 1X-Tween 20 0,05 % y se bloqueó con 200  $\mu l$  de BSA 1 % (p/v)-PBS 1X por 1 hora a 37 °C. Luego se lavó una vez con PBS 1X-Tween 20 0,05 % y se agregó 100  $\mu l$  de anticuerpo primario (diluido entre 1/500 y 1/4.000) que se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se lavó tres veces con PBS 1X-Tween 20 0,05 % y se incubó con el anticuerpo secundario comercial contra IgG humana conjugado a HRP generado en cabra de *Santa Cruz Biotechnology* (SC2907) diluido 1/3.000 ó contra IgG de conejo conjugado a HRP generado en cabra de *Sigma* (A0545) diluido 1/5.000. Por último, se lavó cuatro veces con PBS 1X-Tween 20 0,05 % y una vez con PBS 1X. Se reveló con 25 ml de buffer citrato-fosfato pH 5 una pastilla de OPD (*Sigma*) y 10  $\mu L$  de peróxido de hidrógeno 30 % en oscuridad por 30 minutos a 37 °C y se leyó la placa a 492 nm. Todas las diluciones de anticuerpos se hicieron en PBS 1X-1 % BSA. Como control positivo se usó el suero contra *TcOYE* recombinante generado en conejo. También se realizó un control sin anticuerpo primario, uno sin anticuerpo secundario y un control sin primario ni secundario.

Las muestras de pacientes humanos chagásicos se obtuvieron en colaboración con la Dra. Karina Gómez del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET). La selección de pacientes y toma de muestras estuvo a cargo de médicos del Servicio de Cardiología del Hospital de Agudos Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina. Se tomaron como criterios de inclusión para los pacientes de edades entre 18 y 65 años, con 2 o más ensayos serológicos positivos para Enfermedad de Chagas (ELISA, IFI y HAI), con la forma asintomática (sin alteraciones del electrocardiograma y radiografía de tórax) o con diferente grado de compromiso cardíaco, clasificados según la Asociación de Cardiología de Nueva York. El protocolo sigue los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital. Los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito.

### 3.13. Análisis estadísticos

Para determinar diferencias estadísticamente significativas se utilizó el programa GraphPad Prism® Version 5.0 (Graph-Pad Software, Inc.) y test estadísticos implementados en R. En primer lugar se evaluó si las muestras presentaban distribución gaussiana utilizando el *test* de normalidad Shapiro-Wilk con  $\alpha = 0,05$ . En el caso de que todas las muestras fueran normalmente distribuidas se utilizó las pruebas paramétricas test Student con dos colas o el análisis de variancia ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples Bonferroni. Cuando al menos una muestra no presentó distribución normal se usó el *test* de Mann Whitney.

### 3.14. Microscopia de Epifluorescencia y Confocal

Las imágenes de epifluorescencia se obtuvieron en un microscopio invertido Olympus IX81 mientras que para las imágenes de microscopía confocal se utilizó el microscopio Leica TCS SP5. El análisis y edición de imágenes se realizó empleando los programas LAS AF (Leica-MICROSYSTEMS) y Icy (Quantitative Image Analysis Unit, Institut Pasteur País).

### 3.15. Medios de cultivos y soluciones

#### 3.15.1. Cultivo celular

- Para el cultivo de epimastigotas se utilizó el medio LIT: 5,0 g/L Infusión de Hígado, 4,4 g/L NaCl, 0,4 g/L KCl, 2,2 g/L Glucosa, 5,0 g/L Triptosa, 11,7 g/L  $Na_2HPO_4$  (anhidro), 15 g/L Extracto de Levadura. Ajustado a pH 7,2. Se esteriliza por filtrado. Se adiciona 25 mg Hemina, 100 U/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomicina y se complementa con 10 % de SBF (*Gibco*).
- Para el cultivo de las líneas celulares Vero, HeLa y J774 se utilizó el medio comercial DMEM (DMEM(1X)+GlutaMAX<sup>TM</sup>-1, *Gibco*® by *Life Technologies*<sup>TM</sup>) o ...
- Para el estrés nutricional de epimastigotas se utilizó el medio RPMI:

#### 3.15.2. Geles de acrilamida

- Gel separador (concentraciones de uso): 12 % acrilamida, 0,38 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (v/v) Dodecil sulfato de sodio (SDS), 0,1 % (v/v) PSA, (3  $\mu$ L cada 15 ml) N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED)
- Gel concentrador (concentraciones de uso): 5 % acrilamida, 0,13 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (v/v) SDS, 0,1 % (v/v) PSA, (6  $\mu$ L cada 15 ml) TEMED
- Buffer de la muestra para proteínas 4X: 200 mM Tris-HCL pH 6,8, 300 mM SDS, 6 mM azul de bromofenol (*Sigma*), 40 % (v/v) glicerol, 400 mM Ditiotreitól (DTT).

- Buffer de corrida de geles de acrilamida 10X: 250 mM Tris-HCl, 2,5 M Glicina, 1 % (p/v) SDS pH 8,3.

### 3.15.3. Western blot

- Buffer de transferencia para membranas de nitrocelulosa 10X: 480 mM Tris-Base, 390 mM Glicina, 0,375 % (p/v) SDS, 20 % (v/v) etanol
- Solución de bloqueo: 3 % (p/v) BSA, PBS 1X, 0,1 % (v/v) Tween 20
- Solución para dilución de anticuerpos: 1 % (p/v) BSA, PBS 1X, 0,1 % (v/v) Tween 20
- Solución de lavados (PBS-T): PBS 1X, 0,1 % (v/v) Tween 20

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

El buffer de lisis utilizado para la extracción de proteínas contiene Tris 40 mM, Urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 4%. Al momento de utilizarlo se le agregó PMSF 1 mM, cocktail de inhibidores de proteasas 1X, mix de nucleasas 1X y DTT 1 % final.

# Capítulo 4

## Resultados, análisis y Discusión

El presente trabajo comprendió el estudio de dos enzimas de *T. cruzi*, *TcOYE* y *TcAKR*, con el objetivo de realizar una caracterización que aporte al entendimiento de las funciones biológicas de las mismas. *TcOYE* y *TcAKR* ya han sido estudiadas enzimáticamente en relación a la síntesis de prostaglandinas y el metabolismo de fármacos tal como se detalla en la Introducción, pero se desconoce cuál es su función biológica en el parásito y su relevancia en la interacción con el hospedero.

En primer lugar, se caracterizaron las familias proteicas OYE y AKR en los genomas disponibles de tripanosomátidos. Esto implicó la búsqueda de homólogos basada en comparaciones de secuencias con proteínas caracterizadas en otros organismos. La búsqueda de homólogos de *TcOYE* y *TcAKR* en genomas completos permitió identificar marcos abiertos de lectura con los dominios proteicos característicos, que luego se utilizaron para hacer estudios filogenéticos. También se realizó la búsqueda de homólogos de *TcOYE* en genomas de bacterias y parásitos no tripanosomátidos con el fin de explorar la hipótesis de una posible transferencia horizontal. Para profundizar en el aspecto de la posible función  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa de *TcAKR* se utilizó una aproximación estructural que luego se complementó con estudios *in vitro*. Por último, a través de estudios funcionales se buscó determinar la implicancia de ambas proteínas en el proceso infeccioso y su posible rol biológico.

### 4.1. Búsquedas *in silico*

La peculiaridad de *TcOYE* de no poseer homólogos en otros tripanosomátidos motivó en este trabajo la búsqueda de homólogos en todos los genomas disponibles de protozoos y bacterias. A su vez, debido a que la mayor parte de las PGFS caracterizadas actualmente pertenecen a la superfamilia AKR también se realizó su caracterización en todos los genomas de tripanosomátidos disponibles hasta la fecha.

### 4.1.1. Genomas y bases de datos

Se obtuvieron 354 genomas correspondientes a 203 especies de protozoos, de los cuales 56 genomas pertenecen a 37 especies de la familia Trypanosomatidae comprendidas en los siguientes géneros: *Crithidia*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Trypanosoma*, *Strigomonas*, *Phytomonas*, *Angomonas*, *Endotrypanum* y *Herpetomonas*. Por otro lado, se obtuvieron 298 genomas pertenecientes a 166 especies de 71 géneros de protozoos no tripanosomátidos (*Acanthamoeba*, *Acytostelium*, *Albugo*, *Aphanomyces*, *Ascogregarina*, *Astrammia*, *Aurantiochytrium*, *Aureococcus*, *Babesia*, *Balamuthia*, *Bigelowiella*, *Blastocystis*, *Bodo*, *Chromera*, *Chrysochromulina*, *Condylostoma*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Dictyostelium*, *Ectocarpus*, *Eimeria*, *Emiliania*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Gregarina*, *Guillardia*, *Hammondia*, *Heterococcus*, *Hyaloperonospora*, *Hyphochytrium*, *Ichthyophthirius*, *Laurentiella*, *Lotmaria*, *Mastigamoeba*, *Naegleria*, *Nannochloropsis*, *Neospora*, *Oxytricha*, *Paramecium*, *Paraurostyla*, *Perkinsella*, *Perkinsus*, *Phaeodactylum*, *Physarum*, *Phytophthora*, *Phytophthium*, *Plasmodiophora*, *Plasmodium*, *Plasmopara*, *Polysphondylium*, *Pseudocohnilembus*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Reticulomyxa*, *Saccharina*, *Saprolegnia*, *Sarcocystis*, *Schizochytrium*, *Spiroplasma*, *Sterkiella*, *Stylonychia*, *Symbiodinium*, *Tetmemena*, *Tetrahymena*, *Thalassiosira*, *Thecamonas*, *Theileria*, *Toxoplasma*, *Trichomonas*, *Urostyla*, *Vitrella*). En cuanto a los genomas bacterianos se utilizó un total de 5.246 genomas obtenidos de la base de datos NCBI.

Para realizar las búsquedas *in silico* se construyeron bases de datos específicas. Se utilizaron secuencias de proteínas anotadas como Old Yellow Enzyme y Aldo Keto Reductase caracterizadas en otros eucariotas y procariotas, asignadas en su mayoría por curado manual. Para el caso de la base de datos OYE se incluyeron 70 secuencias proteicas anotadas como Old Yellow Enzyme en la base de datos KEGG. A su vez se agregaron la secuencia de *T. cruzi* y otras secuencias de plantas recuperadas por búsquedas manuales y revisión de la bibliografía para completar la representación de las especies que tienen secuencias OYEs. Se confirmó en estas secuencias la presencia de los dominios proteicos característicos (“TIM\_phosphate\_binding superfamily” cl21457 y “Oxidored\_FMN” PF00724, respectivamente) mediante la implementación de las herramientas NCBI-CD search y Pfam. En la figura 4.1 se muestra un árbol filogenético realizado con las secuencias empleadas para construir la base de datos OYE. Las proteínas se agruparon en dos linajes principales, uno compuesto por bacterias y archaeas, y otro compuesto por hongos y plantas protozoos y bacterias. *TcOYE* se localiza en un grupo filogenético formado principalmente por secuencias de proteobacterias. El grupo más cercano está compuesto por proteínas de hongos y plantas. La mayor identidad aminoacídica de *TcOYE* con secuencias bacterianas con respecto a otras proteínas OYE de eucariotas, plantea la hipótesis de su adquisición mediante transferencia horizontal.

Para la base de datos AKR se obtuvieron 7.899 secuencias anotadas como Aldo-ceto re-

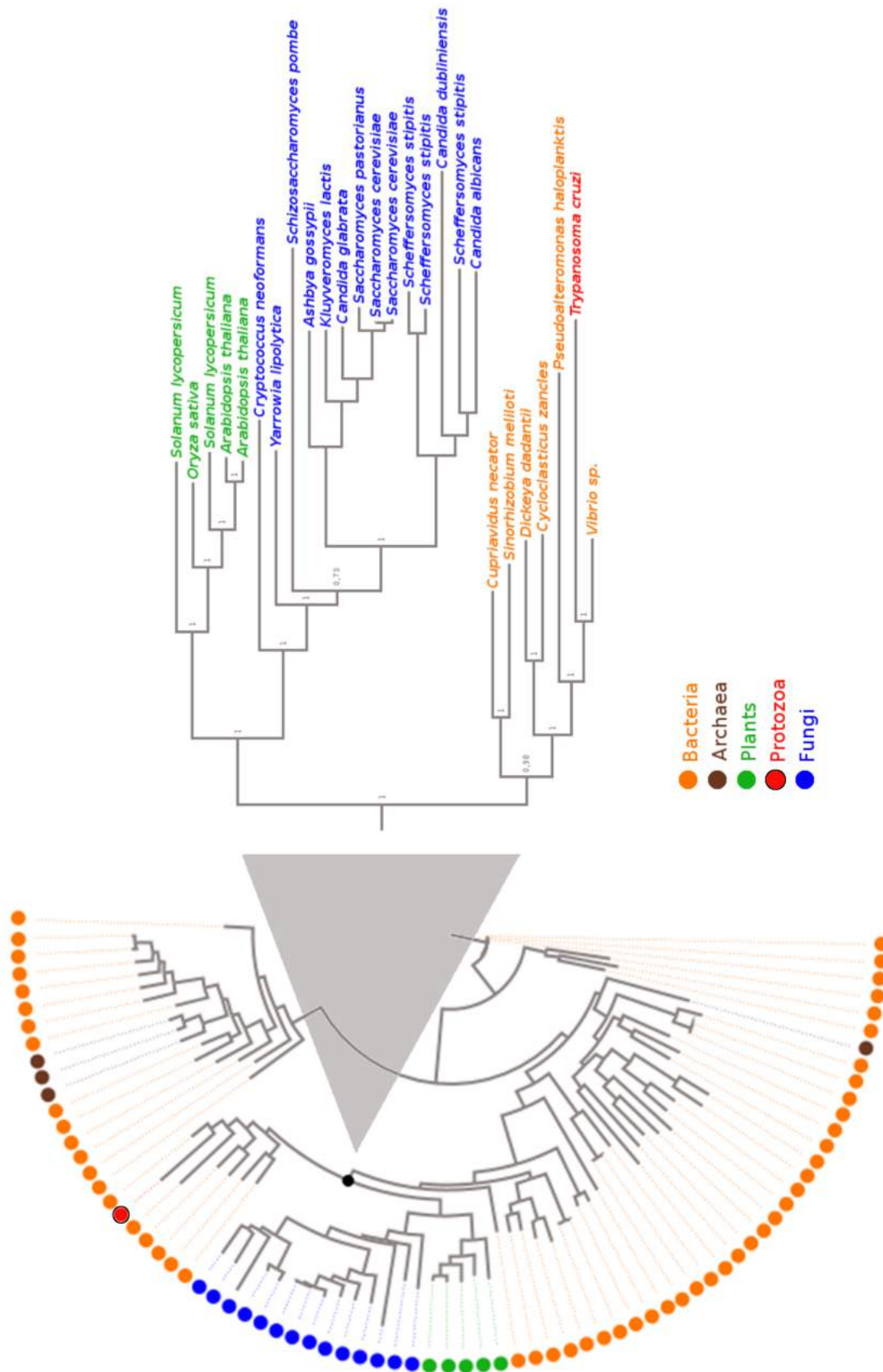


Figura 4.1: Análisis filogenético de miembros caracterizados de la familia proteica OYE. El alineamiento se realizó utilizando el modo *accurate* del software T-Coffee. El árbol fue construido con el método Maximum Likelihood con WAG como modelo de mejor ajuste.

ductasa en KEGG. Dada la gran diversidad de tamaños encontrada, las secuencias se filtraron conservando aquellas de un largo entre 200 y 400 aminoácidos, lo que resultó en 7.579 secuencias. Posteriormente, se utilizó CD-HIT (Fu et al., 2012) para colapsar las secuencias que tengan al menos 70% de identidad aminoacídica logrando reducir el número de secuencias sin perder la variabilidad. Finalmente, la base de datos AKR estuvo compuesta por un total de 2.938 secuencias que presentaron los dominios proteicos característicos “Aldo\_ket\_red”(PF00248) y “Aldo\_ket\_red superfamily”(cl00470) identificados en Pfam y NCBI-CD search, respectivamente.

#### 4.1.2. Identificación de homólogos

Tal como se mencionó en la Introducción, los estudios de identificación de homólogos realizados hasta la fecha se remitían a búsquedas manuales. En este trabajo, se realizó una búsqueda más exhaustiva con estrategias acordes a la biología del parásito y las características de los genomas disponibles.

Las búsquedas en los genomas revelaron que en muchos casos los dominios OYE se encuentran asociados a otros dominios proteicos. En bacterias y archaeas se identificaron 10.824 secuencias, de las cuales 7.055 contienen un único dominio y 3.769 son multidominio. En tripanosomátidos se identificaron 233 secuencias, de las cuales 110 contienen un único dominio OYE y 123 son multidominio. En no tripanosomátidos se identificaron 1.229 secuencias, de las cuales 986 presentan un único dominio OYE y 51 son multidominio. A su vez, en no tripanosomátidos se identificaron 192 pseudogenes por la presencia de mutaciones sin sentido en el marco de lectura. Para determinar si la presencia de OYEs como proteínas de único dominio, así como OYEs pseudogenizadas es diferencial entre tripanosomátidos y no tripanosomátidos se utilizó un test exacto de Fisher. Para ambos casos se obtuvieron p-valores significativos (p-valor  $< 2,2e^{-16}$  y p-valor =  $3,6e^{-16}$ , respectivamente) indicando que la asociación del dominio OYE con otros dominios proteicos en tripanosomátidos, así como la pseudogenización de OYE en no tripanosomátidos son estadísticamente significativas.

Las búsquedas de secuencias AKR en genomas de tripanosomátidos permitió identificar 299 secuencias, las cuales presentan un único dominio a excepción de una que posee el dominio AKR y un dominio C-terminal glutatión S transferasa. En no tripanosomátidos se identificaron 2.216 secuencias, 1.622 con único dominio y 30 multidominio. A su vez, en este caso se identificaron 564 secuencias pseudogenizadas debido a la presencia de mutaciones sin sentido en el marco abierto de lectura. Nuevamente se utilizó un test exacto de Fisher para determinar si la presencia de AKRs de único dominio y AKRs pseudogenizadas se distribuyen diferencialmente en tripanosomátidos y no tripanosomátidos. En el caso de los no tripanosomátidos se encontró que la presencia de pseudogenes es estadísticamente significativa (p-valor  $< 2.2e^{-16}$ ). En cambio,

la distribución de proteínas de único dominio no resultó estadísticamente significativa (p-valor 0,07429).

Cabe destacar que ningún marco abierto de lectura con los dominios proteicos OYE y AKR en tripanosomátidos se encontró pseudogenizado.

**Tabla 4.1:** Resumen de las secuencias OYE recuperadas de los genomas de protozoos.

	Genes	Dominio único	Multidominio	Pseudogenes
Tripanosomátidos	233	110	123	0
No tripanosomátidos	1037	986	51	192

**Tabla 4.2:** Resumen de las secuencias AKR recuperadas de los genomas de protozoos.

	Genes	Dominio único	Multidominio	Pseudogenes
Tripanosomátidos	299	298	1	0
No tripanosomátidos	1652	1622	30	564

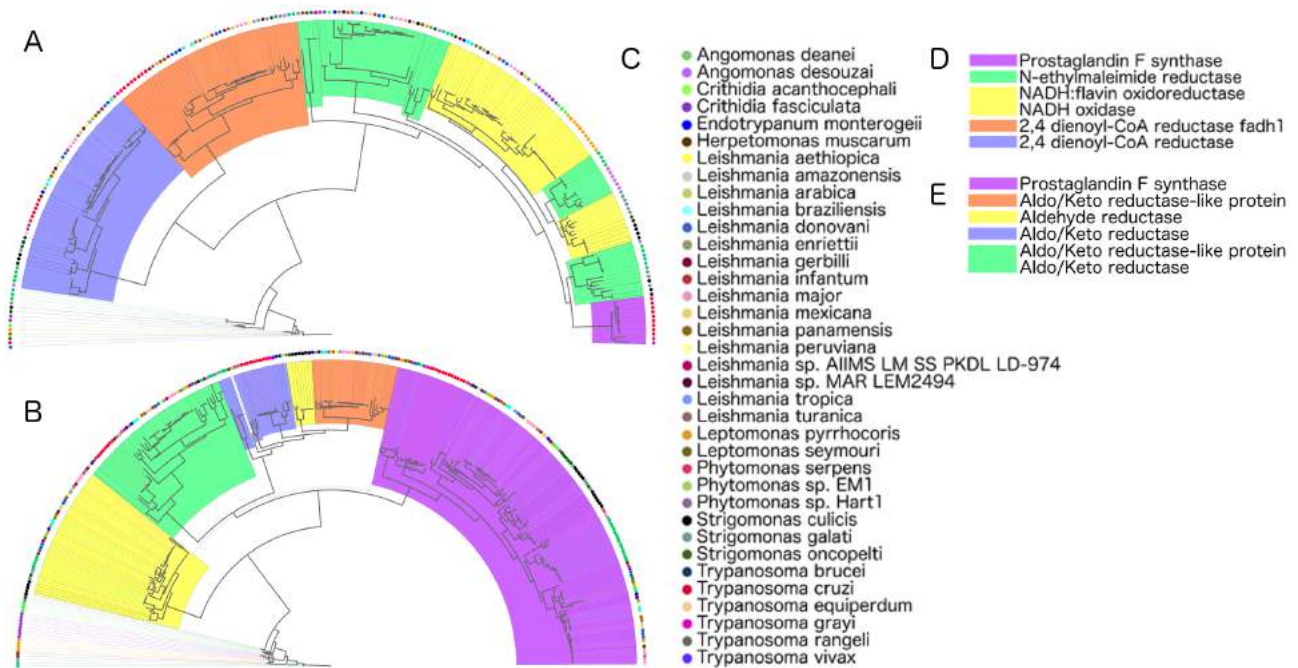
Si bien la inspección de los genomas mostró una diversidad previamente desconocida, también se reportaron genomas que no tienen secuencias OYE y AKR. De los 56 genomas de tripanosomátidos analizados 5 no poseen ninguna secuencia con dominio OYE: *Phytomonas sarpens*, *Phytomonas sp.* aislado EM1, *Phytomonas sp.* aislado Hart1, *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma vivax*. Por otro lado, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma equiperdum* poseen únicamente secuencias multidominio, careciendo de una secuencia homóloga a *TcOYE*. *Trypanosoma congolense* resultó ser el único genoma analizado que no tiene ninguna secuencia con dominios AKR. En cuanto a los 298 genomas de protozoos no tripanosomátidos estudiados, 164 no poseen ninguna secuencia con dominio OYE y 78 no poseen ninguna secuencia con dominio AKR.

