



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

“Caracterización de la proteína *TcHTE* y su relación con el transporte de hemo en *Trypanosoma cruzi*”

Presentada por Lucas Pagura

Rosario, Argentina

2018

# “Caracterización de la proteína TchTE y su relación con el transporte de hemo en *Trypanosoma cruzi*”

Lucas Pagura

Licenciado en Biotecnología  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre Abril de 2013 y Febrero de 2018, bajo la dirección de la Dra. Julia Alejandra Cricco.

Directora: Dra. Julia A. Cricco

Dra. Claudia Banchio

Dr. Claudio Pereira

Dra. Andrea Trochine

Fecha de defensa: 22 de Marzo de 2018

*"La ciencia, la técnica y la investigación son la base de la salud, bienestar, riqueza, poder e independencia de los pueblos modernos. Hay quienes creen que la investigación científica es un lujo o un entretenimiento interesante pero dispensable.*

*Grave error, es una necesidad urgente inmediata e ineludible para adelantar. La disyuntiva es clara, o bien se cultiva la ciencia, la técnica y la investigación y el país es próspero, poderoso y adelanta; o bien no se la practica debidamente y el país se estanca y retrocede, vive en la pobreza y la mediocridad."*

*Bernardo A. Houssay*

En primer lugar quiero agradecer a Julia por dirigirme durante estos años, por darme la libertad de plantear y desarrollar diversos ensayos analizando y discutiendo los mismos de forma constructiva.

A Esteban y Pamela, por sus contribuciones durante estos años y su predisposición continua.

A todos los que pasaron por el laboratorio con los que además del trabajo en conjunto y la catarsis dentro y fuera del laboratorio, compartimos todo tipo de situaciones: Marcelo, Brenda, Eve, María Gabriela, Viky, Lucho, Ale, Vir, Carla, Romi e Isa. Muchas gracias por la colaboración en el diseño y ejecución de experimentos, las recomendaciones y las críticas de todo tipo.

Al personal del IBR y Facultad que contribuyeron enormemente al desarrollo de esta tesis: Moni, por los primeros mates y charlas sin filtro al llegar al laboratorio; Inés, por su ayuda continua; Lola, por su colaboración en el trabajo con células; Rodrigo, por su participación en la obtención de las imágenes de microscopía confocal.

A los compañeros del IBReta, por el acompañamiento durante estos años! A las vecinas de enfrente (Coto's)! A los amigos de siempre!

Y por último a mi familia, siempre presentes de forma incondicional.

## **I- Índice**

I- Índice.....	1
ABREVIATURAS y SÍMBOLOS.....	9
LENGUAJE ESPECIAL.....	11
II- Resumen .....	12
III- Introducción.....	16
III.1 Consideraciones generales de porfirinas y el grupo hemo .....	17
III.1.1 Biosíntesis de hemo .....	19
III.1.2 Degradación y detoxificación de hemo .....	22
III.1.3 Utilización del hemo como fuente de hierro .....	24
III.1.4 Transporte de hemo en organismos eucariotas.....	26
III.2 Enfermedad de Chagas .....	28
III.2.1 Formas de transmisión y distribución geográfica de la enfermedad ....	30
III.3 Aspectos generales de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
III.3.1 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	33
III.3.2 Características morfológicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
III.3.3 Mecanismos de transporte de metabolitos en tripanosomátidos .....	37
III.3.4 El metabolismo de hemo en tripanosomátidos.....	37
III.3.5 Los tripanosomátidos y el transporte de hemo.....	39
III.3.6 Relevancia del estudio del metabolismo de hemo en <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	41
III.4 Objetivos .....	42
IV- Materiales y Métodos.....	43
IV.1. Análisis bioinformáticos.....	44
IV.1.1 Búsqueda de secuencias y análisis predictivos.....	44
IV.1.2 Análisis de los resultados de secuenciación.....	45
IV.2 Cepas bacterianas, levaduras y líneas celulares.....	45

IV.2.1 Cepas bacterianas utilizadas.....	45
IV.2.2 Cepas de levaduras utilizadas.....	45
IV.2.3 Líneas celulares utilizadas.....	45
IV.3 Técnicas de cultivo.....	46
IV.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	46
IV.3.1.1 Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> .....	46
IV.3.1.2 Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> .....	46
IV.3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	47
IV.3.2.1 Medios de cultivo para levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	47
IV.3.2.2 Transformación de células de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	48
IV.3.3 Células Vero y HEK293-T.....	49
IV.3.3.1 Medios de cultivo para células Vero y HEK293-T .....	49
IV.3.3.2 Técnicas de cultivo de células Vero y HEK293-T.....	49
IV.3.3.3 Transfección de células HEK293-T .....	49
IV.3.3.3.1 Transfección química .....	49
IV.3.3.3.2 Transfección con lipofectamina.....	50
IV.3.4 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	50
IV.3.4.1 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	50
IV.3.4.2 Recuento de parásitos .....	51
IV.3.4.3 Transfección de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	52
IV.4 Estudios de transporte de hemo .....	52
IV.4.1 Preparación de hemina y análogos de hemo .....	52
IV.4.2 Ensayos en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	53
IV.4.2.1 Efectos de la disponibilidad de hemo sobre el perfil de crecimiento .....	53
IV.4.2.2 Cuantificación de hemo (hemo B) intracelular.....	54

IV.4.3 Utilización de análogos de hemo en el estudio del transporte .....	55
IV.4.3.1 Ensayos en células Vero.....	55
IV.4.3.1.1 Ensayos de viabilidad de las células Vero frente a los diferentes análogos de hemo.....	55
IV.4.3.1.2 Ensayo de transporte de análogos de hemo en células Vero .	55
IV.4.3.2 Ensayos de transporte de análogos de hemo en tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	56
IV.4.3.3 Ensayos de transporte de análogos de hemo en amastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	56
IV.5 Manipulación de ácidos nucleicos.....	57
IV.5.1 Plásmidos .....	57
IV.5.2 Oligonucleótidos .....	60
IV.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	61
IV.5.3.1 Amplificación de la secuencia codificante <i>TcHTE</i> .....	61
IV.5.3.2 Amplificación de la secuencia codificante <i>TcHTE-HIS.noStop</i> .....	62
IV.5.3.3 Amplificación de la secuencia codificante de GFP .....	63
IV.5.3.4 Amplificación de la secuencia codificante de <i>TcHTE-HIS-GFP</i> .....	63
IV.5.3.5 Amplificación de la secuencia codificante de <i>P1TcHTE</i> .....	64
IV.5.3.6 PCR de colonias.....	64
IV.5.4 Clonados .....	65
IV.5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	66
IV.5.6 Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	66
IV.5.7 Digestión de ADN con enzimas de restricción .....	66
IV.5.8 Reacciones de ligación de fragmentos de ADN .....	66
IV.5.9 Purificación de ADN plasmídico a partir de células de <i>Escherichia coli</i>	67
IV.5.10 Secuenciación de fragmentos de ADN .....	67

IV.5.11 Cuantificación de ADN.....	67
IV.5.12 Purificación de ARNm de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	68
IV.5.13 Reacciones de Retro-transcripción .....	68
IV.5.14 Reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	68
IV.6 Manipulación de proteínas .....	69
IV.6.1 Obtención de extractos celulares totales de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	69
IV.6.2 Obtención de extractos celulares totales de los distintos estadios del ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	69
IV.6.3 Obtención de extractos celulares totales de células Vero .....	70
IV.6.4 Obtención de P1TcHTE .....	70
IV.6.5 Electro-elución de proteínas.....	71
IV.6.6 Obtención de anticuerpos policlonales contra P1TcHTE.....	71
IV.6.7 Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).....	72
IV.6.8 Western blot .....	73
IV.6.9 Ensayos de solubilización de proteínas en solución de lisis no desnaturalizante .....	75
IV.6.10 Ensayos de unión a hemo por cromatografía de afinidad a resina de hemina-agarosa .....	75
IV.7 Estudio de expresión de genes recombinantes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	76
IV.7.1 Ensayo de complementación en el sistema heterólogo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	76
IV.7.2 Análisis del efecto de la sobreexpresión de proteínas recombinantes en el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	77
IV.7 Microscopía.....	77
IV.7.1 Coloración de Giemsa .....	77

IV.7.2	Análisis de la incorporación de análogos de hemo .....	77
IV.7.3	Microscopía de células de levaduras sobreexpresantes de <i>TcHTE-HIS-GFP</i> recombinante .....	78
IV.7.4	Microscopía de parásitos sobreexpresantes de <i>TcHTE-HIS-GFP</i> .....	79
IV.7.5	Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en epimastigotes .....	79
IV.7.6	Purificación del complejo flagelar de epimastigotes.....	80
IV.7.7	Ensayo de protección frente a la digestión con proteasas.....	80
IV.7.7.1	Epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	81
IV.7.7.2	Células HEK293-T.....	81
IV.7.7	Estudio de la estequiometría de <i>TcHTE</i> .....	82
IV.8	Análisis Estadístico.....	83
V-	Resultados y Discusión .....	84
V.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> y su dependencia por el grupo hemo .....	85
V.1.1	Los epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> pueden incorporar hemo .....	85
V.1.1.1	Las variaciones en la concentración de hemina en cultivos axénicos de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> afectan su crecimiento .....	86
V.1.2	Utilización de análogos de hemo como herramienta para el estudio del transporte de hemo .....	92
V.1.2.1	Los epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> incorporan análogos de hemo.....	92
V.1.2.2	Los tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> no incorporan análogos de hemo .....	94
V.1.2.3	Los amastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> incorporan análogos de hemo.....	95
V.1.2.3.1	Citotoxicidad de los diferentes análogos de hemo sobre las células Vero.....	96
V.1.2.3.2	Las células Vero incorporan los diferentes análogos de hemo	97