#### 4.1.3. Análisis filogenéticos de las secuencias OYE y AKR recuperadas de los genomas

Con el objetivo de estudiar la distribución taxonómica y las relaciones filogenéticas de los homólogos de *TcOYE* y *TcAKR* en otros tripanosomátidos, se realizó una reconstrucción filogenética utilizando el conjunto de proteínas que se recuperaron de los genomas. Las proteínas OYE y AKR se agruparon en ocho y seis grupos filogenéticos distintos (figura 4.2), respectivamente. Estos clados están formados por secuencias con la misma anotación, que en muchos



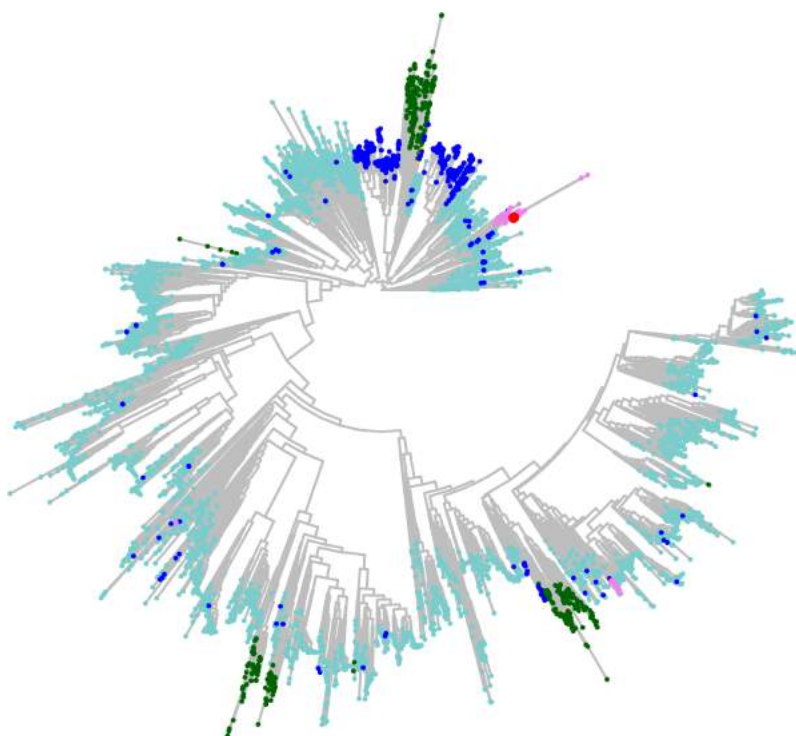
casos refiere a una función putativa. Las proteínas que conforman estos grupos presentan una distribución taxonómica diferencial, algunos estas compuestos por proteínas de todos los genomas usados en el estudio, mientras otros están restringidos a algunos géneros en particular. El grupo filogenético formado por las secuencias anotadas como PGF<sub>2</sub>α sintasa en la figura 4.2 A está conformado por secuencias pertenecientes a *T. cruzi*, *T. rangeli* y *T. grayi*. Este resultado es novedoso dado que esta secuencia había sido reportada previamente sólo en el genoma de *T. cruzi*.



**Figura 4.2: Filogenias con las secuencias OYE y AKR recuperadas de los genomas de tripanosomátidos.** A) Análisis filogenético de miembros caracterizados de la familia proteica OYE. B) Análisis filogenético de miembros caracterizados de la familia proteica AKR. C) Referencia de las especies. D) Referencia de anotación de las secuencias OYE. E) Referencia de anotación de las secuencias OYE.

Para poder hacer inferencias sobre el origen evolutivo de las secuencias OYE en tripanosomátidos se realizó un estudio filogenético con homólogos presentes en bacterias, archaeas, plantas, hongos y protozoos (figura 4.3). Se observa una gran diversidad filogenética de secuencias OYE pertenecientes a bacterias, las cuales se asocian en distintos linajes a secuencias pertenecientes a otros grupos taxonómicos. En particular, las OYEs de hongos se agrupan en tres grupos independientes, dos de los cuales se emparentan con bacterias y el restante con protozoos no tripanosomátidos y plantas. A su vez, las OYEs de protozoos no tripanosomátidos se encuentran en dos grupos principales, asociadas a hongos (mencionado anteriormente) y a bacterias. Sin embargo, también se observa una gran diversidad de secuencias de protozoos no tripanosomátidos presentes en linajes específicos de bacterias. Finalmente, las OYEs de tripanosomátidos se ubican en tres grupos todos emparentados con distintos linajes de bacterias. El

grupo más abundante es el que incluye a *TcOYE*.



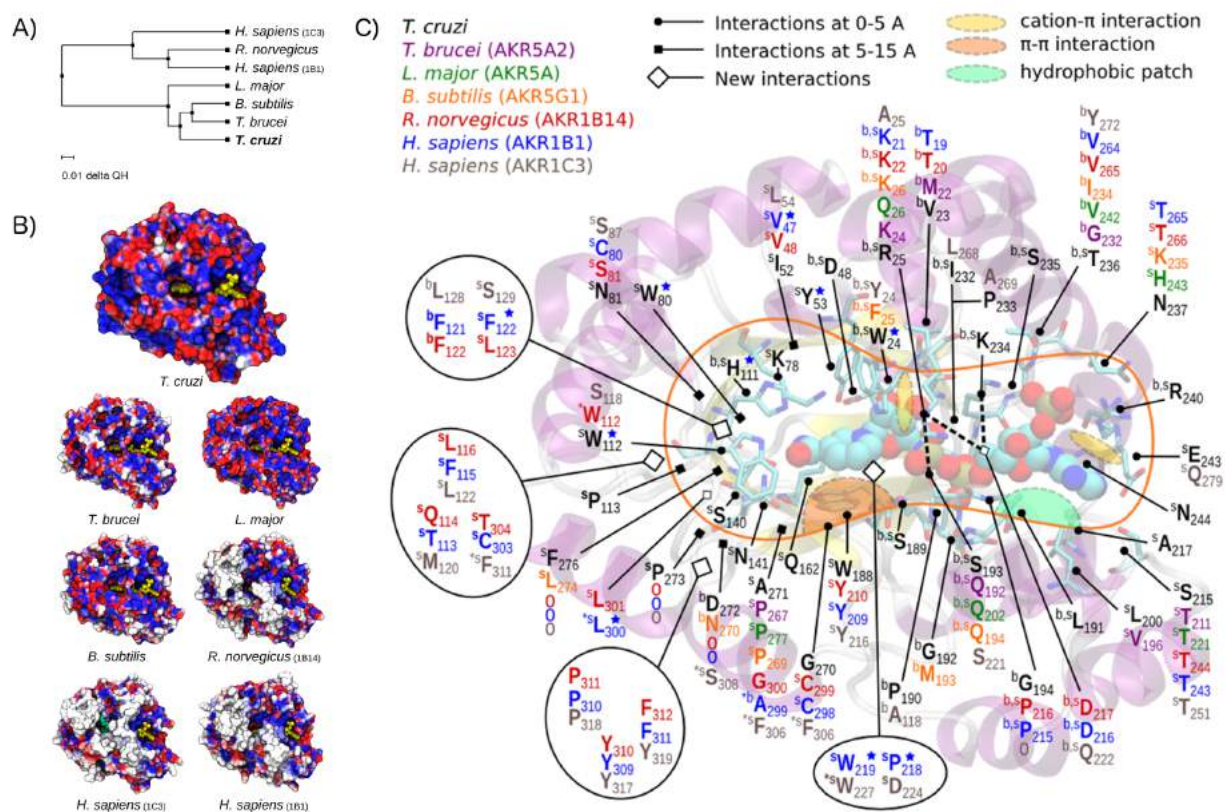
**Figura 4.3: Filogenia de la familia proteica OYE en bacterias archaeas, plantas, hongos y protozoos.** Referencias: azul protozoo no tripanosomátidos, verde hongos, celeste bacterias y archaeas, amarillo plantas, rosado protozoo tripanosomátidos y rojo *TcOYE*.

## 4.2. Análisis estructurales

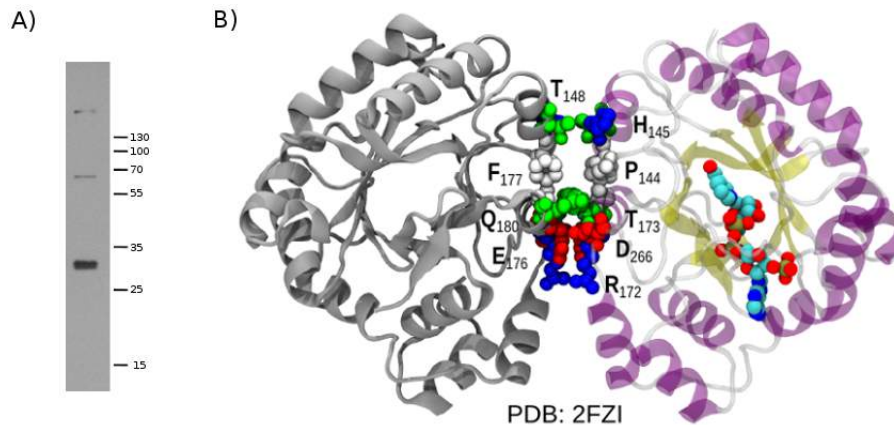
En el trabajo donde se caracteriza a *TcAKR*, los autores no lograron demostrar que esta enzima posee la actividad  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa. Para complementar estos resultados publicados por Garavaglia et al. (2010), se realizó un estudio estructural comparativo de esta proteína con otras AKRs cuya actividad enzimática como  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa ha sido demostrada experimentalmente, tales como las AKRs de *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Bacillus subtilis*, *L. major* y *T. brucei*.

La figura 4.4 A muestra un árbol realizado empleando el índice QH que combina información de alineamientos estructurales y de secuencia. Como era de esperar las AKR de *H. sapiens* y de *R. norvegicus* se parecen más entre sí que al resto. La AKR de *T. cruzi* se encuentra en otro grupo que contiene las AKR de tripanosomátidos (*L. major* y *T. brucei*) y bacteria (*B. subtilis*). En la figura B se muestra el potencial electrostático de las proteínas. Las AKR de *H. sapiens* y de *R. norvegicus* son notoriamente distintas a las de tripanosomátidos y muy similares entre sí. Mientras que el potencial electrostático de la AKR de *T. brucei* es similar al de *B. subtilis*, y el de *T. cruzi* es similar al de *L. major*. De esta manera el potencial electrostático es acorde al

resultado obtenido utilizando el índice QH. En la figura C se muestra un estudio comparativo del sitio activo de las enzimas. Cabe destacar que el sitio de reconocimiento del cofactor y los residuos catalíticos están conservados en todas las estructuras. Éstas presentan variaciones que en principio no afectarían la función molecular de la proteína, por lo que hipotetizamos que *TcAKR* sí es una PGFS.



lo comprueben.



**Figura 4.5: Dimerización de *TcAKR*.** A) Western blot con extracto proteico total de epimastigotas utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -*TcAKR* donde se aprecian bandas proteicas correspondientes a pesos moleculares compatibles con estados de oligomerización. B) Superficie de interacción de los monómeros propuesta.

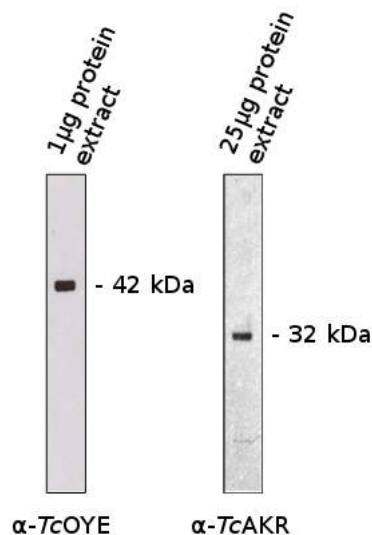
### 4.3. Análisis funcionales

Para ampliar el conocimiento del rol de estas enzimas en la biología del parásito se aplicaron diversas técnicas de biología molecular. En el marco de la tesis de grado se realizaron diferentes construcciones de las secuencias codificantes de *TcOYE* y *TcAKR* en vectores de expresión en bacterias y parásitos. Se pusieron a punto los protocolos de expresión y purificación de ambas proteínas, y se generaron anticuerpos policlonales específicos en conejo contra las proteínas recombinantes.

#### 4.3.1. Expresión de *TcOYE* y *TcAKR* en *T. cruzi*

Se estudió la expresión de *TcOYE* y *TcAKR* en epimastigotas (figura 4.6) empleando diferentes concentraciones de extracto proteico total obtenido durante la fase exponencial de crecimiento como se detalla en materiales y métodos. Los análisis por western blot utilizando los sueros de conejo  $\alpha$ -*TcOYE* y  $\alpha$ -*TcAKR* resultaron en la obtención de bandas únicas correspondientes a los pesos moleculares esperados para cada una de las proteínas, confirmando que ambas se expresan en el estadio epimastigota. Los sueros pre inmunes no mostraron señal de reconocimiento de las proteínas en estudio, por lo que concluimos que los sueros inmunoreactivos constituyen una buena herramienta para los estudios posteriores. Cabe destacar que se requirió menor concentración de extracto proteico total para detectar *TcOYE*, lo que refleja que concentración intracelular es mayor con respecto a la de *TcAKR*, tal como ya había sido sugerido en estudios proteómicos (Parodi-Talice et al., 2004).

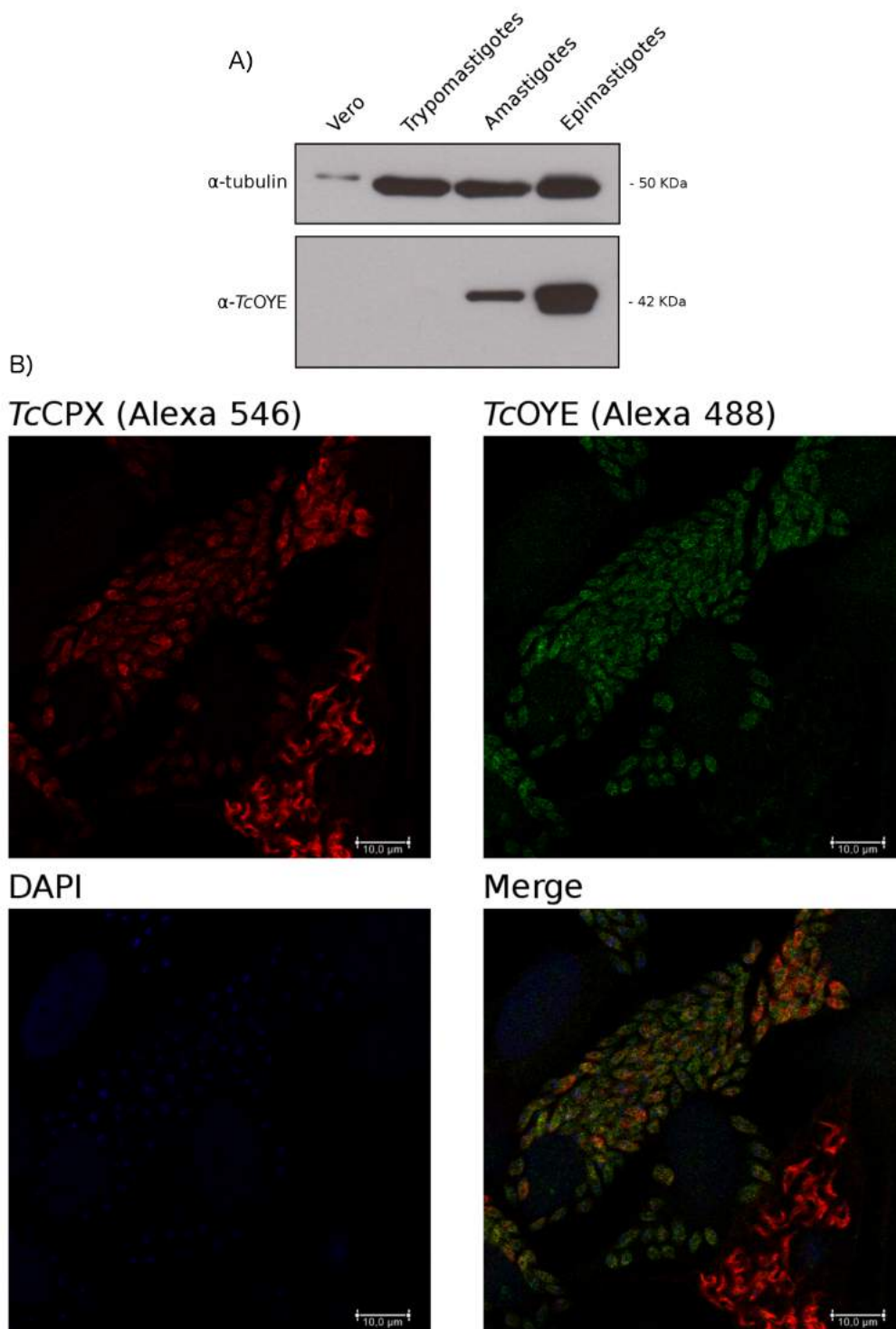




**Figura 4.6: Expresión de *TcOYE* y *TcAKR* en epimastigotas de *T. cruzi*.** Se muestran ensayos de western blot con extractos totales de proteínas de epimastigotas utilizando suero  $\alpha$ -*TcOYE* y  $\alpha$ -*TcAKR* generados en conejos. El anticuerpo secundario empleado fue  $\alpha$ -conejo conjugado a HRP y el revelado fue por quimioluminiscencia.