V.1.2.3.3 Los amastigotes intracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> incorporan análogos de hemo .....	97
V.2. Transportadores de hemo en tripanosomátidos .....	99
V.2.1 Identificación de una proteína de <i>Trypanosoma cruzi</i> con homología a LHR1.....	100
V.2.2 Análisis de la secuencia de TcHTE.....	101
V.2.3 Clonado de TcHTE en diversos vectores de expresión .....	104
V.2.4. Diseño y obtención de anticuerpos policlonales de conejo específicos para el reconocimiento de TcHTE.....	111
V.3. Utilización de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como herramienta para el estudio de TcHTE .....	114
V.3.1. La expresión de la proteína TcHTE en <i>Saccharomyces cerevisiae hem1Δ</i> , le permite crecer en medios con concentraciones restrictivas de hemo .....	115
V.3.2. La proteína TcHTE se localiza en la membrana plasmática de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	117
V.4. Estudio de TcHTE en <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	119
V.4.1 Estudio de la proteína TcHTE recombinante en <i>Trypanosoma cruzi</i> ...	119
V.4.1.2 Obtención de parásitos transfectantes .....	119
V.4.1.2.1 Efecto de la sobreexpresión de TcHTE en el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	123
V.4.1.2.2 La proteína TcHTE se localiza en la región del bolsillo flagelar en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	126
V.4.1.2.3 El extremo C-terminal de la proteína TcHTE se encuentra expuesta hacia el lado citoplasmático de la membrana del bolsillo flagelar en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	130
V.3.1.3 Estudio de la localización de TcHTE en tripomastigotes y amastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	131
V.4.2 Estudio de la proteína TcHTE (endógena) en parásitos salvajes .....	136

V.4.2.1 Optimización de las condiciones para la detección de <i>TcHTE</i> .....	136
V.4.2.2 <i>TcHTE</i> y el ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	137
V.4.2.2.1 En los estadios replicativos de <i>Trypanosoma cruzi</i> se detecta mayor cantidad de transcripto de <i>TcHTE</i> .....	138
V.4.2.2.2 La proteína <i>TcHTE</i> se detecta mayoritariamente en los estadios replicativos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	139
V.4.2.3 Efectos de la disponibilidad de hemo (AHs) sobre la transcripción y acumulación de <i>TcHTE</i> en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	142
V.4.2.3.1 La concentración de hemina en el medio de cultivo modifica los niveles del transcripto de <i>TcHTE</i> en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	142
V.4.2.3.2 La acumulación de la proteína <i>TcHTE</i> en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> responde a la concentración de hemina en el medio de cultivo .....	145
V.4.2.3.3 La acumulación de la proteína <i>TcHTE</i> responde a los niveles intracelulares de hemo (HAs) .....	148
V.5 Estudio de la proteína <i>TcHTE</i> como posible transportador de hemo .....	150
V.5.1 Ensayos de unión a hemo por la proteína <i>TcHTE</i> .....	151
V.5.2 Utilización de células HEK293-T para el estudio de <i>TcHTE</i> .....	153
V.5.2.1 <i>TcHTE</i> se expresa en la membrana celular de las células HEK293-T formando trímeros .....	154
V.5.2.2 El extremo C-terminal de la proteína <i>TcHTE</i> se localiza hacia el interior celular .....	158
VI- Conclusiones.....	160
VII- Bibliografía.....	164

## **ABREVIATURAS y SÍMBOLOS**

ADN	ácido desoxirribonucleico
AHs	análogos de hemo
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
C-terminal	carboxilo terminal
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DO	densidad óptica
DS	desvío estándar
DTU	<i>Discrete Typing Units</i>
EROs	especies reactivas del oxígeno
FeCH	<i>ferrochelatase</i> (ferroquelatasa)
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
Gly/EtOH	<i>glycerol</i> (glicerol) y etanol
Glu	glucosa
GST	glutathion S-transferasa
G418	geneticina
Hb	hemoglobina
HO	hemo-oxigenasa
Hyg	higromicina B
IF	Intensidad de Fluorescencia
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
LB	medio rico Luria-Bertani
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i> (Infusion hígado triptosa)
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (Multiplicidad de infección)
MP	membrana plasmática

N-terminal	amino terminal
pb	pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (buffer fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PMSF	<i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i> (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
RE	retículo endoplasmático
SFB	suero fetal bovino
spp.	especies
TAE	buffer Tris acetato EDTA
Tet	tetraciclina
TM	región transmembrana
SCDO	medio de cultivo sintético selectivo
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecilsulfato sódico)
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en geles de poliacrilamida)
WT	<i>Wild Type</i> (salvaje)

## **LENGUAJE ESPECIAL**

<i>bleaching</i>	extinción de la fluorescencia
<i>carrier</i>	transportador
inmunoblot	membrana de nitrocelulosa con proteínas separadas por electroforesis, transferidas y detectadas por la técnica de Western blot
expresión <i>leaky</i>	expresión basal en ausencia de inductor
<i>knockout</i>	anulado, inactivado
<i>knockdown</i>	bloqueo, reducción
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
solución <i>stock</i>	solución madre, solución concentrada
<i>vortex</i>	dispositivo para agitar tubos o frascos de líquido
Western blot	inmunodetección de proteínas separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa

## **II- Resumen**

*Trypanosoma cruzi*, el agente causante de la enfermedad de Chagas-Mazza, carece de las enzimas de la vía de síntesis de hemo que está altamente conservada a lo largo de la evolución, dando origen a la auxotrofia por esta molécula esencial para los organismos aeróbicos [Koreny, *et al.*, 2010 - Panek y O'Brian, 2002]. Debido a esta deficiencia, *T. cruzi* debe incorporar este cofactor ya sea del hospedador mamífero o del insecto vector y al mismo tiempo controlar su distribución y concentración intracelular para evitar su toxicidad [Koreny, *et al.*, 2010]. Debido a sus características hidrofóbicas, la carga del ión central y su tamaño, el hemo no podría atravesar libremente las membranas biológicas, por lo que se ha propuesto que deben existir transportadores proteicos dedicados a esta función [Cupello, *et al.*, 2011 - Lara, *et al.*, 2007] que le permitirían al parásito incorporar suficiente hemo para completar su cuota. Si bien se han descrito y caracterizado diversos mecanismos de incorporación de hemo en organismos procariotas [Anzaldi y Skaar, 2010], los mecanismos de transporte en organismos eucariotas no han sido caracterizados en su totalidad, y particularmente en tripanosomátidos, se desconocen cuáles son las proteínas involucradas y cómo funcionan.

En este trabajo de tesis nos propusimos entonces, estudiar el proceso de importación del cofactor hemo en los diferentes estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, analizando su regulación y procurando la identificación de proteínas que cumplan su función en alguna de estas etapas del transporte.

Los resultados obtenidos han permitido profundizar el conocimiento general sobre el transporte de hemo en *T. cruzi*. Hemos avanzado en el estudio de la relación entre el hemo y el estadio de epimastigote analizando los efectos causados por los cambios en la disponibilidad de este cofactor sobre el parásito. Además, mediante la utilización de análogos fluorescentes de hemo (AHs) se logró determinar que el transporte de hemo ocurría solo en los estadios replicativos del parásito.

Por otro lado, hemos identificado en el genoma de *T. cruzi*, una secuencia codificante para una proteína de la familia HRG (debido a su nombre en inglés Heme Responsive Genes), a la cual denominamos *TcHTE*. Mediante ensayos de complementación heteróloga comprobamos que esta proteína facilita el transporte de hemo en levaduras (de allí su nombre *TcHTE* por Heme Transport Enhancer) [Merli, *et al.*, 2016]. Además, la expresión de la proteína recombinante como fusión a la proteína verde fluorescente en su extremo C-terminal (*TcHTE*-HIS-GFP) permitió identificar su

localización en la membrana plasmática de las levaduras). En el parásito, la expresión de la proteína recombinante, nos permitió determinar que en epimastigotes y tripomastigotes, la proteína se localiza en la región del bolsillo flagelar [Merli, *et al.*, 2016], mientras que en amastigotes la proteína recombinante se encontraría mayoritariamente en la región del bolsillo flagelar pero también pudo ser detectada en la membrana plasmática. Por otro lado, hemos comprobado que la expresión de la proteína recombinante en epimastigotes favorece la incorporación del cofactor hemo.

Hemos diseñado y obtenido anticuerpos policlonales de conejo que reconocen específicamente a *TcHTE*, los cuales fueron utilizados en distintas técnicas (como Western Blot (WB), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)) para analizar la acumulación de la proteína endógena en los diferentes estadios del ciclo celular del parásito, y su relación con la importación de hemo. Estos estudios fueron completados con el análisis de los niveles de transcritos de *TcHTE*, dando resultados concordantes. Tanto la acumulación de la proteína como los niveles de transcritos fueron más abundantes en los estadios replicativos del parásito siendo casi indetectables en el estadio de tripomastigote. Además, en epimastigotes determinamos que tanto la acumulación de la proteína como los niveles de transcritos, varían según la presencia de hemina en el medio de cultivo. A su vez, la utilización de los AHs nos permitió demostrar que el parásito regularía la expresión de la proteína *TcHTE* en función de la concentración intracelular de porfirinas (hemo y AHs).