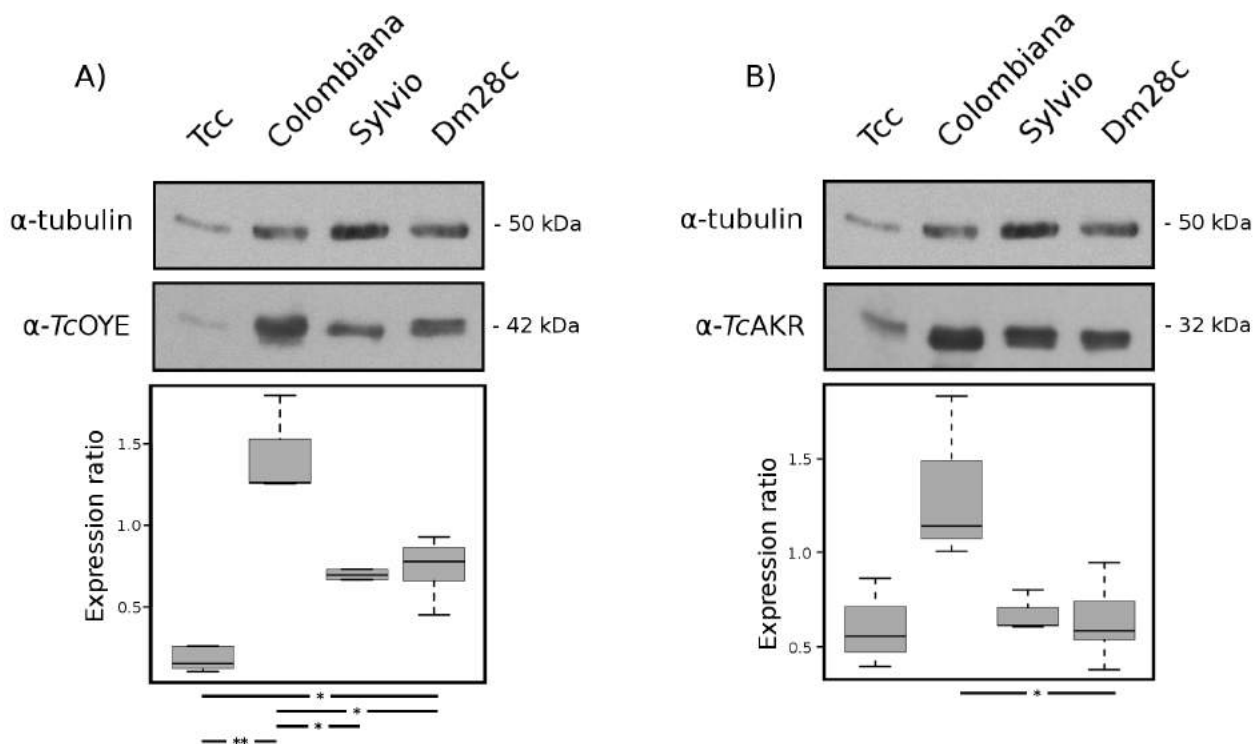
Por otro lado, se evaluó la expresión de *TcOYE* durante el ciclo de vida del parásito por western blot utilizando extractos proteicos totales de diferentes estadios. Mediante la detección de una única banda del tamaño esperado reconocido por el antisuero policlonal producido en conejo, se confirmó la expresión en epimastigotas y amastigotas. En cambio, la proteína mostró niveles casi indetectables en tripomastigotas derivados de células evidenciando una regulación diferencial de la expresión (figura 4.7). A su vez, se estudió la expresión en diferentes estadios mediante IFI durante el proceso de infección. Se llevo a cabo la coimmunolocalización con *TcCPX*, una proteína citosólica y de expresión constitutiva, para comparar los diferentes patrones de expresión. En la figura 4.7 B se muestra una imagen representativa donde se observan dos células infectadas con parásitos que se encuentran en distintos momentos del ciclo infectivo. En la parte inferior derecha se muestra una célula infectada con parásitos que ya están diferenciándose a tripomastigotas, donde se aprecia que la expresión de *TcOYE* disminuye considerablemente y solo se observa la fluorescencia debida a la marcación de *TcCPX*. En la parte superior izquierda se muestra una célula que presenta parásitos predominantemente en el estadio amastigota, con expresión comparable de ambas proteínas. Los antisueros no presentaron reactividad cruzada con el extracto total de células Vero. Se confirmó por dos técnicas diferentes que *TcOYE* presenta mayor expresión en los estadios replicativos del parásito.

Dado que el objetivo de este trabajo plantea el estudio de *TcOYE* y *TcAKR* en el contexto de la infección, se evaluó la expresión de ambas proteínas en cepas de *T. cruzi* que presentan diferente virulencia. La expresión en diferentes cepas de *T. cruzi* se analizó mediante western blot utilizando extractos proteicos totales de epimastigotas. TCC es una cepa atenuada, Colombiana es una cepa muy virulenta mientras que Sylvio y Dm28c son cepas con virulencia



**Figura 4.7: Expresión de *TcOYE* durante el ciclo de vida del parásito.** A) Western blot utilizando extractos totales de proteínas de diferentes estadios del parásito y células Vero (control). La expresión relativa se estimó por densitometría normalizada por la expresión de tubulina. B) Microfotografías confocales que muestran coimmunolocalización de *TcOYE* y *TcCPX* en diferentes etapas del desarrollo de la infección en células Vero. Barra de calibración 10  $\mu$ m.

intermedia. Los sueros de conejos contra *TcOYE* y *TcAKR* reconocieron una banda de 42 kDa y 32 kDa en todas las cepas, respectivamente (figura 4.8). El boxplot de la figura A muestra que la expresión de *TcOYE* en Colombiana es mayor con respecto a TCC, Dm28c y Sylvio (p-Valor 0.0095, 0.0159 y 0.0159 respectivamente). Además, TCC presenta una menor expresión de *TcOYE* que Dm28c (p-Valor 0.0303). No hay diferencias estadísticamente significativas entre TCC y Sylvio, y ni entre Dm28c y Sylvio. Por otro lado, el boxplot de la figura B muestra que *TcAKR* presenta una mayor expresión en Colombiana con respecto a Dm28c (p-valor 0.0357), siendo ésta la única diferencia estadísticamente significativa entre las cepas. La expresión relativa mostrada en los boxplot corresponde a la expresión estimada por densitometría normalizada por la expresión de tubulina.

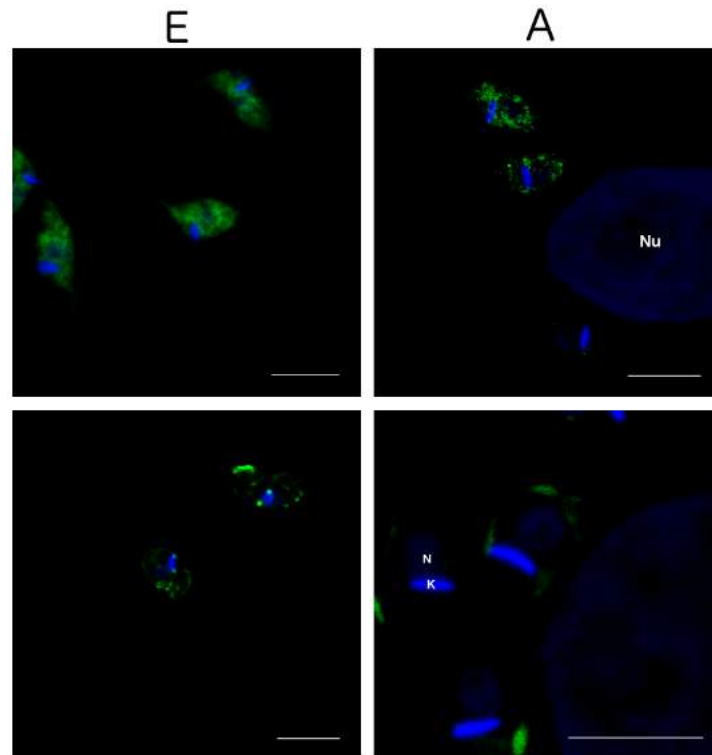


**Figura 4.8: Expresión de *TcOYE* y *TcAKR* en cepas de *T. cruzi* con diferente virulencia.** A) Western blot con suero  $\alpha$ -*TcOYE* normalizado por la expresión de tubulina y boxplot con los valores de expresión medidos por densitometría a través de 4 experimentos. B) Western blot con suero  $\alpha$ -*TcAKR* normalizado por la expresión de tubulina y boxplot con los valores de expresión medidos por densitometría a través de 3 experimentos. Para ambos casos se determinó la significancia estadística (p-valor <0,05) utilizando la prueba de Mann Whitney.

#### 4.3.2. Localización subcelular de *TcOYE* y *TcAKR* en *T. cruzi*

Con el objetivo de determinar la localización subcelular de *TcOYE* y *TcAKR* se realizaron inmunocitocalizaciones sobre parásitos obtenidos de cultivo. En el caso de *TcOYE* además se realizaron ensayos de western blot con extractos obtenidos con una técnica de permeabilización

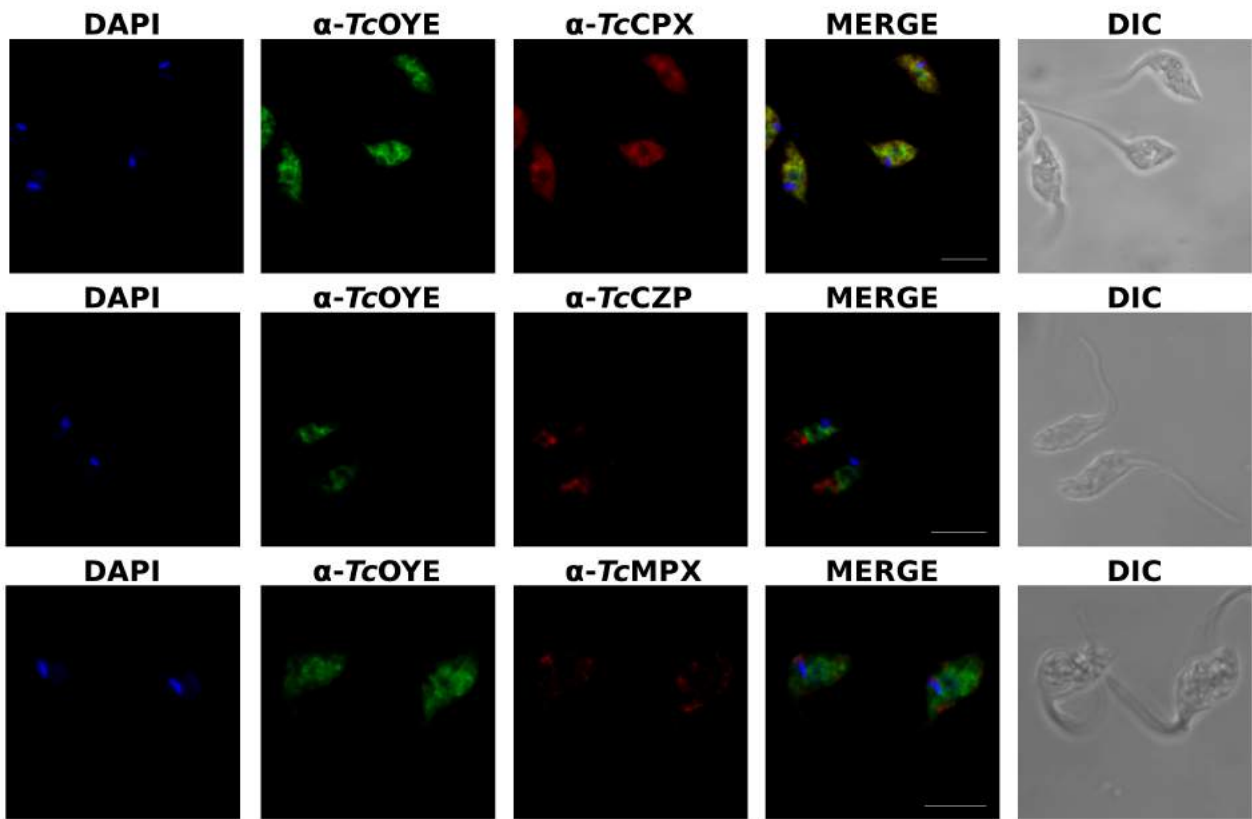
diferencial de membranas celulares. La figura 4.9 muestra la localización de *TcOYE* y *TcAKR* en amastigotas intracelulares y epimastigotas. La IFI realizada con los anticuerpos  $\alpha$ -*TcOYE* muestra que la proteína se localiza en el citoplasma, con un aspecto más granular en amastigotas. Por otro lado, la IFI realizada con los anticuerpos  $\alpha$ -*TcAKR* revela que se localiza en el sitio antipodal del kinetoplasto en epimastigotas aunque no exclusivamente. Sin embargo, su localización cambia en amastigotas, concentrándose en una región próxima al kinetoplasto rodeando el núcleo.



**Figura 4.9: Inmunocitlocalización de *TcOYE* y *TcAKR* en epimastigotas y amastigotas de *T. cruzi*.** Proyecciones de varias imágenes obtenidas en el eje Z en microscopio confocal. Los parásitos fueron incubados con una dilución 1/3000 del suero  $\alpha$ -*TcOYE* (micrografías superiores) y 1/30 del suero  $\alpha$ -*TcAKR* (micrografías inferiores) obtenidos en conejos. El revelado se hizo con anticuerpos secundarios  $\alpha$ -conejo conjugado a Alexa Fluor®488. Se utilizó DAPI como marcador de núcleo y kinetoplasto. Referencia: Nu núcleo de célula infectada; N núcleo de parásito; K kinetoplasto. Barra de calibración 5  $\mu$ m.

Para determinar en mayor detalle la localización subcelular de *TcOYE* y *TcAKR*, se realizaron ensayos de colocalización con tres proteínas de localización subcelular conocida: tripartidoxina peroxidasa citosólica (*TcCPX*), tripartidoxina peroxidasa mitocondrial (*TcMPX*) y cruzipaina (*TcCZP*). *TcCPX* y *TcMPX* presentan localización citosólica y mitocondrial, respectivamente (Wilkinson et al., 2000), mientras que Cruzipaina se utiliza como marcador de reservosomas, un organelo vacuolar rodeado de membrana presente en la región posterior del parásito (Cazzulo et al., 1997). La marcación con anticuerpos  $\alpha$ -*TcOYE* mostró un patrón citoplasmático, colocalizando con la marcación debida a *TcCPX*. Por otro lado, la marcación

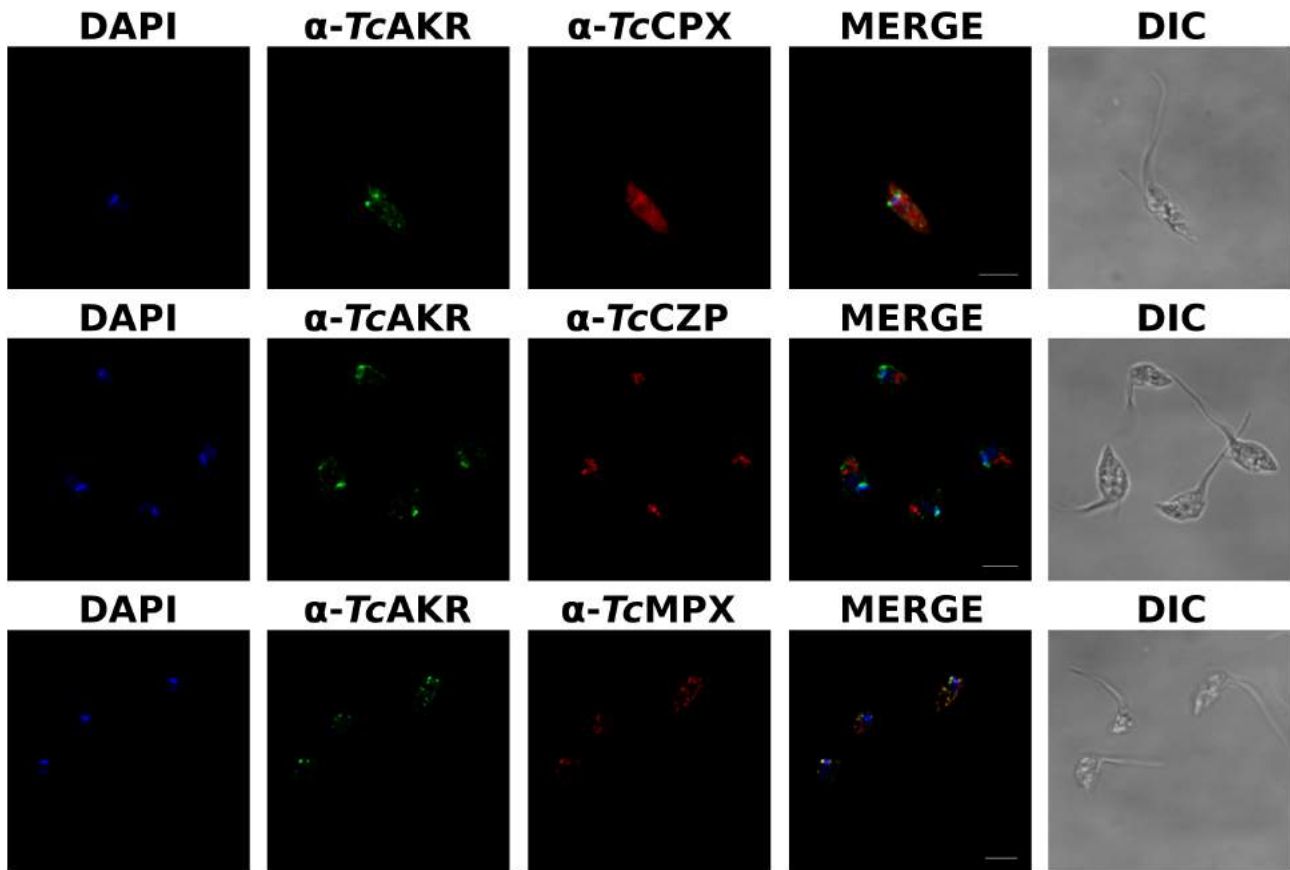




**Figura 4.10:** Inmunocitocalización de *TcOYE*, *TcCPX*, *TcCZP* y *TcMPX* en epimastigotas de *T. cruzi*. Micrografía de confocal de epimastigotas obtenidos de cultivo. Los parásitos fueron incubados con una dilución 1/3000 del anticuerpo  $\alpha$ -*TcOYE* obtenido en conejo. Para el caso de *TcCPX* (dilución 1/100), *TcCZP* (dilución 1/50) y *TcMPX* (dilución 1/100) se usaron sueros obtenidos en ratón. El revelado se hizo con anticuerpos secundarios  $\alpha$ -conejo conjugado a Alexa Fluor®488 y  $\alpha$ -ratón conjugado con Cy3®. Se utilizó DAPI como marcador de núcleo y kinetoplasto. Barra de calibración 5  $\mu$ m.

observada cuando se empleó el anticuerpo  $\alpha$ *TcAKR* colocalizó con la marcación de *TcMPX*. Si bien hay colocalización de *TcAKR* con *TcMPX* en la mayor parte de la marcación debida a *TcMPX*, esta última no está localizada en los sitios antipodales del kinetoplasto, siendo esta localización exclusiva de *TcAKR*. El anticuerpo  $\alpha$ *TcCZP* mostró una marcación concentrada en la región posterior de los epimastigotas en formas redondeadas, no colocalizando con la marca correspondiente a *TcOYE* ni a *TcAKR*. En las figuras 4.10 y 4.11 se muestran las proyecciones de varias imágenes obtenidas en el eje z en microscopio confocal.

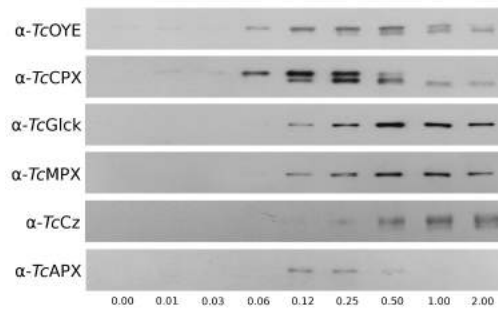
Para complementar los resultados de la IFI y completar el estudio de localización celular de *TcOYE* se realizó un ensayo de permeabilización diferencial de membranas con el detergente suave digitonina. Los extractos obtenidos se analizaron por western blot empleando el suero contra *TcOYE* y sueros contra proteínas de localización subcelular conocida para comparar los diferentes patrones de bandas. En la figura 4.12 se muestra que las bandas proteicas correspondiente a proteínas con diferente localización subcelular aparecen diferencialmente conforme la



**Figura 4.11: Inmunocitocalización de *TcAKR*, *TcCPX*, *TcCZP* y *TcMPX* en epimastigotas de *T. cruzi*.** Micrografías de confocal de epimastigotas obtenidos de cultivo. Los parásitos fueron incubados con una dilución 1/30 del anticuerpo  $\alpha$ -*TcAKR* obtenido en conejo. Para el caso de *TcCPX* (dilución 1/100), *TcCZP* (dilución 1/50) y *TcMPX* (dilución 1/100) se usaron sueros obtenidos en ratón. El revelado se hizo con anticuerpos secundarios  $\alpha$ -conejo conjugado a Alexa Fluor®488 y  $\alpha$ -ratón conjugado con Cy3®. Se utilizó DAPI como marcador de núcleo y kinetoplasto. Proyecciones de varias imágenes obtenidas en el eje Z en microscopio confocal. Barra de calibración 5  $\mu$ m.