Mediante diversas técnicas de microscopía, y la utilización de la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP, fuimos capaces de comprobar que el extremo C-terminal se encuentra localizado del lado citosólico de la célula (tanto en el parásito, como en células HEK293-T), tal como había sido predicho para las proteínas de la familia HRG [Huynh, *et al.*, 2012 - Rajagopal, *et al.*, 2008 - Yuan, *et al.*, 2012], siendo la primera vez que se comprueba experimentalmente. Además, los resultados que obtuvimos mediante TIRF-M indican que la proteína se encontraría formando multímeros (trímeros) en la superficie celular, lo que fortalece la hipótesis de que *TcHTE* forme parte del sistema responsable del transporte de hemo en *T. cruzi*.

En función de los resultados obtenidos, podemos concluir que *T. cruzi* solo incorpora hemo en los estadios replicativos, mediante la expresión de un complejo proteico en el bolsillo flagelar, que involucraría la participación de trímeros de *TcHTE*. Si

bien la regulación de la expresión del complejo es incierta, ésta respondería a la concentración y disponibilidad de hemo intracelular, permitiendo la incorporación del cofactor solo cuando es necesario, evitando así los efectos tóxicos de un exceso de hemo libre. Completar la elucidación de esta vía, identificando otras proteínas que participen en el proceso, y estableciendo los mecanismos de regulación, permitirían identificar nuevos blancos moleculares que puedan ser utilizados como estrategias para la inhibición de la proliferación de *T. cruzi*.

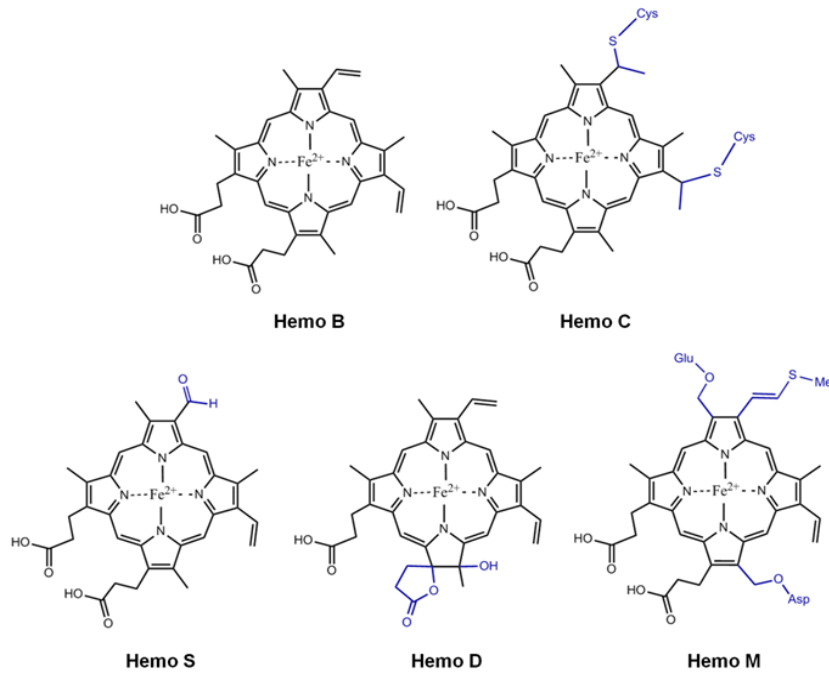
## **III- Introducción**

### **III.1 Consideraciones generales de porfirinas y el grupo hemo**

Las porfirinas son un conjunto de moléculas compuestas por un anillo tetrapirrólico con sustituyentes laterales que tienen la capacidad de unir un ión metálico central mediante cuatro enlaces de coordinación. Se clasifican basándose en los sustituyentes laterales del anillo, de modo que se distinguen mesoporfirinas, uroporfirinas, etioporfirinas y protoporfirinas. Estos compuestos orgánicos presentan características hidrofóbicas que les confieren la capacidad de interactuar con distintos componentes de las células como proteínas y lípidos.

El grupo hemo B, también llamado protohemo IX o simplemente hemo, es una molécula formada por un anillo de protoporfirina IX (PP) que coordina mediante los cuatro átomos de nitrógeno un ión de hierro central. Es una de las porfirinas de mayor relevancia biológica por ser el cofactor de la mayoría de las hemo-proteínas descritas hasta la fecha. El ión de hierro central puede encontrarse reducido u oxidado ( $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ ) lo que le confiere propiedades catalíticas especiales (de oxido-reducción) a las enzimas que poseen esta molécula como grupo prostético. Si bien suele nombrárselos indistintamente, cuando el ión central se encuentra oxidado,  $\text{Fe}^{3+}$ , se lo denomina hemina, y es la forma que predomina en su forma libre. Se han descrito diferentes formas de hemo que funcionan como grupos prostéticos en proteínas. Estos difieren entre sí por modificaciones en las cadenas laterales del anillo protoporfirínico, y entre ellos podemos mencionar al hemo C, hemo S, hemo D y hemo M, los cuales se muestra en la Figura 1 [Kumar y Bandyopadhyay, 2005 - Severance y Hamza, 2009 - Warren y Smith, 2009].

El hemo se encuentra involucrado en muchos aspectos del metabolismo oxidativo, siendo un cofactor esencial para la mayoría de los organismos aerobios [Kumar y Bandyopadhyay, 2005 - Panek y O'Brian, 2002 - Toh, *et al.*, 2010]. Participa del transporte de  $\text{O}_2$ , el transporte de electrones ( $e^-$ ) durante la fosforilación oxidativa, en la respuesta al estrés oxidativo, en la síntesis o detección de gases diatómicos, como el monóxido de carbono o el oxido nítrico [Rodgers, 1999] y en diversas reacciones de oxidación y detoxificación. El hemo también actúa como una molécula regulatoria en la expresión génica a nivel transcripcional [Hach, *et al.*, 1999 - Ogawa, *et al.*, 2001 - Schmitt, 1999]



**Figura 1. Estructura molecular de las distintas clases de hemo.** Existen distintas formas de hemo, todas ellas formadas por un anillo de protoporfirina IX coordinado a un ión central de hierro. Se diferencian entre sí por las cadenas laterales. Además del hemo B y C que son las especies más abundantes en los distintos organismos, se encuentra el hemo S presente en la hemoglobina de gusanos marinos, el hemo D presente en algunas catalasas y oxidasas respiratorias terminales bacterianas y el hemo M presente en mieloperoxidasas de neutrófilos de mamíferos. Los anillos de protoporfirina IX tiene una estructura de enlaces conjugados que la hacen rígida y le permiten absorber radiación en la zona visible del espectro. La absorción cambia con la presencia de distintas cadenas laterales y en algunos entornos proteicos pueden adaptar estructuras no planares [Severance y Hamza, 2009]. Adaptado de Warren y Smith, 2009 [Warren y Smith, 2009].

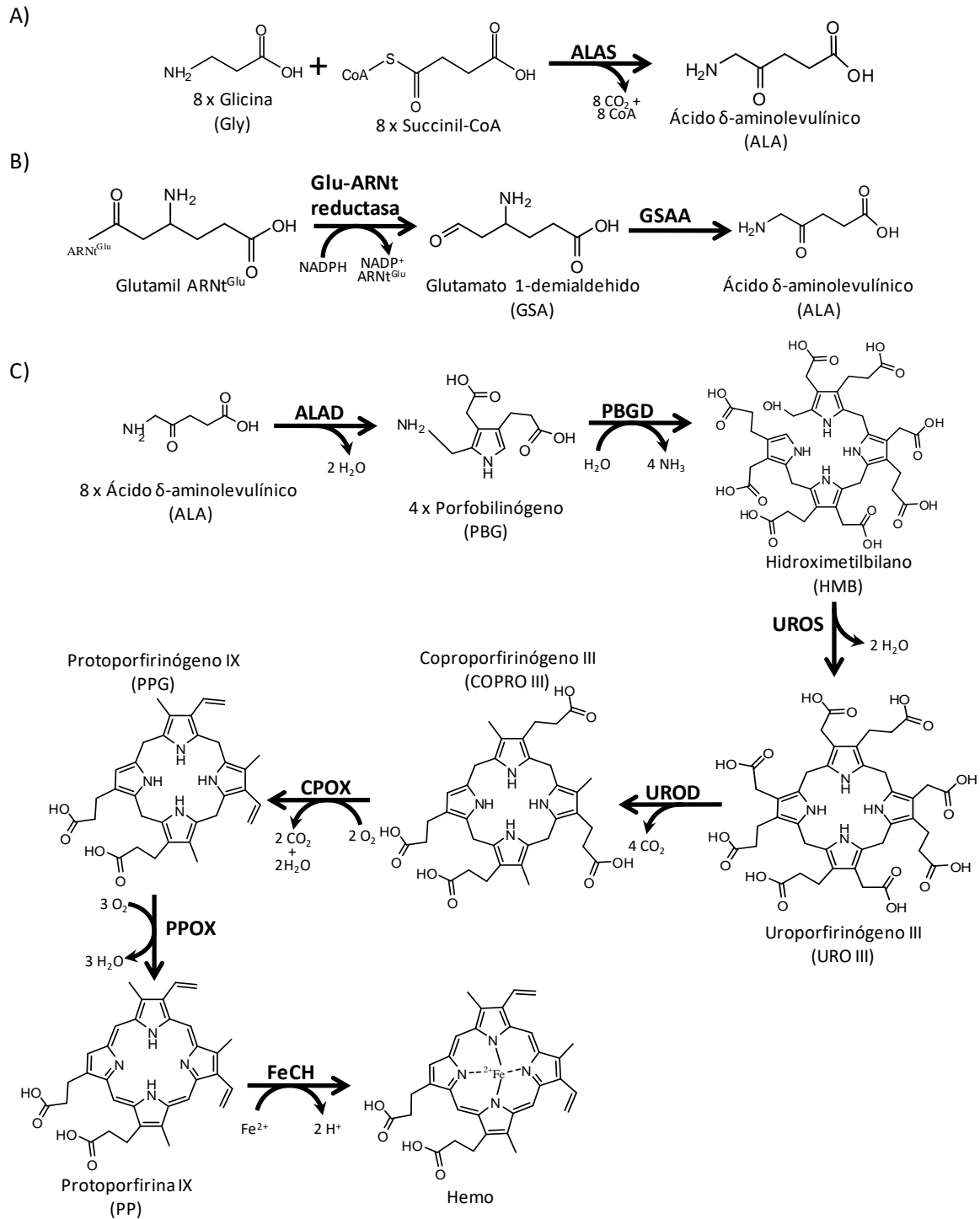
en la traducción [Chen y London, 1995], y en el marcado y la estabilización de diversas proteínas [Lathrop y Timko, 1993 - Qi, *et al.*, 1999]. También participa en el procesamiento de microARN y en la regulación del ritmo circadiano. En mamíferos posee además otras funciones como la regulación de la eritropoyesis, manteniéndose siempre relacionado con el control de los niveles y el transporte de oxígeno o con el metabolismo oxidativo [Khan y Quigley, 2011 - Koreny, *et al.*, 2013 - Krishnamurthy, *et al.*, 2007 - Tripodi, *et al.*, 2011]. Para cumplir estas funciones, el hemo se encuentra asociados a diferentes proteínas. Esta asociación puede ser mediante enlaces no covalentes, donde el hierro se coordina generalmente a residuos de histidina, metionina o cisteína de la cadena polipeptídica, o también puede asociarse mediante enlaces covalentes, generalmente entre los dos grupos vinilos de sus cadenas laterales a dos cisteínas por enlace tioéter como es el caso del hemo C [Warren y Smith, 2009].