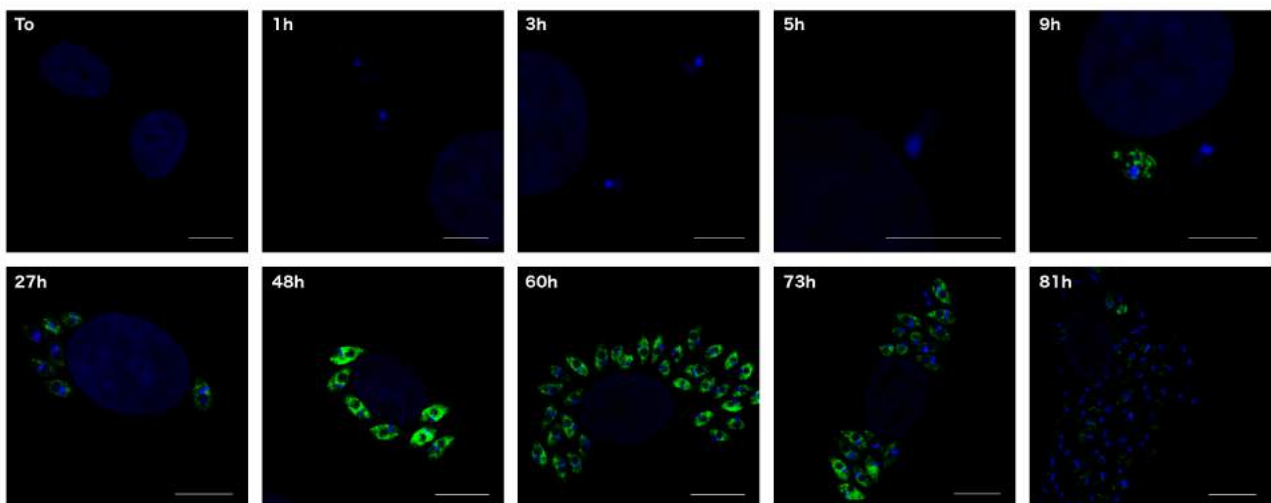
concentración del detergente aumenta. Como es de esperar, la banda proteica correspondiente a *TcCPX* se detecta a bajas concentraciones de digitonina. Al ser una proteína citoplasmática queda expuesta apenas la membrana plasmática es irrupida por el detergente. En segundo lugar se detectan las bandas proteicas correspondientes a glucokinasa (*TcGlck*), *TcMPX* y ascorbato peroxidasa (*TcAPX*), todas proteínas que se encuentran en compartimentos rodeados por membrana dentro de la célula, glicosomas (Cáceres et al., 2007), mitocondria (Wilkinson et al., 2000) y retículo endoplasmático (Wilkinson et al., 2002), respectivamente. En estos casos se requiere una mayor concentración de digitonina para poder detectar las bandas dado que se debe afectar primero la membrana plasmática y luego la membrana de los organelos que contienen estas proteínas. Por último, se detecta la banda proteica correspondiente a *TcCZP*, proteína contenida principalmente en los reservosomas. En el caso de *TcOYE* las bandas proteicas se detectan a muy bajas concentraciones del detergente, coincidiendo con las concentraciones en las cuales se detecta *TcCPX*. Por lo que, en concordancia a lo que se observó mediante IFI, *TcOYE* presenta un localización subcelular citoplasmática.

Debido a que se vió que *TcOYE* disminuye su expresión en tripomastigotas se estudió como



**Figura 4.12: Localización subcelular de *TcOYE* en epimastigotas de *T. cruzi*.** Western blot de extractos proteicos obtenidos luego de un ensayo de permeabilización diferencial de membranas con digitonina en epimastigotas. Se usó anticuerpos contra *TcOYE* y varias proteínas de localización subcelular conocida:  $\alpha$ -*TcCPX* (dilución 1/20000),  $\alpha$ -*TcGlck* (dilución 1/2000),  $\alpha$ -*TcMPX* (dilución 1/2000),  $\alpha$ -*TcCz* (dilución 1/1000) y  $\alpha$ -*TcAPX* (dilución 1/4000). Concentraciones de digitonina en mg/ml.

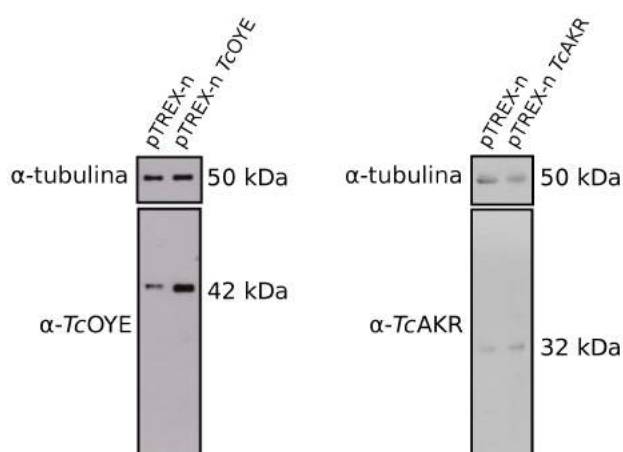
varía la expresión a lo largo del ciclo infectivo a células Vero. Se realizaron infecciones en una relación 5:1 (parásitos:células) con tripomastigotas derivados de células *wild type* y se fijaron a diferentes tiempos para evaluar por IFI. La imágenes fueron obtenidas en microscopio confocal con un ajuste fijo de los parámetros para que las imágenes sean comparables entre sí. En la figura 4.13 se muestra que en los primeros tiempos de infección la expresión tiene niveles indetectables según las condiciones ensayadas. A las 9 horas después de la interacción parásito-célula se comienza a detectar la proteína. A medida que los parásitos se diferencian al estadio amastigota se observa que la expresión de *TcOYE* aumenta y es máxima a las 48 horas. Luego, cuando los parásitos vuelven a diferenciarse a tripomastigotas la expresión de la proteína vuelve a disminuir a niveles indetectables.



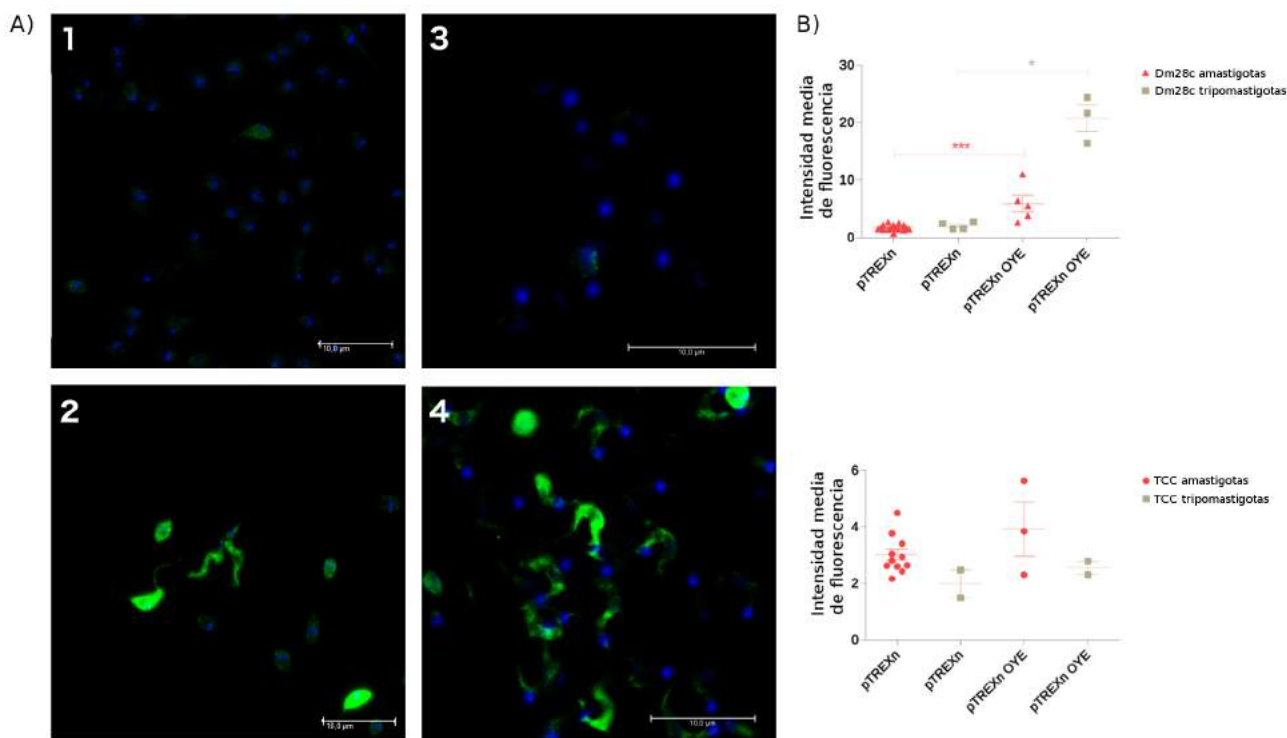
**Figura 4.13: Expresión de *TcOYE* en el ciclo infectivo de *T. cruzi* a células de mamífero.** Micrografías de confocal de infecciones fijadas a diferentes tiempos. Barra de calibración 5  $\mu$ m en 1h, 3h, 5h y 9h; barra de calibración 10 $\mu$ m en el resto de los tiempos. Proyecciones de varias imágenes obtenidas en el eje Z en microscopio confocal.

### 4.3.3. Sobreexpresión de *TcOYE* y *TcAKR* y ensayos de infectividad

A modo de contar con más herramientas que permitan comprender mejor la función biológica de estas enzimas se realizó la sobreexpresión en epimastigotas en cultivo. Los clonados de las secuencias codificantes para *TcOYE* y *TcAKR* en vectores de expresión se realizaron durante la tesina de grado. Las construcciones utilizadas en este trabajo fueron: pTREX-n *TcOYE*, pTREX-n *TcAKR* y pTREX-*TcAKR*. Ambos vectores son de expresión constitutiva y se integran al genoma. Estos plásmidos se transfectaron en parásitos Dm28c de *T. cruzi* y para el caso de pTREX-n *TcOYE* también se transfectó en TCC. La sobreexpresión de las proteínas en epimastigotas se analizó por western blot con anticuerpos  $\alpha$ -*TcOYE* y  $\alpha$ -*TcAKR* en extractos totales de parásitos transfectados con el vector pTREX-n *TcOYE* y pTREX-n *TcAKR*, respectivamente (figura 4.14). La expresión relativa de ambas proteínas se estimó por densitometría normalizada por la expresión de tubulina y se determinó que *TcOYE* se expresa 6 veces más que en los parásitos control y *TcAKR* 2,4 veces. La sobreexpresión en tripomastigotas derivados de células y amastigotas extracelulares se analizó mediante IFI. En la figura 4.15 A se muestran micrografías confocal de IFI realizadas sobre parásitos Dm28c sobreexpresantes de ambas proteínas y parásitos control. Se observa que la sobreexpresión de *TcOYE* y *TcAKR* se mantiene en los estadios tripomastigotas y amastigotas. Por otro lado, en la figura 4.15 B se muestra la cuantificación de la expresión de *TcOYE* en parásitos sobreexpresantes Dm28c y TCC. Las diferencias estadísticas se determinaron con la prueba paramétrica test de Student. Las curvas de crecimiento de las líneas celulares transfectadas mostraron una cinética de proliferación similar, lo cual indica que la sobreexpresión de *TcOYE* y *TcAKR* no genera un fenotipo distinguible del salvaje, es decir no tiene ningún efecto perjudicial ni beneficioso sobre la proliferación de epimastigotas (datos no mostrados).



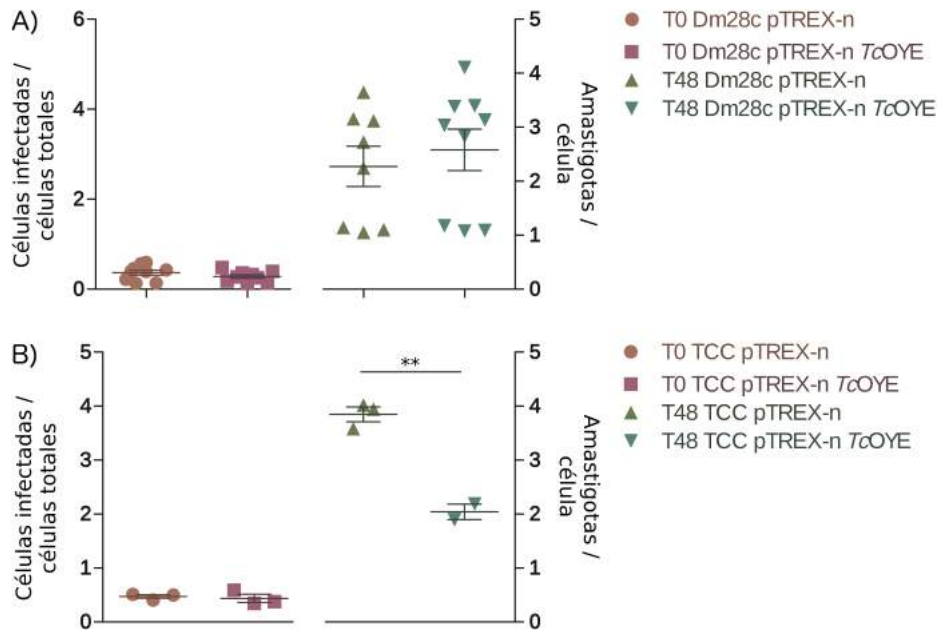
**Figura 4.14: Sobreexpresión de *TcOYE* y *TcAKR* en epimastigotas de *T. cruzi*.** Western blot de extractos proteicos totales de parásitos transfectados con los vectores pTREX-n, pTREX-n *TcOYE* y pTREX-n *TcAKR*. La expresión relativa se estimó por densitometría normalizada por la expresión de tubulina.



**Figura 4.15: Sobreexpresión de *TcOYE* y *TcAKR* en tripomastigotas y amastigotas extracelulares de *T. cruzi*.** A) Micrografías confocal de parásitos transfectados con los vectores pTREX-n (1 y 3), pTREX-n *TcOYE* (2) y pTREX-n *TcAKR* (4) incubados con anticuerpo  $\alpha$ -*TcOYE* y  $\alpha$ -*TcAKR*, respectivamente. Se utilizó anticuerpos secundarios  $\alpha$ -conejo conjugado a Alexa Fluor®488 y DAPI como marcador de núcleo y kinetoplasto. Barra de calibración 10  $\mu$ m. Proyecciones de varias imágenes obtenidas en el eje Z. B) Cuantificación de la sobreexpresión de *TcOYE* en Dm28c y TCC de los diferentes estadios, medida por intensidad de fluorescencia media por parásito utilizando el programa ICY.

Con el objetivo de estudiar el rol de *TcOYE* en el proceso de infección a células de mamífero se comparó la capacidad infectiva de los parásitos sobreexpresantes con respecto a los parásitos control. La capacidad infectiva se evaluó como la capacidad de invasión (mediante la determinación del coeficiente de infección) y la capacidad replicativa. El coeficiente de infección se determinó contando el número de células infectadas con respecto al número de células totales a tiempo cero, mientras que la tasa de replicación se determinó contando el número de parásitos intracelulares después de 48 horas de infección. Se consideró tiempo cero el momento que se lava la infección para retirar los parásitos que no infectaron ninguna célula luego del tiempo de interacción parásito célula. En la figura 4.16 A se muestran los resultados obtenidos para parásitos Dm28c control y sobreexpresantes, donde se observa que la sobreexpresión de *TcOYE* no afectó la capacidad infectiva de los parásitos a células HeLa. El aumento de la cantidad de proteína tampoco modificó la tasa de replicación de los parásitos a las 48 horas de infección. Estos resultados corresponden a tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Por otro lado, en la figura 4.16 B se muestran los resultados obtenidos para parásitos TCC transfectados, donde se observa que la sobreexpresión de *TcOYE* no modificó la capacidad invasiva pero sí disminuyó la cantidad de parásitos intracelulares a las 48 horas. Sin embargo,

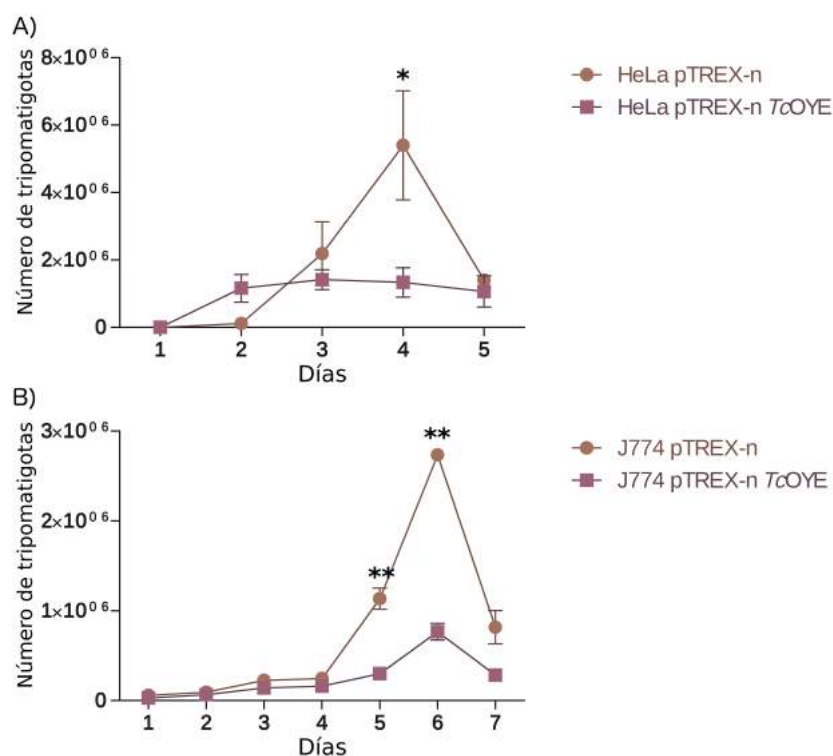
este resultados debe completarse con más réplicas dado que corresponde a una réplica biológica con tres réplicas técnicas.



**Figura 4.16: Ensayos de infección a células de mamíferos.** Se grafica el coeficiente de infección a tiempo cero y el número de amastigotas luego de 48 horas de infección para parásitos Dm28c y TCC sobreexpresantes de *TcOYE* y parásitos control. Se utilizó el test Student con dos colas para determinar las diferencias estadísticas y las barras error corresponden al error estándar. \*\* p-valor 0,0031

Para evaluar el proceso de infección celular completo se determinó el número de tripomastigotas presentes en el sobrenadante de monocapas de células infectadas cada 24 horas. En la figura 4.17 A se muestra el número de tripomastigotas presentes en el sobrenadante durante 5 días a partir del día que empiezan a salir de las células. Se determinó que la cantidad de tripomastigotas en el sobrenadante de células infectadas con parásitos control era 4 veces mayor que la cantidad de tripomastigotas en el sobrenadante de células infectadas con los parásitos sobreexpresantes. Esta diferencia fue estadísticamente significativa con un p-valor 0,044. En la figura 4.17 B se muestran los resultados utilizando células fagocíticas. Se determinó que la cantidad de tripomastigotas en el sobrenadante de células infectadas con parásitos control era 3,5 veces mayor que la cantidad de tripomastigotas en el sobrenadante de células infectadas con los parásitos sobreexpresantes. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa en los días 5 y 6 con un p-valor 0,0037 y 0,0006, respectivamente. Las gráficas son representativas de dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. De estos resultados se puede concluir que mayores niveles de *TcOYE* reducen la cantidad de parásitos capaces de completar el ciclo infectivo con respecto a los parásitos control.

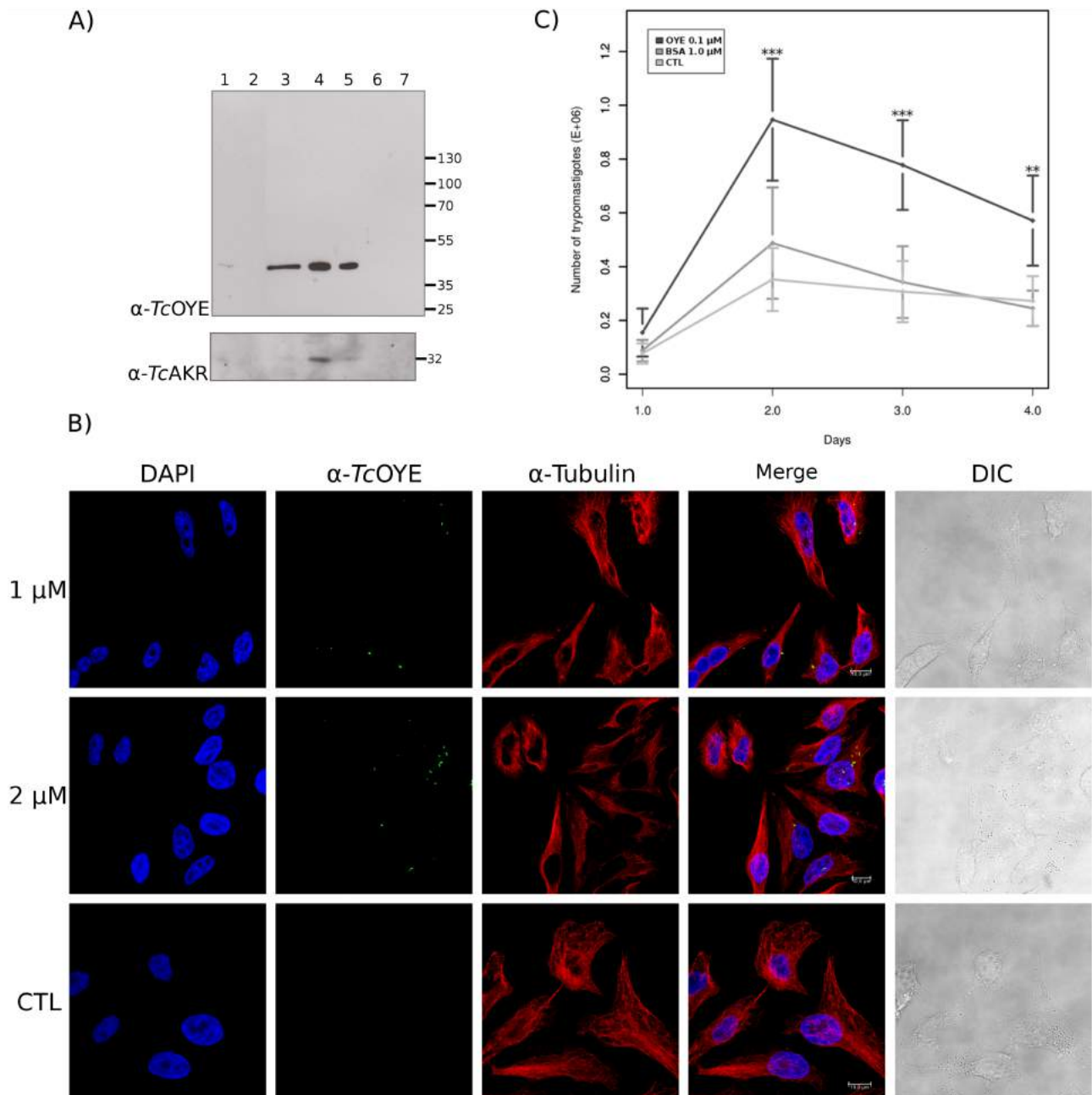




**Figura 4.17: Ensayos de infección a células de mamíferos.** Número de tripomastigotas por ml de sobrenadante de células HeLa y macrófagos J774 infectados con parásitos control y parásitos sobreexpresantes de *TcOYE*. Se grafica la media de las diferentes réplicas realizadas y las barras de error corresponden al error estándar.

#### 4.3.4. Estudios de secreción de *TcOYE* y *TcAKR*

Teniendo en cuenta que ambas proteínas se detectaron en estudios proteómicos del secretoma, tanto en nuestro laboratorio (resultados no publicados) como por Bayer-Santos et al. (2013) y Geiger et al. (2010), en esta tesis se estudió la secreción de ambas proteínas en el estadio epimastigota mediante western blot. En la figura 4.18 A se puede apreciar que ambas proteínas fueron reconocidas por los anticuerpos específicos correspondientes en extractos proteicos extracelulares, confirmando su secreción. Se detectó una banda de peso molecular esperado para *TcOYE* y *TcAKR* tanto en la fracción de proteínas secretadas en condiciones normales de crecimiento en cultivo (carril 1) como en las fracciones de proteínas secretadas en condición de estrés nutricional (carriles 3, 4 y 5). El carril 4 corresponde a complejos macromoleculares mientras que el carril 5 corresponde a vesículas extracelulares grandes (100-200 nm) según lo reportado por Bayer-Santos y colaboradores (Bayer-Santos et al., 2013). Ninguna de las proteínas se detectó en la fracción libre de vesículas (carril 6, SN3), por lo que la secreción de *TcOYE* y *TcAKR* estaría asociada a vesículas extracelulares. Se concluye que ambas enzimas se secretan en condiciones normales de crecimiento en cultivo como en estrés nutricional, y en esta última condición se secretan asociadas a vesículas. En la figura 1 del Anexo se esquematiza el proceso de obtención de las diferentes fracciones.



**Figura 4.18: Estudios de secreción de *TcOYE* y *TcAKR*.** A) Western blot de los extractos proteicos obtenidos en los diferentes pasos del proceso de purificaciones de vesículas extracelulares bajo condiciones de estrés nutricional y extracto proteico de sobrenadante de cultivo sin estrés nutricional (sección 3.9 de Materiales y Métodos). Referencias: 1-extracto proteico de sobrenadante de cultivo de epimastigotas sin estresar; 2-extracto proteico del medio de cultivo, control; 3-material de partida (SN1); 4-*Pellet* 1; 5-*Pellet* 2; 6-SN3; 7-SN2. B) Inmunolocalización de *TcOYE* en células Vero. Se muestran micrografías de confocal de células control que no fueron incubadas con la proteína y células incubadas con 1 ó 2  $\mu$ M de proteína recombinante. Las células se incubaron con anticuerpo  $\alpha$ -*TcOYE* de conejo y  $\alpha$ -Tubulina de ratón. El revelado se realizó con anticuerpos secundarios  $\alpha$ -conejo conjugado a Alexa Fluor®488 y  $\alpha$ -ratón conjugado con Cy3®. Se utilizó DAPI como marcador de núcleo. Barra 10  $\mu$ m. C) Conteo de tripomastigotas en sobrenadante de monocapa de células infectadas pre tratadas con *TcOYE*, BSA como proteína control o células que no tuvieron ningún pre tratamiento. Se determinó la significancia estadística (p-valor <0,05) utilizando el test Mann-Whitney seguido del test de Bonferroni. Referencias: p-valor < 0,01 \*\*; p-valor < 0,001 \*\*\*



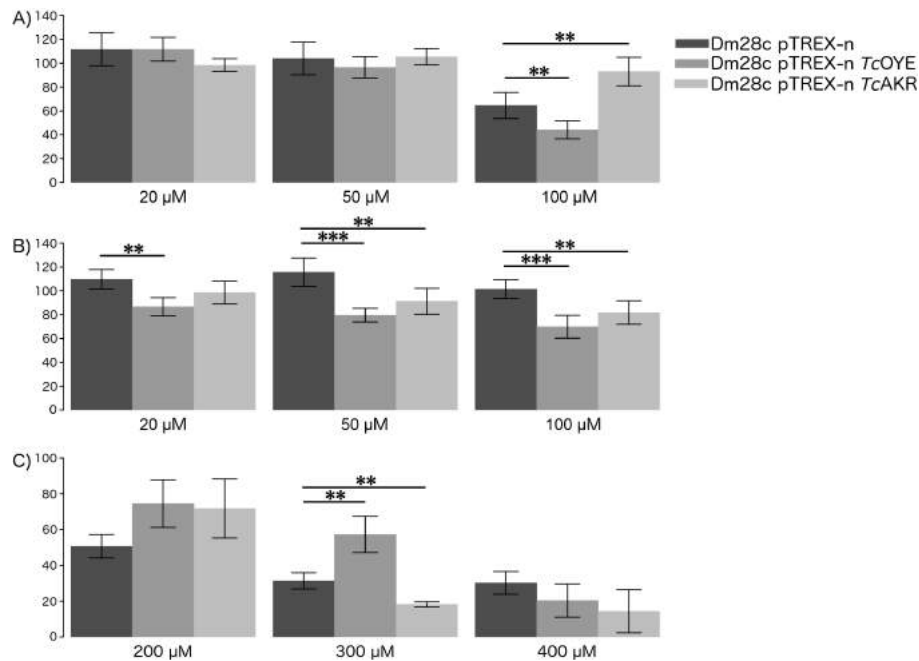
Una vez confirmada la secreción de *TcOYE* se estudió si la proteína recombinante podía ser internalizada por células HeLa. Se incubaron las células con diferentes concentraciones de la proteína y se fijaron para analizar por IFI con el anticuerpo  $\alpha$ -tubulina y  $\alpha$ -*TcOYE* (figura 4.18 B). Se observó que la localización de la proteína luego de 3 horas de interacción fue intracelular, no habiendo reactividad cruzada del anticuerpo  $\alpha$ -*TcOYE* con ningún componente celular. Posteriormente, para estudiar el efecto de la proteína internalizada en la infección por *T. cruzi* se pre incubó la proteína recombinante y se realizó la infección de células HeLa con tripomastigotas *wild type*. En la figura 4.18 C se muestra el número de parásitos en el sobrenadante de la infección que completaron el ciclo intracelular medido cada 24 horas. Como control se realizó la infección a células que no fueron pre incubadas con ninguna proteína y células que fueron pre incubadas con BSA. La presencia de la proteína *TcOYE* recombinante previo y durante la infección produjo un aumento en la cantidad de tripomastigotas en el sobrenadante indicando que el efecto de la proteína del parásito promueve la infectividad de manera estadísticamente significativa. Este resultado corresponde a tres experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno.

#### 4.3.5. Metabolismo de fármacos y oxidantes

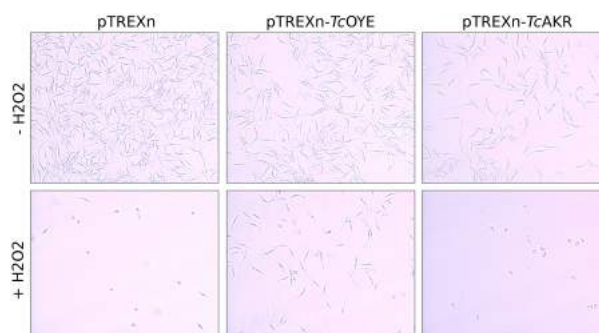
Como se mencionó en la Introducción ambas proteínas han sido relacionadas con el metabolismo de fármacos tripanocidas. *TcOYE* recombinante es capaz de reducir Nfx y  $H_2O_2$  *in vitro* en condiciones anaeróbicas, pero no así a Bzn (Kubata et al., 2002b). Contrariamente, se observó que los niveles de transcripto y proteína disminuyen en parásitos resistentes a Bzn debido a la pérdida de tres copias del gen (Murta et al., 2006). Por otro lado, *TcAKR* es capaz de unirse a Bzn *in vitro* (Trochine et al., 2014a) y ambas proteínas fueron propuestas como posibles enzimas encargadas de la generación de metabolitos reducidos del Bzn (Trochine et al., 2014b). Además, la sobreexpresión de *TcAKR* le confirió resistencia a Bzn (Garavaglia et al., 2016). Dados estos antecedentes, se estudió el efecto de Bzn, Nfx y  $H_2O_2$  en epimastigotas sobreexpresantes de *TcOYE* y *TcAKR*. Los parásitos se cultivaron en PBS-glucosa al 1% suplementado con concentraciones crecientes de Bzn, Nfx y  $H_2O_2$ .

En la figura 4.19 A se muestra los porcentajes de viabilidad de los parásitos a diferentes concentraciones de Bzn. A 100  $\mu$ M se observan diferencias estadísticamente significativas entre los parásitos sobreexpresantes y los parásitos control. Los epimastigotas sobreexpresantes de *TcOYE* presentaron mayor susceptibilidad que los parásitos control. En cambio, la sobreexpresión de *TcAKR* le confirió resistencia al mismo fármaco, tal como había sido reportado por Garavaglia y colaboradores (Garavaglia et al., 2016). Por otra parte, en la figura 4.19 B se muestra que ambos parásitos sobreexpresantes presentaron mayor sensibilidad a Nfx que los parásitos control en todas las concentraciones ensayadas. Por último, teniendo en cuenta que fue descrito que *TcOYE* reduce  $H_2O_2$  en anaerobiosis, se determinó la viabilidad de parásitos

transfectantes frente a  $H_2O_2$ . La exposición a este oxidante mostró que los parásitos con mayores niveles de *TcOYE* fueron más resistentes (figura 4.19 C). En todos los casos se grafica los porcentajes de viabilidad celular con respecto a los parásitos sin tratamiento. Los resultados de Bzn y Nfx corresponden a 3 réplicas biológicas con 4 réplicas técnicas mientras que los resultados de  $H_2O_2$  corresponden a una réplica biológica con 3 réplicas técnicas, por lo que este resultado debe ser confirmado con más experimentos independientes. Durante la realización de los experimentos se observaron cambios morfológicos como se muestran en la figura 4.20.



**Figura 4.19: Viabilidad celular luego del tratamiento con Bzn, Nfx y  $H_2O_2$ .** Se muestran los porcentajes de viabilidad medidos con el método resazurina luego de exponer los parásitos 24 horas a distintas concentraciones de A) Bzn y B) Nfx. C) Porcentajes de viabilidad medidos con el método resazurina luego de exponer los parásitos 48 horas a distintas concentraciones de  $H_2O_2$ . Las barras de error corresponden al error estándar.



**Figura 4.20: Efecto del  $H_2O_2$  en parásitos transfectantes.** Se muestran micrografías en donde se observa el efecto de 200  $\mu M$  de  $H_2O_2$  luego de 24 horas sobre parásitos epimastigotas control (pTRES-n) o sobreexpresantes de *TcOYE* y *TcAKR*.

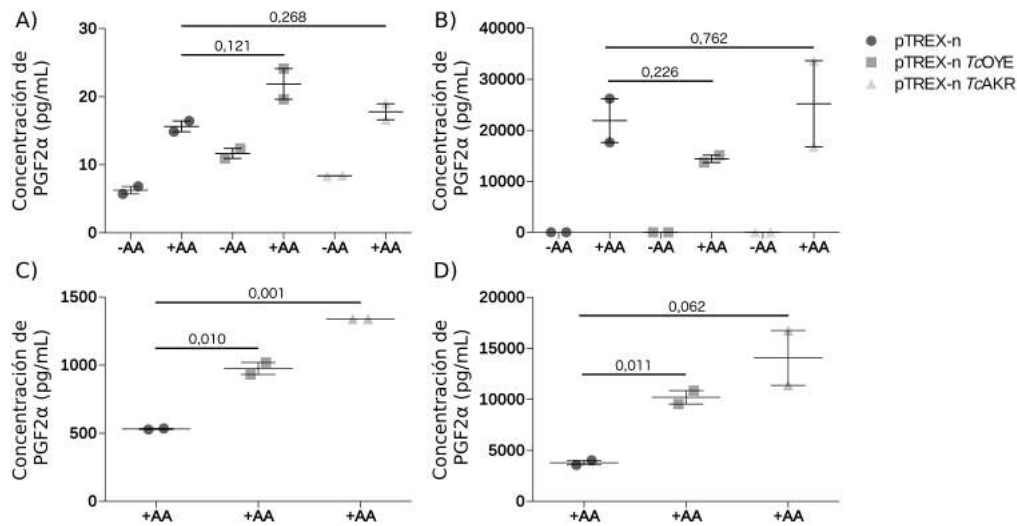
### 4.3.6. Producción de $\text{PGF}_2\alpha$

La actividad  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa ha sido demostrada experimentalmente en *TcOYE* (Kubata et al., 2002b; Ashton et al., 2007) y no en *TcAKR* (Garavaglia et al., 2010). Sin embargo, los resultados de bioinformática estructural obtenidos en esta tesis sugieren que *TcAKR* tiene actividad  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa. Para profundizar en este aspecto se evaluó si la sobreexpresión de *TcOYE* y *TcAKR* presenta una correlación con el aumento en la actividad  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa en *T. cruzi*. En particular, se determinó la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  intracelular, así como la concentración en el sobrenadante de parásitos epimastigotas y tripomastigotas luego de un estímulo exógeno de AA. Como control se determinó la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  sin el agregado de AA. La cuantificación se realizó empleando un kit de ELISA comercial tal como se detalla en materiales y métodos (sección 3.11).

Para el análisis de los resultados se ajustaron los datos de la curva estándar a una sigmoide simétrica (4PL) y los parámetros obtenidos de esta regresión se utilizaron para calcular la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  en cada una de las muestras. En la figura 4.21 se graficaron los valores de concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  correspondientes a dos réplicas. Las figuras A y B muestran la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  intracelular y en el sobrenadante de epimastigotas, respectivamente. Si bien se observan diferencias en los parásitos con el agregado de AA, no se observan diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de  $\text{PGF}_2\alpha$  entre los parásitos transfectados con las diferentes construcciones. Por otro lado, en las figuras C y D se muestran los valores de concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  intracelular y en el sobrenadante de tripomastigotas, respectivamente. Se graficaron solo los valores de  $\text{PGF}_2\alpha$  correspondientes a los parásitos que se incubaron con AA porque en los tripomastigotas que no recibieron el estímulo de AA los niveles de  $\text{PGF}_2\alpha$  resultaron ser indetectables con el método empleado. Contrariamente a lo que sucede en epimastigotas, en tripomastigotas sí se observan diferencias estadísticamente significativas entre los parásitos sobreexpresantes y los parásitos control. En oposición a lo reportado previamente en la bibliografía, la sobreexpresión de *TcAKR* produce un aumento en la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  con respecto a los parásitos control, incluso mayor al observado cuando se sobreexpresa *TcOYE*. En ambos estadíos se observó que los parásitos incubados con 50  $\mu\text{M}$  de AA presentan mayores cantidades de  $\text{PGF}_2\alpha$  con respecto a los parásitos que no recibieron el estímulo. También se observó que la mayor cantidad de la  $\text{PGF}_2\alpha$  se encuentra en los sobrenadantes, lo que indica que la molécula una vez producida es liberada al medio.

### 4.3.7. Estudios en modelo murino

Debido a la función inmunomoduladora de los eicosanoides descrito en infecciones parasitarias (Mukherjee et al., 2011), se estudió el efecto de la sobreexpresión de *TcOYE* y *TcAKR* en la modulación de la parasitemia y en la afección cardíaca durante la infección aguda. Se realizó una pasantía en el laboratorio “Mecanismos de infección parasitaria” en el Programa

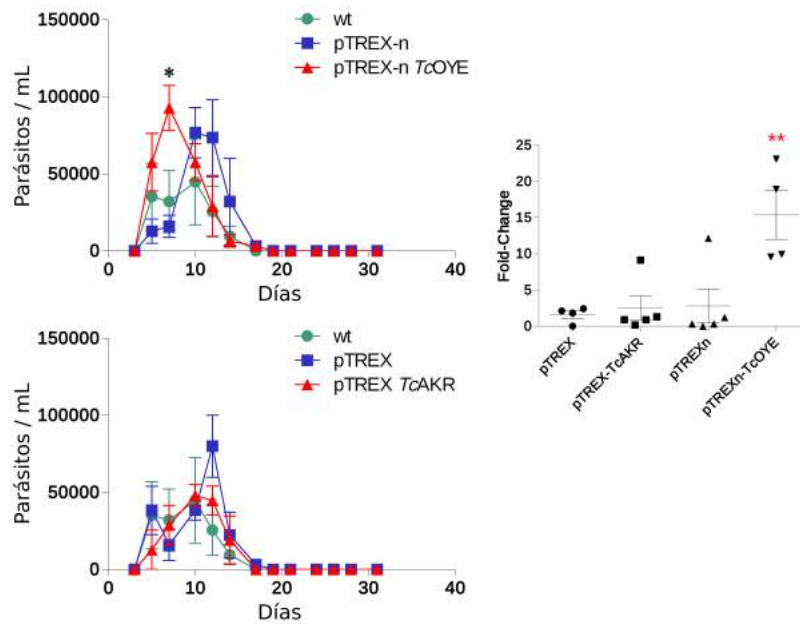


**Figura 4.21: Determinación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .** A) Concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  intracelular en epimastigotas. B) Concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en el sobrenadante de epimastigotas. C) Concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  intracelular en tripomastigotas. D) Concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en el sobrenadante de tripomastigotas. Se muestran los p-valores obtenidos con el test Student con dos colas. Las barras de error corresponden al error estándar.

de Anatomía y Biología del Desarrollo en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile a cargo de la Dra. Ulrike Kemmerling. Durante la misma se realizó la infección intraperitoneal de ratones BALB/c con parásitos sobreexpresantes de las enzimas *TcOYE* y *TcAKR*. Como control se realizó la infección con parásitos *wild type* y parásitos transfectados con el vector vacío.

En primer lugar se midió la parasitemia de los ratones cada tres días durante un mes. Los ratones infectados con los parásitos *wild type* y parásitos transfectados con el vector pTREX-n presentaron un pico de parasitemia entre los días 12-15 (figura 4.22 A). Sin embargo, los ratones infectados con los parásitos que sobreexpresan *TcOYE* presentaron un pico de parasitemia el día 6 siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p-valor 0,0015 con respecto a pTREX-n y 0,0410 con respecto al *wild type*). Por otro lado, la parasitemia en ratones infectados con parásitos sobreexpresantes de *TcAKR* (figura 4.22 B) no presentó diferencias con respecto a la parasitemia de ratones infectados con los parásitos control (pTREX y *wild type*).

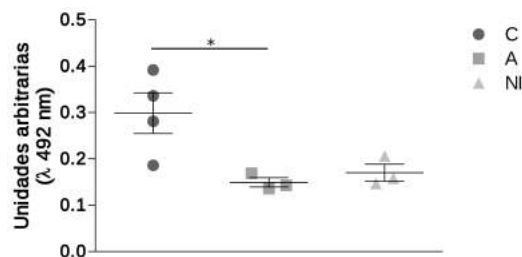
A los 30 días de la infección se obtuvo el corazón de cada uno de los ratones para evaluar la carga parasitaria teniendo en cuenta que es un órgano blanco importante en la enfermedad de Chagas. Los corazones obtenidos se procesaron para la extracción de ADN genómico que luego se utilizó para PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos para *T. cruzi* (TCZ1/TCZ2). La carga parasitaria fue mucho mayor en aquellos ratones que fueron infectados con los parásitos que sobreexpresan la proteína *TcOYE*. La sobreexpresión de la proteína *TcAKR* no afectó la cantidad de parásitos en miocardio durante la infección aguda. Estos resultados corresponden a 5 réplicas biológicas y las diferencias estadísticas se determinaron con el test Student.



**Figura 4.22: Determinación de carga parasitaria en infección *in vivo* con parásitos sobre-expresantes de *TcOYE* y *TcAKR*.** A) Carga parasitaria en sangre medida cada tres días durante la infección aguda. B) Carga parasitaria en corazón determinada mediante PCR cuantitativa a los 30 días de infección. En ambas figuras se grafica la media de cinco réplicas biológicas y las barras de error corresponden al error estándar.