Si bien el hemo es necesario para los organismos aerobios, debido a sus características fisicoquímicas/químicas, el hemo es un compuesto altamente tóxico. Si el hemo no se encuentra asociado a proteínas (hemo libre o hemo lábil), el ión hierro puede generar especies reactivas del oxígeno (EROs) gracias a sus propiedades redox, mediante la reacción de Fenton o la descomposición de compuestos orgánicos [Koreny, *et al.*, 2013 - Krishnamurthy, *et al.*, 2007]. También es capaz de generar daño directo sobre diferentes componentes celulares mediante la oxidación de lípidos, el daño a proteínas o el entrecruzamiento de las mismas formando agregados. Incluso es capaz de producir oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) en su estado excitado al absorber energía lumínica. También puede causar daño tanto el ADN genómico como mitocondrial y plasmídico [Krishnamurthy, *et al.*, 2007 - Kumar y Bandyopadhyay, 2005]. Por otra parte, las porfirinas son capaces de agregarse en las membranas alterando su permeabilidad hasta la disrupción celular.

Debido a la necesidad del hemo para muchos procesos celulares, y por su toxicidad a altas concentraciones, el metabolismo de hemo se encuentra finamente regulado, manteniendo a este cofactor siempre coordinado por alguna proteína [Koreny, *et al.*, 2013]. Pueden definirse dos poblaciones de hemo: Por un lado, se encuentra el hemo inerte, que es la forma más abundante y se encuentra unido con alta afinidad a las hemoproteínas, como citocromos y globinas. Por otro lado, se encuentra el hemo lábil, presente en bajas concentraciones, disponible para ser utilizado por hemoproteínas o como molécula señalizadora, cuya distribución y dinámica no han sido totalmente caracterizadas [Hanna, *et al.*, 2016].