#### 4.3.8. ELISA con suero de pacientes

Mediante estudios proteómicos se describió que *TcOYE* es una de las proteínas reconocidas por sueros de pacientes chagásicos (Verissimo et al., 2013). En este trabajo se buscó la presencia de anticuerpos  $\alpha$ -*TcOYE* mediante ELISA de captura en sueros de pacientes chagásicos. Se sensibilizó con la proteína *TcOYE* recombinante y se utilizaron sueros de pacientes que presentan cardiopatías, pacientes asintomáticos y como control pacientes no infectados. Se observó que los pacientes infectados con *T. cruzi* con cardiopatías presentan un mayor título de IgG con respecto a los pacientes asintomáticos y los no infectados (figura 4.23). Se utilizó el test Student para determinar las diferencias estadísticas.



**Figura 4.23: Detección de IgG en sueros de pacientes  $\alpha$ -*TcOYE*.** Para el revelado de las IgG se utilizó anticuerpos secundarios contra IgG de humanos conjugado a HRP generado en cabra de Santa Cruz Biotechnology (SC2907). Referencias: C pacientes con cardiopatías, A pacientes asintomáticos, NI pacientes no infectados con *T. cruzi*. \* p-valor 0,036.

## 4.4. Discusión

Queda claro en la bibliografía que *TcOYE* y *TcAKR* pueden reducir nitrocompuestos heterocíclicos pero se conoce muy poco acerca de cual es el rol biológico de estas enzimas, qué función cumplen en beneficio del parásito y cuál es su implicancia en la interacción hospedero-patógeno. En este trabajo se presenta una caracterización funcional de estas enzimas. *TcOYE* y *TcAKR* junto con una nitroreductasa de tipo 1 (NTRI) son las proteínas más importantes asociadas al metabolismo de fármacos tripanocidas y las tres presentan actividad quinona oxidoreductasa (Garavaglia et al., 2010; Kubata et al., 2002b; Hall et al., 2012).

Es importante destacar que *TcOYE* se ha identificado en hongos, plantas y bacterias, pero no presenta homólogos en eucariotas superiores, por lo que cumple con una de las características importantes para ser un nuevo blanco terapéutico. Otro requerimiento sería que dicha proteína cumpla un rol esencial para el parásito. Esto contribuye directamente a la relevancia de este proyecto, el cual plantea el estudio biológico de dicha enzima en el contexto de la infección y su potencial como nuevo blanco terapéutico. *TcAKR* se encuentra conservada a lo largo de toda la escala evolutiva, pero al ser proteínas relacionadas estudiarlas en conjunto ayudó a comprender su importancia biológica y determinar si tienen roles redundantes.

Si bien la familia OYE se define por la presencia de un único dominio proteico, la mitad de las secuencias identificadas en tripanosomátidos se encontraron asociadas a otros dominios proteicos, mientras que en no tripanosomátidos éstas corresponden solo a un 5% del total. Esta asociación diferencial con otros dominios podría indicar que OYE cumple funciones moleculares (por ende roles biológicos) muy diversos en protozoos tripanosomátidos. La asociación diferencial con otros dominios no fue observada en la familia AKR probablemente debido a su función más conservada. La ausencia total de pseudogenes de OYE y AKR en tripanosomátidos, a diferencia de lo que ocurre en no tripanosomátidos, sugiere que estas familias tienen relevancia funcional para este grupo de protozoos.

Existen estudios filogenéticos previos utilizando homólogos de *TcOYE* (Stenuit & Agathos, 2010) y *TbPGFS* (Kubata et al., 2000) pero no así de *TcAKR*. De los resultados descritos por Stenuit y colaboradores se deduce que *TcOYE* presenta mayor similitud con sus homólogos de bacterias que de plantas y hongos. Sin embargo, en dicho trabajo no se discute su posible origen evolutivo. El análisis exhaustivo presentado en esta tesis mediante la recuperación de secuencias OYE y AKR de bacterias, archaeas y protozoos, permitió determinar que: i) *TcOYE* sí tiene homólogos en otros tripanosomátidos, y no es exclusiva de *T. cruzi* tal como se había reportado, siendo sus homólogos más cercanos los presentes en los genomas de *T. rangeli* y *T. grayi* (77% y 74% de identidad, respectivamente); y ii) *TcOYE* pertenece a un linaje filogenético que incluye homólogos de otros tripanosomátidos cuyo origen evolutivo probablemente

se debe a un evento de transferencia horizontal interdominio desde bacterias. Sin embargo, la presencia de otros linajes filogénicos conformados por OYEs de bacterias y tripanosomátidos indica que éste no fue el único evento de transferencia horizontal en la historia evolutiva de esta familia. A su vez, la dinámica evolutiva de OYE en no tripanosomátidos parece ser aún más extrema, ya que una gran proporción parece haber emergido a través de transferencias horizontales independientes.

*TcOYE* y *TcAKR* poseen estructuras terciarias muy similares con plegamiento del tipo  $(\alpha/\beta)_8$  barril que corresponde a ocho hojas  $\beta$  rodeadas de 8 hélices  $\alpha$ . Ambas presentan alta conservación en ciertas regiones de la proteína principalmente en los residuos catalíticos y el sitio de unión al cofactor, y utilizan el mismo mecanismo de oxidoreducción bi bi (Toogood et al., 2010; Jez et al., 1997). Su similitud estructural podría ser útil para el diseño de fármacos basados en estructuras para terapias conjuntas dirigidas a leishmanias, *T. cruzi* y *T. brucei*. Sin embargo, la alta similitud estructural de *TcAKR* y la PGFS de *L. major* con su homólogo en humanos (PDB 1ry8) constituye una desventaja para el diseño de fármacos selectivos (Moen et al., 2015). De hecho, en el estudio estructural comparativo de AKRs con actividad  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa realizado en este trabajo se observa que desde el punto de vista tridimensional, las AKRs de *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *B. subtilis*, *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* no presentan grandes diferencias. Por otro lado, el estudio del sitio activo determinó que no hay diferencias en los residuos catalíticos y de unión al cofactor entre la AKR de *T. cruzi* y las AKR en otros organismos donde la función  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa ha sido verificada experimentalmente. Este resultado revela que no existe evidencia a nivel estructural para suponer que *TcAKR* no tenga actividad  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa.

Previamente fueron reportados estudios de expresión en diferentes estadios y localización de *TcOYE* (Uchiyama et al., 2005). Sin embargo, difieren de los obtenidos en este trabajo. Uchiyama y colaboradores proponen una localización citoplasmática en epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas, mientras que en el presente estudio se observó que la localización es citoplasmática a excepción de los amastigotas, en donde la proteína presenta distribución no uniforme sino más bien granulada. Es posible que la proteína se asocie a algún organelo durante este estadio o que se encuentre en cuerpos multivesiculares para su secreción, pero estas hipótesis deben ser estudiadas. Por otro lado, había sido descrito que *TcOYE* se expresa en niveles similares en los tres estadios, cuando en este estudio se observó que la expresión disminuye significativamente en tripomastigotas. Una de las carencias en el trabajo de Uchiyama es que no se normaliza la expresión con respecto a otra proteína de expresión constitutiva y tampoco describe la cantidad de proteína que utiliza o la cantidad de parásitos por carril.

Por otro lado, Garavaglia y colaboradores estudiaron la localización de *TcAKR* y la expresión en estadios. El ensayo que realizaron para determinar la localización subcelular fue



permeabilización con digitonina seguido por ELISA con anticuerpos  $\alpha$ -*TcAKR* que mostró un perfil similar a la de la piruvato quinasa sugiriendo localización citoplasmática. Determinaron por western blot que la enzima se expresa en todos los estadios pero sin comparar los niveles de expresión (Garavaglia et al., 2010). Mediante estudios de inmunolocalización, en esta tesis se demostró que *TcAKR* se encuentra en la mitocondria y en los sitios antipodales del kinetoplasto, una estructura asociada a la mitocondria (ver figura 1.5). Los sitios antipodales han sido descritos como lugares donde ocurre la reparación de gaps de los nuevos minicírculos que recién se adhirieron a la red del kADN. Últimamente se ha observado que son sitios complejos donde se localizan ligasas, topoisomerasas y polimerasas (Jensen & Englund, 2012). Esta particular localización fue observada solo en forma epimastigota, mientras que en el amastigota la proteína se localiza alrededor del núcleo o cerca del kinetoplasto. Cabe recordar que el kinetoplasto es una estructura dentro de la mitocondria y está en estrecho relacionamiento con el cuerpo basal, por lo que en amastigotas *TcAKR* podría estar dispersa en el flagelo debido a la asociación de kinetoplasto con el flagelo por la zona kinetoflagelar o confinada en la mitocondria. Se requieren más estudios para determinar la localización específica de *TcAKR* en amastigotas. Se han identificado varias proteínas de *T. cruzi* que se localizan en los sitios antipodales del kinetoplasto durante la fase S del ciclo celular, pero en estadios no replicativos cambian de localización (Schamber-Reis et al., 2012; Duhagon et al., 2009; Li et al., 2007). En particular, Schamber-Reis y colaboradores describieron una proteína que presenta localización antipodal en el estadio amastigota y epimastigota pero no el tripomastigota. Además de *TcAKR*, la proteína NTRI con actividad quinona reductasa también fue asociada a la mitocondria en *T. cruzi* (Wilkinson et al., 2008) y tratamiento con naftoquinonas se asoció con disfunción mitocondrial (Menna-Barreto et al., 2009).

En un análisis proteómico cuantitativo en el que se comparan las proteínas asociadas a la cromatina en las formas epimastigota y tripomastigota se determinó que tanto *TcOYE* como *TcAKR* están en la fracción asociada a la cromatina, siendo ambas proteínas significativamente más expresadas en la forma epimastigota (Leandro et al., 2017). Además Magalhães y colaboradores observaron en geles bidimensionales que *TcOYE* (referida como deshidrogenasa) se encuentra expresada en epimastigotas y no en tripomastigotas (Magalhães et al., 2008). A nivel transcriptómico también se determinó que ambas proteínas se expresan más en el estadio epimastigota (Berná et al., datos no publicados). En esta tesis se confirmó a nivel proteico que la expresión de *TcOYE* varía a lo largo del ciclo de vida y se expresan más en las formas replicativas del parásito.

En algunos western blot, como es el caso de la figura 4.12 en donde se realizó la permeabilización diferencial con digitonina, se observó una doble banda reconocida por el suero  $\alpha$ -*TcOYE*. Concordantemente con este resultado, tanto Parodi como Magalhães observaron en geles bidimensionales que esta proteína presenta varios *spots* correspondientes a diferen-



tes puntos isoeléctricos, consistente con modificaciones post traduccionales como por ejemplo fosforilación (Parodi-Talice et al., 2004; Magalhães et al., 2008). Posteriormente, Ferrão y colaboradores propusieron que *TcOYE* se fosforila en al menos dos sitios diferentes en respuesta a TGF- $\beta$  reprimiendo su expresión (Ferrão et al., 2012).

Con el objetivo de identificar interactores que ayuden a dilucidar de la función biológica de *TcOYE* se realizó una inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos  $\alpha$ -*TcOYE* purificados. Sin bien la purificación del suero permitió reconocer menores concentraciones de la proteína recombinante con la misma dilución (figura 2 del Anexo), la inmunoprecipitación selectiva no evidenció la interacción de *TcOYE* con ninguna otra proteína de *T. cruzi* en el estadio epimastigota (figura 3 del Anexo). Esto puede ser debido a que las interacciones que *TcOYE* establece con otras proteínas son instantáneas o quizás se establezcan interacciones frente a un determinado estímulo. Este resultado no es sorprendente si tenemos en cuenta que el sustrato biológico más probable propuesto para esta enzima es el eicosanoide PGH<sub>2</sub>.

Ha sido propuesto que tanto Nfx como Bzn actúan como prodrogas que debe ser activadas mediante la reducción del grupo nitro unido al anillo aromático (R Wilkinson et al., 2011). En *T. cruzi* se han caracterizado dos proteínas con actividad nitroreductasa: *TcNTRI* (Wilkinson et al., 2008) y *TcOYE* (Kubata et al., 2002b). Existen dos tipos de nitroreductasas, las nitroreductasas del tipo I son dependientes del NAD(P)H y contienen FMN como cofactor, catalizan la transferencia de dos electrones reduciendo el grupo nitro a un intermediario nitroso, que luego mediante una segunda reducción se convierte en hidroxilamina. Son llamadas “insensibles al oxígeno” porque éste no participa de la reacción y no resulta en la producción de especies reactivas del oxígeno. Estas proteínas se encuentran en bacterias y en algunos eucariotas como *T. cruzi*. Por otro lado, las NTR del tipo II contienen FMN o FAD como cofactor, catalizan la reducción del sustrato mediante un electrón formando un radical nitro anión. Este radical inestable reacciona con oxígeno para producir superóxido. Tanto *TcNTRI* como *TcOYE* corresponden a NTRs del tipo I. *TcNTRI* reduce Nfx y Bzn usando NADH mientras que *TcOYE* utiliza NADPH para reducir Nfx en condiciones anaeróbicas (Wilkinson et al., 2008; Kubata et al., 2002b). Wilkinson y colaboradores demostraron la capacidad metabolizadora de *TcNTRI* mediante estudios *in vitro* y funcionales. La disminución de la expresión de los genes de NTRI en *T. cruzi* (*TcNTRI*) y en *T. brucei* (*TbNTRI*) resultó en un aumento de la resistencia a Nfx y Bzn, mientras que la sobreexpresión produjo hipersensibilidad (Wilkinson et al., 2008). Estudios funcionales recientes de *TcAKR* determinaron que la enzima esta implicada en el metabolismo reductor de Bzn en *T. cruzi* (Garavaglia et al., 2016) pero no hay ningún reporte *in vivo* sobre actividad reductiva sobre Nfx. En *T. brucei* la sobreexpresión de *TbPGS* (homólogo de *TcAKR*) no afecta la sensibilidad a Nfx (Hall et al., 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el aumento de los niveles de *TcOYE*

y *TcAKR* le confiere a los parásitos susceptibilidad a Nfx. Por otro lado, la sobreexpresión de *TcOYE* condujo a un aumento de la sensibilidad de los parásitos a Bzn mientras que la sobreexpresión de *TcAKR* evidenció un aumento de la resistencia a este nitroimidazol, en concordancia a lo reportado por Garavaglia y colaboradores (Garavaglia et al., 2016). Por lo tanto, al igual que lo que sucede con *TcNTRI*, la sobreexpresión de *TcOYE* conduce a un aumento de la sensibilidad a Bzn y Nfx. Estos resultados indican que *TcOYE* y *TcAKR* participan de la activación de los fármacos Bzn y Nfx *in vivo*.

Kubata y colaboradores observaron que *TcOYE* puede reducir  $H_2O_2$  *in vitro* en condiciones anaeróbicas (Kubata et al., 2002b). A su vez, fue reportado en otros organismos que la expresión de homólogos OYE implicados en el estrés oxidativo se induce por  $H_2O_2$  (Fitzpatrick et al., 2003; Al-Momany & Abu-Romman, 2014). En este trabajo se describió que los parásitos sobreexpresantes de *TcOYE* son más resistentes con respecto a los parásitos control, confirmando la relación de esta enzima con el  $H_2O_2$  *in vivo*. La resistencia observada puede ser debida a un efecto directo de *TcOYE* o mediante la sobreexpresión de otra enzima implicada en el metabolismo redox. Dada la alta versatilidad catalítica de *TcOYE* posiblemente tenga más de una función biológica en el parásito dependiendo del contexto celular lo que dificulta su caracterización.

A la fecha, había sido descrito que la enzima *TcOYE* tiene actividad  $PGF_2\alpha$  (Kubata et al., 2002b) mientras que *TcAKR* no (Garavaglia et al., 2010). En esta tesis se estudió la síntesis de  $PGF_2\alpha$  en tripomastigotas sobreexpresantes de *TcOYE* y *TcAKR* donde se observó que los sobreexpresantes de *TcAKR* producen niveles de este eicosanoide comparables a los producidos por parásitos sobreexpresantes de *TcOYE*. A su vez, estos niveles son mayores a los obtenidos con los parásitos control. El hecho de que los parásitos respondan a un estímulo externo de AA demuestra que la vía metabólica de síntesis de PGs esta presente en estos parásitos y que *in vivo* son capaces de tomar el AA del medio extracelular y utilizarlo para producir sus propias PGs. La conversión de AA exógeno a PGs en *T. cruzi* ya fue descrito por Ashton y colaboradores. Mediante  $[^{14}C]$ -AA demostraron que estos parásitos catalizan la conversión de AA exógeno en  $TXA_2$  y  $PGF_2\alpha$ . Por otro lado, observaron que *TcOYE* recombinante es capaz que reducir  $PGH_2$  a  $PGF_2\alpha$  corroborando los resultados de Kubata y colaboradores (Ashton et al., 2007). Sin embargo, en los experimentos realizados por Kubata y colaboradores determinaron que el sobrenadante de lisados inmunoprecipitados con anticuerpos  $\alpha$ -*TcOYE* tiene actividad 9,11-endoperóxido reductasa (Kubata et al., 2002b), lo cual indica que *TcOYE* no es la única enzima capaz de sintetizar  $PGF_2\alpha$  a partir de  $PGH_2$  en *T. cruzi*. Los resultados de esta tesis demuestran que tanto *TcOYE* como *TcAKR* son  $PGF_2\alpha$  sintetasas. En cuanto a los niveles de PG producidos por cantidad de parásitos, *T. cruzi* produce niveles más elevados en comparación a los reportados por Kubata y colaboradores para *T. brucei*, donde se utilizaron 20 veces más de AA que lo que se usó en esta tesis. Por otro lado, la forma no replicativa stumpy

produjo los niveles mas altos de PGs mientras que la forma procíclica que se encuentra en el insecto vector fue la que presentó menor síntesis de PGs (Kubata et al., 2002a). En el caso de *T. cruzi*, la forma epimastigota sí presentó altos niveles de PGF<sub>2</sub>α, pero no hubo diferencias significativas entre los parásitos control y sobreexpresantes de *TcOYE* y *TcAKR* .

En esta tesis se demostró que la mayor parte de la PGF<sub>2</sub>α producida por los tripomastigotas es secretada al medio extracelular: los valores de PGF<sub>2</sub>α fueron mucho mayores en el sobrenadante que el pellet de parásitos. Previamente, Kubata y colaboradores describieron que una fracción de la PGF<sub>2</sub>α producida por las formas slender y procíclica de *T. brucei* se secreta al medio, mientras que la PGD<sub>2</sub> producida por la forma stumpy es la principal PG secretada (Kubata et al., 2000). La PGD<sub>2</sub> induce una muerte celular programada independiente de caspasa en *T. brucei* como mecanismo de regulación de la densidad poblacional en animales infectados (Figarella et al., 2005). Es importante que este eicosanoide sea liberado para poder regular la densidad de la población, teniendo un rol importante en la interacción hospedero-patógeno. Este mecanismo de regulación esta mediado por estrés oxidativo. La formación de especies reactivas del oxígeno tanto por PGD<sub>2</sub> como por sus metabolitos es un requisito previo para la muerte celular programada (Figarella et al., 2006). Por otro lado, Ashton y colaboradores determinaron TXA<sub>2</sub> producido por *T. cruzi* en ratones infectados. Este tromboxano además de ser secretado actúa mediante receptores en las células del hospedador regulando la replicación de los amastigotas intracelulares. La regulación de la proliferación celular es un mecanismo que el parásito utiliza para asegurar la progresión de la enfermedad a la fase crónica (Ashton et al., 2007). En *Leishmania infantum chagasi* (*L. i. chagasi*) también se describió que la PGF<sub>2</sub>α sintetizada por el parásito es secretada al medio extracelular (Araújo-Santos et al., 2014).

Dado que PGF<sub>2</sub>α ejerce su función mediante la unión a un receptor acoplado a proteína G llamado FP (Abramovitz et al., 1994), la identificación de este receptor en *T. cruzi* es crucial para saber si la PGF<sub>2</sub>α sintetizada por el parásito puede producir algún efecto autócrino o únicamente cumple una función en la comunicación con el hospedador. A la fecha no hay ningún receptor FP identificado en el genoma de *T. cruzi* (Machado et al., 2011), por lo que la hipótesis más probable es que la principal función de este metabolito esté implicada en la interacción hospedero-patógeno. Sin embargo, sí se identificó un receptor para el tromboxano TXA<sub>2</sub> en la membrana flagelar de *T. cruzi* que parece ser diferente al receptor para el mismo eicosanoide en mamíferos. Este prostanoide mediante activación de ERK a través de su receptor (*TcPr*) regula la proliferación del parásito y mantiene controlados los niveles de replicación (Mukherjee et al., 2013).

Hay varios trabajos que estudian el rol de las PGs en infecciones por *T. cruzi* en modelos murinos. La mayoría coincide en que hay una inmunosupresión en la infección aguda y que las PGs actúan como importantes inmunomoduladores. Sin embargo, el tratamiento de ratones

infectados con *T. cruzi* con fármacos anti inflamatorios no esteroideos (inhibidores de la COX: ácido acetilsalicílico, salicilato de sodio, indometacina, meloxicam y etoricoxib) ha mostrado resultados muy dispares. Pinge y colaboradores determinaron que el tratamiento con indometacina no modificó la parasitemia pero sí se observó un aumento de la mortalidad temprana de los ratones (Pinge-Filho et al., 1999). Cardoni y colaboradores compararon los mediadores inflamatorios derivados de COX producidos en ratones con diferente susceptibilidad a la infección. Observaron que la producción de eicosanoides fue mayor en la cepa más resistente a la infección (CH3) proponiendo que estas moléculas tienen rol protector para el hospedador (Cardoni & Antúnez, 2004). Por otro lado, el tratamiento de ratones infectados con salicilato de sodio o meloxicam reduce la parasitemia, retrasa la mortalidad y aumenta la producción de IL-12 por esplenocitos (Michelin et al., 2005). Abdalla y colaboradores demostraron mediante el tratamiento con meloxicam y etoricoxib que la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> disminuye la parasitemia y el daño cardíaco (Abdalla et al., 2008). En cambio, Mukherjee y colaboradores sugieren que la inhibición de la COX-1 mediada por el ácido acetilsalicílico conduce a un aumento de la parasitemia y de la mortalidad en ratones infectados con *T. cruzi*. Observaron que esto ocurre sin afectar la estructura y función cardíaca o provocar cambios histopatológicos (Mukherjee et al., 2011). Por otro lado, otro grupo de investigación describió que el ácido acetilsalicílico tiene un efecto dependiente de la dosis, aumentando la parasitemia y mortalidad a altas concentraciones, mientras que a concentraciones bajas tiene un efecto protector para el hospedador debido a la producción de 15-epi-Lipoxina-A<sub>4</sub> (Molina-Berriós et al., 2013). Esta variación observada en los resultados de diferentes grupos de investigación puede deberse a que estudian la producción de PGs sin tener en cuenta la contribución de los eicosanoides derivados del parásito. Además, tal como se describió previamente, las diferentes cepas de *T. cruzi* presentan diversa variabilidad genética (Brisse et al., 2000; Andrade et al., 1985). Estas diferencias genéticas pueden verse reflejadas en diferentes niveles de expresión y perfiles de PG sintasas. Por otro lado, también se ha descrito que las cepas de ratones presentan variada susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*.

Con la intención de revelar cual es el rol de las PGs en la interacción hospedero-patógeno, Ashton y colaboradores determinaron mediante ratones doble *knock out* para el gen de la TXA<sub>2</sub> sintasa que la mayor parte del TXA<sub>2</sub> circulante en ratones infectados proviene del parásito. Por otro lado, también demostraron que los niveles de parasitemia y mortalidad fueron similares a los obtenidos con ratones *wild type* infectados, indicando que el TXA<sub>2</sub> del parásito es el causante de la parasitemia y mortalidad. A su vez, mediante ratones doble *knock out* para el gen del receptor para el TXA<sub>2</sub> (TP), demostraron que la incapacidad del hospedero de responder al TXA<sub>2</sub> aumenta la parasitemia y la mortalidad, y los ratones presentaron patologías cardíacas severas (Ashton et al., 2007). Se han observado diferencias en cuanto al rol que pueden tener los eicosanoides en diferentes etapas de la infección. Los mediadores lipídicos derivados de la COX-2 tienen funciones protectoras durante las etapas tempranas de la infección pero podrían

ser responsables del daño tisular en la fase crónica de la enfermedad (Cardoni & Antúnez, 2004). Varios estudios también sugieren que los eicosanoides, en conjunción con citoquinas, quimioquinas y otros mediadores inflamatorios, son esenciales para la progresión y perpetuación de la fase crónica de la enfermedad (Mukherjee et al., 2011).

En el trabajo realizado por Ashton y colaboradores describen que el  $\text{TXA}_2$  y la  $\text{PGF}_2\alpha$  son los prostanoideos más abundantes sintetizados por *T. cruzi* (Ashton et al., 2007). Si bien se ha estudiado cual es el rol del  $\text{TXA}_2$ , se desconoce cual es la función de la  $\text{PGF}_2\alpha$  sintetizada por el parásito en el contexto de la infección *in vivo*. En esta tesis se describe que la sobreexpresión de *TcOYE* provocó que el pico de parasitemia ocurriera antes y fuera mayor con respecto a los controles. Si bien no se estudió directamente la patología cardíaca, se determinó que la carga parasitaria en el músculo cardíaco en ratones infectados con los parásitos que sobreexpresan *TcOYE* fue mayor con respecto a los ratones infectados con parásitos control. Este resultado es relevante dado que el daño de miocardio debido a la persistencia del parásito es considerado el mecanismo más importante en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica (Benziger et al., 2017).

Estudios previos mostraron que *TcOYE* es una de las proteínas reconocidas por sueros de pacientes chagásicos provenientes de Brasil (Verissimo et al., 2013). Describieron que la proteína es reconocida por anticuerpos presentes en sueros de las tres regiones endémicas estudiadas. La secuencia epítipo reconocida por espectrometría de masa fue adjudicada a una hélice  $\alpha$  en la superficie de la estructura tridimensional. En esta tesis se estudió si *TcOYE* es reconocida por sueros de pacientes chagásicos con determinada patología. Se determinó que la proteína es reconocida específicamente por sueros de pacientes que presentan la forma determinada de la fase crónica y no la forma indeterminada asintomática. En particular, los pacientes con patologías cardíacas presentan IgG que reconocen la proteína *TcOYE* recombinante. Este resultado es importante debido a que las cardiomiopatías crónicas son la manifestación más frecuente y severa de la enfermedad de Chagas.

Las PGs se han descrito como inmunomoduladores que favorecen el establecimiento de la fase crónica de la enfermedad de Chagas. *T. cruzi* al ser un organismo parásito depende de la supervivencia del hospedador, por lo que necesita mecanismos que aseguren una proliferación celular controlada así como mecanismos que regulen los daños que causan en el hospedador para que ambos persistan. Las PGs parecen ser uno de los metabolitos encargados de cumplir estas funciones de autoregulación en los parásitos.

# Capítulo 5

## Consideraciones finales

En el presente trabajo se identificaron 110 proteínas que por definición pertenecen a la familia proteica OYE y 298 a AKR en tripanosomátidos. Se confirmó mediante búsquedas exhaustivas en los genomas de tripanosomátidos que *TcOYE* no es una proteína exclusiva de *T. cruzi* tal como había sido reportado. Se encuentra también en *T. grayi* y *T. rangeli*. Por el contrario, *TcAKR* se encuentra representada en casi todas las especies de tripanosomátidos. Los análisis de secuencia revelan una variedad de proteínas pertenecientes a estas familias proteicas no descrita previamente. A su vez, se determinó que *TcOYE* no es la única proteína de la familia OYE presente en tripanosomátidos. Los análisis estructurales evidencian que *TcAKR* es capaz de catalizar la síntesis de  $\text{PGF}_2\alpha$ . Por otro lado, se propuso una superficie de interacción para el homodímero de *TcAKR*.

Mediante inmunocitocalizaciones se determinó que *TcOYE* presenta localización citoplasmática en epimastigotas mientras que *TcAKR* se localiza en la mitocondria y en los sitios antipodales del kinetoplasto. En amastigotas *TcOYE* tiene una localización más granular comparado con el estadio epimastigota y *TcAKR* deja de estar asociada a los sitios antipodales. Por otro lado, se describió que *TcOYE* se expresa en los estadios replicativos y ambas proteínas presentan mayor expresión en la cepa de *T. cruzi* más virulenta. Se confirmó que ambas se secretan y se observó *TcOYE* tiene un efecto beneficioso en la infección a células HeLa.

La sobreexpresión de *TcOYE* permitió evidenciar que el aumento de esta proteína se correlaciona con una disminución de la capacidad infectiva de los parásitos. Asimismo, se utilizaron los parásitos sobreexpresantes de *TcOYE* y *TcAKR* para estudiar la relación propuesta para estas enzimas con la metabolización de fármacos tripanocidas. Mediante estos estudios se confirmó que tanto *TcOYE* como *TcAKR* están implicadas en este proceso, confiriéndole a los parásitos sobreexpresantes mayor susceptibilidad a Nfx. Por otro lado, la sobreexpresión de *TcOYE* resultó en mayor sensibilidad a Bzn mientras que la sobreexpresión de *TcAKR* les confirió mayor resistencia al mismo fármaco. También se estudió la relación de estas enzimas con el metabolismo redox mediante la exposición de los parásitos sobreexpresantes a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En

estos experimentos se observó que los sobreexpresantes de *TcOYE* resultaron ser más resistente a este oxidante. Mediante ELISA de competencia con los parásitos sobreexpresantes se confirmó que tanto *TcOYE* como *TcAKR* son  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasas.

Por último, se realizaron estudios en modelo murino donde se determinó que el pico parasitemia de los ratones infectados con parásitos sobreexpresantes de *TcOYE* ocurre antes comparado a los parásitos control, y la carga parasitaria en el músculo cardíaco es mayor. Por otro lado, en estudios de ELISA con pacientes chagásicos y no infectados se observó que la proteína es reconocida únicamente por pacientes que presentan cardiopatías.

Dentro de las perspectivas a futuro de este trabajo se encuentra realizar estudios de expresión de *TcAKR* a lo largo del ciclo de vida del parásito, así como estudiar el efecto de la proteína secretada en el contexto de infección a células de mamíferos. En un mediano plazo se pretende estudiar la posible relación de *TcAKR* con la infectividad de los parásitos sobre células en cultivo y si es que es esencial para este proceso. Además, se planea confirmar la actividad  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasa de *TcOYE* y *TcAKR* en parásitos sobreexpresantes por otros métodos.

Es de interés el estudio de PGs parasitarias con el fin de obtener una mejor comprensión de las funciones patológicas asociadas para guiar el desarrollo de inhibidores. El hecho que *T. cruzi* produzca prostaglandinas y que aparentemente tenga dos enzimas que catalicen la síntesis de  $\text{PGF}_2\alpha$  plantea interrogantes sobre la biología de *T. cruzi* y del rol de las PGs en la interacción con su hospedero mamífero. De notable interés es *TcOYE* que tiene más de un rol en el parásito: síntesis de  $\text{PGF}_2\alpha$ , metabolismo de fármacos tripanocidas y relación con el metabolismo redox. En este trabajo planteamos que esta enzima podría tener un rol clave en la supervivencia de *T. cruzi* en el hospedero. La caracterización de esta enzima reveló marcadas diferencias en comparación con las  $\text{PGF}_2\alpha$  sintasas de mamíferos, lo cual la hacen un blanco apropiado para el diseño racional de fármacos antiparasitarios.

Parte de las investigaciones llevadas a cabo en la presente tesis han sido presentados en los siguientes congresos

- Díaz-Viraqué, F.; Chiribao, M. L.; Trochine, A.; Iraola, G.; Robello, C. **Evolutionary analysis and functional characterization of prostaglandin F<sub>2</sub>α synthases from *Trypanosoma cruzi*.** XXXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, Brasil. 2016
- Díaz-Viraqué, F.; Chiribao, M. L.; Trochine, A.; M. Machado; Iraola, G.; Robello, C. **Structural and functional studies of prostaglandin synthases of *Trypanosoma cruzi*.** Second Workshop on Protozoology Research. Mendoza, Argentina. 2016
- Díaz-Viraqué, F.; Chiribao, M. L.; Trochine, A.; P. Faral-Tello; M. Machado; Iraola, G.; Robello, C. **Functional, structural and evolutionary characterization of postaglandin F<sub>2</sub>α synthases from *Trypanosoma cruzi*.** Scientific Meeting Institut - Pasteur Montevideo. Montevideo, Uruguay. 2015
- Díaz-Viraqué, F.; Chiribao, M. L.; Trochine, A.; P. Faral-Tello; M. Machado; Iraola, G.; Robello, C. **Evolutionary analysis and functional characterization of *Trypanosoma cruzi* prostaglandin synthases.** International Scientific Symposium - Institut Pasteur International Network. París, Francia. 2015
- Díaz-Viraqué, F.; Chiribao, M. L.; Trochine, A.; Iraola, G.; M. Machado; P. Faral-Tello; Robello, C. **Functional, structural and evolutionary characterization of prostaglandin F<sub>2</sub>α synthases from *Trypanosoma cruzi*.** Functional Genomics & Systems Biology: From Model Organisms to Human Health. Cambridge, Inglaterra. 2015
- Díaz-Viraqué, F.; Iraola, G.; Robello, C. **Dinámica evolutiva de la familia Old Yellow Enzyme: la prostaglandina F<sub>2</sub>α sintasa de *Trypanosoma cruzi*.** Terceras Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Genética. Montevideo, Uruguay. 2014
- Díaz-Viraqué, F.; Iraola, G.; Robello, C. **A semi-automatic pipeline for assembling datasets and performing taxonomic and phylogenetic analyses on protein families: application on the Old Yellow Enzyme family.** Scientific Symposium of the Institut Pasteur International Network. París, Francia. 2014
- Díaz-Viraqué, F.; Iraola, G.; Robello, C. **Pipeline semi-automático para realizar análisis taxonómicos y filogenéticos sobre familias de proteínas utilizando datos genómicos: aplicación en la familia proteica Old Yellow Enzyme.** XV Jor-



nadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Maldonado, Uruguay. 2014

# Referencias bibliográficas

- G. Abdalla, et al. (2008). 'Trypanosoma cruzi: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection'. Experimental parasitology **118**(4):514–521.
- M. Abramovitz, et al. (1994). 'Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor.'. Journal of Biological Chemistry **269**(4):2632–2636.
- B. Al-Momany & S. Abu-Romman (2014). 'Cloning and molecular characterization of a flavin-dependent oxidoreductase gene from barley.'. Journal of applied genetics **55**(4):457–468.
- S. F. Altschul, et al. (1990). 'Basic local alignment search tool'. Journal of Molecular Biology **215**(3):403 – 410.
- H. M. Andrade, et al. (2008). 'Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi resistance to Benznidazole'. Journal of proteome research **7**(6):2357–2367.
- S. G. Andrade, et al. (1985). 'Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with Trypanosoma cruzi strains of different types'. Bulletin of the World Health Organization **63**(4):721.
- T. Araújo-Santos, et al. (2014). 'Role of prostaglandin F2 $\alpha$  production in lipid bodies from Leishmania infantum chagasi: insights on virulence.'. The Journal of infectious diseases **210**(12):1951–1961.
- D. Arias, et al. (2013). 'Redox metabolism in Trypanosoma cruzi: functional characterization of tryparedoxins revisited.'. Free radical biology & medicine **63**:65–77.
- A. W. Ashton, et al. (2007). 'Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during Trypanosoma cruzi infection'. Journal of Experimental Medicine **204**(4):929–940.
- N. A. Baker, et al. (2001). 'Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome'. Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(18):10037–10041.
- M. A. Basombrío, et al. (1982). 'Side effects of immunization with liver attenuated Trypanosoma cruzi in mice and rabbits'. Infection and Immunity **36**(1):342–350.

- E. Bayer-Santos, et al. (2013). 'Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins'. Journal of proteome research **12**(2):883–897.
- M. Belaunzarán, et al. (2010). 'Identification, cloning and expression of a novel Phospholipase A from *Leishmania braziliensis*'. Biocell **34**:91.
- C. P. Benziger, et al. (2017). 'Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas'. Cardiology Clinics **35**(1):31–47.
- H. M. Berman, et al. (2000). 'The protein data bank'. Nucleic acids research **28**(1):235–242.
- J. Bermudez, et al. (2016). 'Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease'. Acta tropica **156**:1–16.
- C. Bern (2011). 'Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease'. New England Journal of Medicine **364**(26):2527–2534.
- C. Bern (2015). 'Chagas disease'. New England Journal of Medicine **373**(5):456–466.
- L. E. Bertello, et al. (2000). 'Evidence for phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide'. Biochemical Journal **345**(1):77–84.
- F. F. Blanco, et al. (2016). 'Post-transcriptional Regulation of Prostaglandin Biosynthesis'. In Post-transcriptional Mechanisms in Endocrine Regulation, pp. 181–219. Springer.
- M. M. Bradford (1976). 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding'. Analytical Biochemistry **72**(1):248 – 254.
- S. Brisse, et al. (2000). 'Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers'. Molecular and biochemical parasitology **111**(1):95–105.
- A. J. Cáceres, et al. (2007). 'Molecular and biochemical characterization of novel glucokinases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp'. Molecular and biochemical parasitology **156**(2):235–245.
- R. L. Cardoni & M. I. Antúnez (2004). 'Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections'. Mediators of inflammation **13**(4):235–240.
- J. J. Cazzulo, et al. (1997). 'Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*'. BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE SEYLER **378**:1–10.

- C. Chagas (1909). ‘Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem’. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **1**(2):159–218.
- C. Clayton (2016). ‘Trypanosoma’. In Molecular Parasitology, pp. 157–194. Springer.
- M. C. Connelly & F. Kierszenbaum (1984). ‘Modulation of macrophage interaction with *Trypanosomacruzi* by phospholipase A2-sensitive components of the parasite membrane’. Biochemical and biophysical research communications **121**(3):931–939.
- E. E. Conners, et al. (2016). ‘A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants’. Acta tropica **156**:68–78.
- V. T. Contreras, et al. (1988). ‘Biological aspects of the DM28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacylogenesis in chemically defined media’. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **83**(1):123–133.
- N. Cunha-e Silva, et al. (2006). ‘Reservosomes: multipurpose organelles?’. Parasitology research **99**(4):325–327.
- D. Darriba, et al. (2011). ‘ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution’. Bioinformatics **27**(8):1164–1165.
- W. De Souza (2002). ‘Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.’. Current pharmaceutical design **8**(4):269–285.
- W. de Souza (2008). ‘An introduction to the structural organization of parasitic protozoa.’. Current pharmaceutical design **14**(9):822–838.
- W. de Souza, et al. (2010). ‘Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction’. International journal of cell biology **2010**.
- E. A. Dennis & P. C. Norris (2015). ‘Eicosanoid storm in infection and inflammation’. Nature Reviews Immunology **15**(8):511–523.
- J. C. P. Dias (2017). ‘Chagas Disease (American Trypanosomiasis)’. In Arthropod Borne Diseases, pp. 245–275. Springer.
- R. Docampo, et al. (2010). ‘Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes’. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **365**(1541):775–784.
- T. J. Dolinsky, et al. (2007). ‘PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations’. Nucleic acids research **35**(suppl 2):W522–W525.

- M. A. Duhagon, et al. (2009). 'The Trypanosoma cruzi nucleic acid binding protein Tc38 presents changes in the intramitochondrial distribution during the cell cycle'. BMC Microbiology **9**:34.
- J. Eintracht, et al. (1998). 'Calcium entry in Trypanosoma brucei is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid'. Biochemical journal **336**(3):659–666.
- M. C. Q. Elias, et al. (2001). 'Transcription rate modulation through the Trypanosoma cruzi life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation'. Molecular and biochemical parasitology **112**(1):79–90.
- P. M. Ferrão, et al. (2012). 'A Phosphoproteomic Approach towards the Understanding of the Role of TGF- $\beta$  in Trypanosoma cruzi Biology'. PLoS ONE **7**(6):e38736–e38736.
- K. Figarella, et al. (2005). 'Prostaglandin D2 induces programmed cell death in Trypanosoma brucei bloodstream form'. Cell Death & Differentiation **12**(4):335–346.
- K. Figarella, et al. (2006). 'Prostaglandin-induced programmed cell death in Trypanosoma brucei involves oxidative stress'. Cell Death & Differentiation **13**(10):1802–1814.
- R. D. Finn, et al. (2016). 'The Pfam protein families database: towards a more sustainable future'. Nucleic Acids Res. **44**(D1):D279–285.
- T. B. Fitzpatrick, et al. (2003). 'Characterization of YqjM, an Old Yellow Enzyme homolog from Bacillus subtilis involved in the oxidative stress response'. Journal of Biological Chemistry **278**(22):19891–19897.
- C. G. Freire-de Lima, et al. (2000). 'Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages'. Nature **403**(6766):199–203.
- L. Fu, et al. (2012). 'CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data'. Bioinformatics **28**(23):3150–3152.
- P. A. Garavaglia, et al. (2010). 'Identification, cloning and characterization of an aldo-keto reductase from Trypanosoma cruzi with quinone oxido-reductase activity'. Molecular and Biochemical Parasitology **173**(2):132 – 141.
- P. A. Garavaglia, et al. (2016). 'Putative Role of the Aldo-Keto Reductase from Trypanosoma cruzi in Benzimidazole Metabolism'. Antimicrobial agents and chemotherapy **60**(5):2664–2670.
- A. Geiger, et al. (2010). 'Exocytosis and protein secretion in Trypanosoma'. BMC microbiology **10**(1):1.
- J. A. S. Gomes, et al. (2014). 'Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease'. Human immunology **75**(1):20–28.

- R. L. Gonçalves, et al. (2011). 'A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*'. Journal of bioenergetics and biomembranes **43**(6):651–661.
- S. Guindon & O. Gascuel (2003). 'A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood'. Systematic biology **52**(5):696–704.
- B. S. Hall, et al. (2011). 'Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites'. Journal of Biological Chemistry **286**(15):13088–13095.
- B. S. Hall, et al. (2012). 'Targeting the Substrate Preference of a Type I Nitroreductase To Develop Antitrypanosomal Quinone-Based Prodrugs'. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **56**(11):5821.
- M. Hall & A. Bommarius (2011). 'Enantioenriched compounds via enzyme-catalyzed redox reactions'. Chemical reviews **111**(7):4088.
- T. Hirata & S. Narumiya (2012). 'Prostanoids as Regulators of Innate and Adaptive Immunity'. Advances in immunology **116**:143.
- W. Humphrey, et al. (1996). 'VMD: visual molecular dynamics'. Journal of molecular graphics **14**(1):33–38.
- D. Hyndman, et al. (2003). 'The aldo-keto reductase superfamily homepage'. Chemico-biological interactions **143**:621–631.
- R. Jensen & P. Englund (2012). 'Network news: the replication of kinetoplast DNA.'. Annual review of microbiology **66**:473–491.
- J. Jez, et al. (1997). 'Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily'. Biochemical Journal **326**(3):625–636.
- J. Jez & T. Penning (2001). 'The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update'. Chemico-biological interactions **130**(1-3):499–525.
- Z. Kabututu, et al. (2009). 'Prostaglandin F<sub>2</sub>α synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7'. Journal of biochemistry **145**(2):161–168.
- Z. Kabututu, et al. (2002). 'Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9, 11-endoperoxide prostaglandin H<sub>2</sub> reductase in *Leishmania*'. International journal for parasitology **32**(14):1693–1700.
- M. Kanehisa, et al. (2016). 'KEGG as a reference resource for gene and protein annotation'. Nucleic Acids Res. **44**(D1):D457–462.

- K. Kawahara, et al. (2015). ‘Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors’. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1851**(4):414–421. Oxygenated metabolism of PUFA: analysis and biological relevance Michel Lagarde and Anna Nicolaou).
- K. B. Kilunga, et al. (2005). ‘Structural and mutational analysis of Trypanosoma brucei prostaglandin H2 reductase provides insight into the catalytic mechanism of aldo-ketoreductases’. Journal of Biological Chemistry **280**(28):26371–26382.
- M. M. Klingbeil & P. T. Englund (2004). ‘Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication’. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(13):4333–4334.
- B. K. Kubata, et al. (2000). ‘Identification of a novel prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  synthase in Trypanosoma brucei’. Journal of Experimental Medicine **192**(9):1327–1338.
- B. K. Kubata, et al. (2002a). ‘Enzymatic formation of prostaglandin D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, and F<sub>2</sub> $\alpha$  in the parasitic protozoan Trypanosoma brucei’. In International Congress Series, vol. 1233, pp. 461–466. Elsevier.
- B. K. Kubata, et al. (2007). ‘Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites’. Trends in parasitology **23**(7):325–331.
- B. K. Kubata, et al. (2002b). ‘A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by Trypanosoma cruzi’. Journal of Experimental Medicine **196**(9):1241–1252.
- U. K. Laemmli (1970). ‘Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4’. Nature **227**(5259):680–685.
- M. Lawrence, et al. (2013). ‘Software for computing and annotating genomic ranges’. PLoS Comput Biol **9**(8):e1003118.
- d. J. T. Leandro, et al. (2017). ‘Quantitative Proteomic Analysis of Replicative and Nonreplicative Forms Reveals Important Insights into Chromatin Biology of Trypanosoma cruzi’. Molecular & cellular proteomics **16**(1):23–38.
- B. Y. Lee, et al. (2013). ‘Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model’. The Lancet infectious diseases **13**(4):342–348.
- H. Li, et al. (2005). ‘Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK<sub>a</sub> values’. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **61**(4):704–721.
- Y. Li, et al. (2007). ‘Identification of new kinetoplast DNA replication proteins in trypanosomatids based on predicted S-phase expression and mitochondrial targeting’. Eukaryotic cell **6**(12):2303–2310.

- T. E. Liston & L. J. Roberts (1985). 'Transformation of prostaglandin D2 to 9 alpha, 11 beta-(15S)-trihydroxyprosta-(5Z, 13E)-dien-1-oic acid (9 alpha, 11 beta-prostaglandin F2): a unique biologically active prostaglandin produced enzymatically in vivo in humans'. Proceedings of the National Academy of Sciences **82**(18):6030–6034.
- J. Lukeš, et al. (2014). 'Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates'. Molecular and biochemical parasitology **195**(2):115–122.
- F. S. Machado, et al. (2011). 'Bioactive lipids in Trypanosoma cruzi infection'. Advances in parasitology **76**:1.
- A. D. Magalhães, et al. (2008). 'Trypanosoma cruzi alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages'. Proteome Science **6**:24.
- J. Majanja, et al. (2014). 'PGF2 $\alpha$  Synthase-Like Proteins are Expressed in Promastigotes of Old World Leishmania Species but not in New World Species'. African Journal of Pharmacology and Therapeutics **3**(2).
- A. Marchler-Bauer, et al. (2015). 'CDD: NCBI's conserved domain database'. Nucleic Acids Res. **43**(Database issue):D222–226.
- R. McCulloch & M. Navarro (2016). 'The protozoan nucleus'. Molecular and biochemical parasitology **209**(1):76–87.
- R. Menna-Barreto, et al. (2009). 'The effects on Trypanosoma cruzi of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction.'. Free radical biology & medicine **47**(5):644–653.
- M. Michelin, et al. (2005). 'Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental Trypanosoma cruzi infection'. Experimental parasitology **111**(2):71–79.
- R. D. Mindnich & T. M. Penning (2009). 'Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation'. Human genomics **3**(4):362.
- S. O. Moen, et al. (2015). 'Structures of prostaglandin F synthase from the protozoa Leishmania major and Trypanosoma cruzi with NADP'. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications **71**(5):609–614.
- A. Molina-Berríos, et al. (2013). 'Protective role of acetylsalicylic acid in experimental Trypanosoma cruzi infection: evidence of a 15-epi-lipoxygenase 4-mediated effect'. PLoS Negl Trop Dis **7**(4):e2173.



- A. Moncayo (2003). ‘Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries’. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **98**(5):577–591.
- A. Montalvetti, et al. (2004). ‘A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*’. Journal of Biological Chemistry **279**(37):38673–38682.
- S. Moreno & R. Docampo (2003). ‘Calcium regulation in protozoan parasites.’. Current opinion in microbiology **6**(4):359–364.
- D. R. Moser, et al. (1989). ‘Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction’. Journal of clinical microbiology **27**(7):1477–1482.
- Z. Moure, et al. (2016). ‘Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries’. Clinical Microbiology and Infection **22**(9):788–792.
- S. Mukherjee, et al. (2011). ‘Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease’. PloS one **6**(2):e16959.
- S. Mukherjee, et al. (2013). ‘Identification of a functional prostanoid-like receptor in the protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*’. Parasitology research **112**(4):1417–1425.
- M. T. Murakami, et al. (2013). ‘Structural studies of the *Trypanosoma cruzi* Old Yellow Enzyme: insights into enzyme dynamics and specificity’. Biophysical chemistry **184**:44–53.
- S. M. Murta, et al. (2006). ‘Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD (P) H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*’. Molecular and biochemical parasitology **146**(2):151–162.
- F. Nagajyothi, et al. (2012). ‘Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease’. Cellular microbiology **14**(5):634–643.
- S. Nizam, et al. (2014). ‘Comprehensive genome-wide analysis reveals different classes of enigmatic old yellow enzyme in fungi’. Scientific reports **4**:4013.
- C. Notredame, et al. (2000). ‘T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment1’. Journal of Molecular Biology **302**(1):205 – 217.
- M. C. Noverr, et al. (2003). ‘Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes’. Clinical microbiology reviews **16**(3):517–533.
- M. C. P. Nunes, et al. (2013). ‘Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects’. Journal of the American College of Cardiology **62**(9):767–776.

- P. O'Donoghue & Z. Luthey-Schulten (2003). 'On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases'. Microbiology and Molecular Biology Reviews **67**(4):550–573.
- N. Okamoto, et al. (2011). 'Structural insight into the stereoselective production of PGF2 $\alpha$  by Old Yellow Enzyme from *Trypanosoma cruzi*'. Journal of biochemistry **150**(5):563–568.
- Y. Okano, et al. (2002). 'Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of *Trypanosoma brucei* prostaglandin F2 $\alpha$  synthase'. The Journal of Biochemistry **132**(6):859–861.
- F. R. Opperdoes (1987). 'Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes'. Annual Reviews in Microbiology **41**(1):127–151.
- F. R. Opperdoes & J. Van Roy (1982). 'The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics'. Molecular and biochemical parasitology **5**(5):309–319.
- A. Parodi-Talice, et al. (2004). 'Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*'. International Journal for Parasitology **34**(8):881 – 886.
- T. M. Penning (2015). 'The Aldo-Keto Reductases (AKRs): Overview'. Chemico-biological interactions **234**:236–246.
- M.-J. Pinazo & J. Gascon (2015). 'The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health)'. Acta Tropica **151**:16 – 20. Ecology and diversity of *Trypanosoma cruzi*.
- P. Pinge-Filho, et al. (1999). 'Prostaglandins Mediate Suppression of Lymphocyte Proliferation and Cytokine Synthesis in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection'. Cellular immunology **193**(1):90–98.
- N. Portman & K. Gull (2010). 'The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function'. International journal for parasitology **40**(2):135–148.
- M. N. Price, et al. (2010). 'FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments'. PloS one **5**(3):e9490.
- R Development Core Team (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- S. R Wilkinson, et al. (2011). 'Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives'. Current topics in medicinal chemistry **11**(16):2072–2084.
- P. Ralph, et al. (1975). 'Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity.'. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) **114**(2 pt 2):898–905.

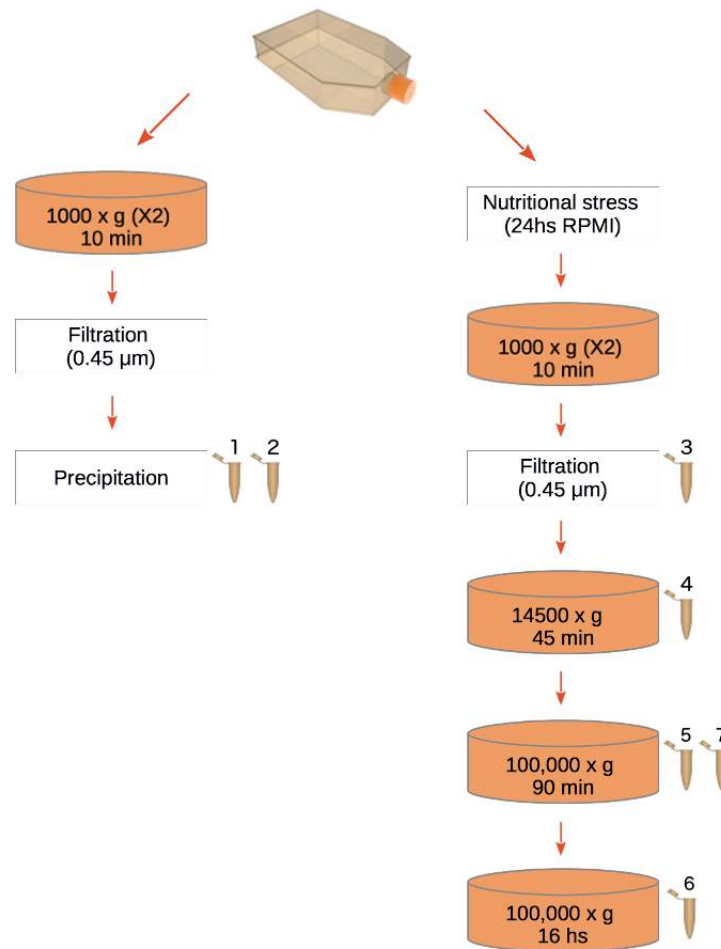
- A. Rassi & J. M. de Rezende (2012). 'American trypanosomiasis (Chagas disease)'. Infectious disease clinics of North America **26**(2):275–291.
- A. Rassi Jr, et al. (2015). 'Chagas disease'. In Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean, pp. 45–71. Springer.
- A. L. Ribeiro, et al. (2012). 'Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy'. Nature Reviews Cardiology **9**(10):576–589.
- E. Ricciotti & G. A. FitzGerald (2011). 'Prostaglandins and inflammation'. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **31**(5):986–1000.
- C. Ritz, et al. (2015). 'Dose-Response Analysis Using R'. PLOS ONE **10**(e0146021).
- E. Roberts, et al. (2006). 'MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis'. BMC bioinformatics **7**(1):382.
- J. Rodrigues, et al. (2014). 'Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure'. Sub-cellular biochemistry **74**:1–42.
- P. Rohloff, et al. (2004). 'Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*'. Journal of Biological Chemistry **279**(50):52270–52281.
- K. Rueda, et al. (2014). 'Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries'. Biomedica **34**(4):631–641.
- G. Sanli, et al. (2003). 'Structural biology of the aldo-keto reductase family of enzymes: catalysis and cofactor binding'. Cell biochemistry and biophysics **38**(1):79–101.
- B. Chamber-Reis, et al. (2012). 'DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions'. Molecular and biochemical parasitology **183**(2):122.
- W. F. Scherer (1953). 'Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HELA) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix'. Journal of Experimental Medicine **97**(5):695–710.
- C. N. Serhan, et al. (2015). 'Lipid mediators in the resolution of inflammation'. Cold Spring Harbor perspectives in biology **7**(2):a016311.
- J. Sharma, et al. (2013). 'The absence of myocardial calcium-independent phospholipase A2 $\gamma$  results in impaired prostaglandin E2 production and decreased survival in mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection'. Infection and immunity **81**(7):2278–2287.

- L. G. Shewan, et al. (2016). ‘Chagas Disease: Where to now?’. In International Cardiovascular Forum Journal, vol. 7.
- F. Sievers, et al. (2011). ‘Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega’. Molecular Systems Biology **7**:539.
- B. Simizu, et al. (1967). ‘Characterization of the Tacaribe Group of Arboviruses. 1. Propagation and Plaque Assay of Tacaribe Virus in a Line of African Green Monkey Kidney Cells (Vero)’. Experimental Biology and Medicine **125**(1):119–123.
- B. F. Smets, et al. (2007). ‘TNT biotransformation: when chemistry confronts mineralization’. Applied microbiology and biotechnology **76**(2):267–277.
- T. Smith, et al. (1997). ‘Early steps in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania major*’. Biochemical Journal **326**(2):393–400.
- W. L. Smith, et al. (1991). ‘Prostaglandin and thromboxane biosynthesis’. Pharmacology and therapeutics **49**(3):153–179.
- W. L. Smith, et al. (2011). ‘Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis’. Chemical Reviews **111**(10):5821–5865.
- W. d. Souza (2008). ‘Electron microscopy of trypanosomes: a historical view’. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **103**(4):313–325.
- B. Stenuit & S. Agathos (2010). ‘Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: could we learn from (bio) chemistry for bioremediation and vice versa?’. Applied microbiology and biotechnology **88**(5):1043–1064.
- S. Sugiyama, et al. (2007). ‘Preparation, crystallization and preliminary crystallographic analysis of old yellow enzyme from *Trypanosoma cruzi*’. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications **63**(10):896–898.
- H. B. Tanowitz & L. M. Weiss (2017). ‘A New Development in *Trypanosoma cruzi* Diagnosis’. Journal of Clinical Microbiology pp. JCM–02353.
- R. L. Tarleton (2016). ‘Chagas disease: A solvable problem, ignored’. Trends in Molecular Medicine **22**(10):835–838.
- H. S. Toogood, et al. (2010). ‘Biocatalytic reductions and chemical versatility of the old yellow enzyme family of flavoprotein oxidoreductases’. ChemCatChem **2**(8):892–914.
- A. Trochine, et al. (2014a). ‘*Trypanosoma cruzi* chemical proteomics using immobilized benzimidazole’. Experimental Parasitology **140**:33 – 38.

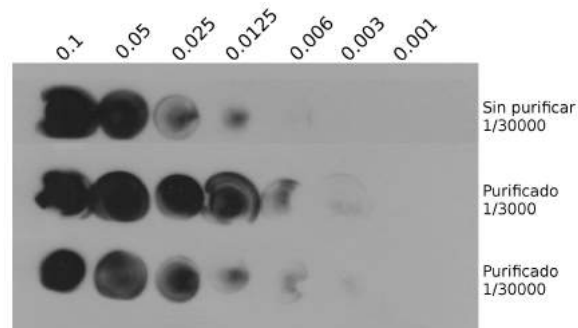
- A. Trochine, et al. (2014b). ‘Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics’. PLoS Negl Trop Dis **8**(5):e2844.
- N. Uchiyama, et al. (2005). ‘Antichagasic activity of komaroviquinone is due to generation of reactive oxygen species catalyzed by *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme’. Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(12):5123–5126.
- M. P. Vazquez & M. J. Levin (1999). ‘Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 $\beta$  gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector’. Gene **239**(2):217–225.
- d. C. G. Verissimo, et al. (2013). ‘The identification and characterization of epitopes in the 30-34 kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients’. Journal of proteomics **80**:34–42.
- J. Votýpka, et al. (2015). ‘New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re) description’. Trends in parasitology **31**(10):460–469.
- O. Warburg & W. Christian (1932). ‘Ein zweites sauerstoffübertragendes Ferment und sein Absorptionsspektrum’. Naturwissenschaften **20**(37):688–688.
- K. Watanabe (2011). ‘Recent reports about enzymes related to the synthesis of prostaglandin (PG) F (2)(PGF (2 $\alpha$ ) and 9 $\alpha$ , 11 $\beta$ -PGF (2))’. Journal of biochemistry **150**(6):593–596.
- WHO et al. (2015). ‘Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates’ **90**(6):33–44.
- S. R. Wilkinson, et al. (2002). ‘*Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum’. Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(21):13453–13458.
- S. R. Wilkinson, et al. (2008). ‘A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes’. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(13):5022.
- S. R. Wilkinson, et al. (2000). ‘Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*’. Journal of Biological Chemistry **275**(11):8220–8225.
- R. Williams & N. Bruce (2002). ‘‘New uses for an Old Enzyme’—the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes.’. Microbiology (Reading, England) **148**(6):1607–1614.
- R. E. Williams, et al. (2004). ‘Biotransformation of Explosives by the Old Yellow Enzyme Family of Flavoproteins’. Applied and Environmental Microbiology **70**(6):3566–3574.

- S. Wyllie, et al. (2016). 'Activation of Bicyclic Nitro-drugs by a Novel Nitroreductase (NTR2) in Leishmania'. PLoS Pathogens **12**(11):e1005971.
- T. Yagami, et al. (2016). 'Pathophysiological roles of cyclooxygenases and prostaglandins in the central nervous system'. Molecular neurobiology **53**(7):4754–4771.
- K. Yamaguchi, et al. (2011). 'Structure of the inhibitor complex of old yellow enzyme from *Trypanosoma cruzi*'. Journal of synchrotron radiation **18**(1):66–69.
- G. Yu, et al. (2016). 'ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data'. Methods in Ecology and Evolution .
- R. B. Zurier (2014). 'Prostaglandins, leukotrienes, and related compounds'. In Encyclopedia of Medical Immunology, pp. 905–916. Springer.

# ANEXOS

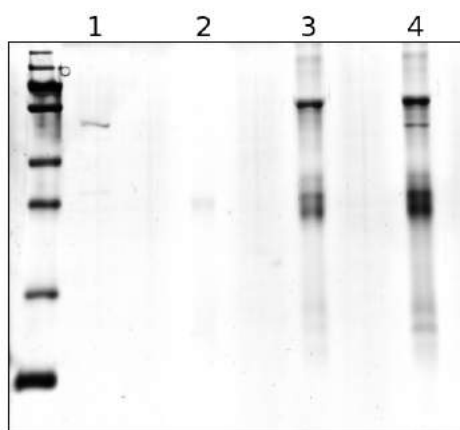


**Figura 1: Esquema de obtención de muestras para estudios de secreción en epimastigotas.** Referencias: 1 extracto proteico de sobrenadante de cultivo de epimastigotas sin estresar; 2 extracto proteico del medio de cultivo como control; 3 material de partida (SN1); 4 *Pellet* 1; 5 *Pellet* 2; 7 SN2; 6 SN3.



**Figura 2: Purificación de suero  $\alpha$ -*TcOYE*.** Dot Blot con la proteína *TcOYE* recombinante para evaluar el anticuerpo  $\alpha$ -*TcOYE* purificado. Se probó el suero sin purificar diluido 1/30000 y las IgG que reconocen la proteína *TcOYE* purificadas del suero en dos diluciones (1/3000 y 1/30000).





**Figura 3: Inmunoprecipitación de *TcOYE*.** Se utilizó antipuerpos  $\alpha$ -*TcOYE* purificado a partir de suero de conejo. La tinción de proteínas se realizó con nitrato de plata. Referencias: 1 anticuerpo y *TcOYE* recombinante (control positivo), 2 extracto proteico total de epimastigotas (control negativo), 3 anticuerpo (control negativo), 4 anticuerpo y extracto proteico total de epimastigotas