### III.1.1 Biosíntesis de hemo

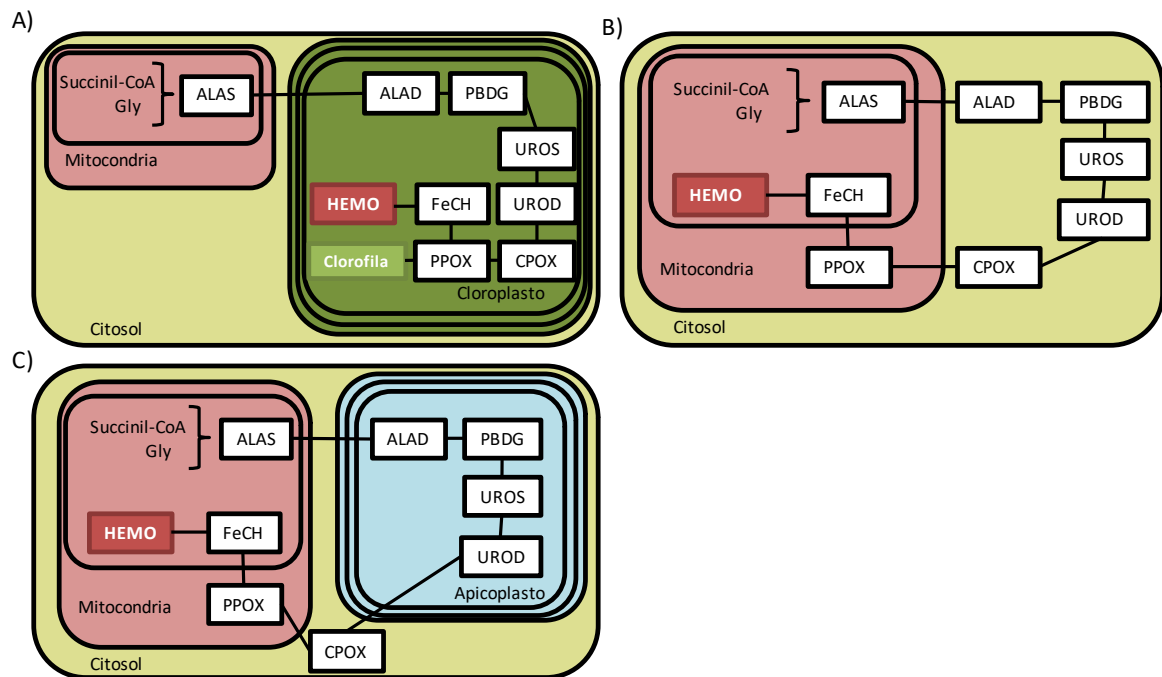
El anillo de protoporfirina IX que forma el hemo es un anillo tetrapirrólico con los siguientes sustituyentes laterales: cuatro grupos metilos, dos grupos vinilos y dos grupos propiónicos. La vía de biosíntesis de hemo está altamente conservada a lo largo de los tres dominios de la vida, existiendo diferencias sólo en la síntesis del ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA), primer precursor de la vía. Este metabolito es sintetizado a partir de glicina y succinil-CoA en  $\alpha$ -proteobacterias y en organismos eucariotas no fotosintéticos (Figura 2A). Los organismos eucariotas fotosintéticos y los organismos



**Figura 2. Biosíntesis de hemo.** A) Síntesis del precursor ácido  $\delta$ -aminolevulinico (ALA) a partir de glicina y succinil-CoA como ocurre en  $\alpha$ -proteobacterias y eucariotas no fotosintéticos. B) Reacción alternativa para la síntesis del primer precursor, el ácido  $\delta$ -aminolevulinico (ALA), como ocurre en la mayoría de los organismos procariontes y en los organismos eucariotas fotosintéticos a partir de glutamil ARNt<sup>Glu</sup>. C) Reacciones conservadas para la síntesis de hemo. Enzimas: ALAS (ácido  $\delta$ -aminolevulinico sintasa); Glu-ARNt reductasa (glutamil ARNt<sup>Glu</sup> reductasa); GSAA (glutamato 1-semialdehido aminotransferasa); ALAD (ácido  $\delta$ -aminolevulinico deshidratasa); PBGD (porfobilinogeno deaminasa); UROS (uroporfirinogeno III sintasa); UROD (uroporfirinogeno III decarboxilasa); CPOX (coproporfirinogeno III oxidasa); PPOX (protoporfirinogeno IX oxidasa) y FeCH (ferroquelatasa). Adaptado de Hamza, 2012; Warren, 2009 [Hamza y Dailey, 2012 - Warren

y Smith, 2009]. Existen dos formas de cada una de las enzimas CPOX y PPOX que son funcionalmente redundantes, una dependiente de oxígeno (como se muestra en la figura) y la otra independiente de oxígeno. Esto último, que es frecuente en procariotas, les permite sintetizar hemo en ausencia de oxígeno [Anzaldi y Skaar, 2010 - Panek y O'Brian, 2002].

procariotas, a excepción de las  $\alpha$ -proteobacterias, sintetizan ALA a partir de glutamyl ARNt<sup>Glu</sup> (Figura 2B). Las siguientes siete reacciones son comunes para ambas vías, (Figura 2C) difiriendo solo en la localización donde ocurren. Mientras que en organismos procariotas las reacciones ocurren en el citosol, en eucariotas fotosintéticos ocurre en el cloroplasto y en eucariotas no fotosintéticos se lleva a cabo parte en la mitocondria y parte en el citosol (Figura 3). Los apicomplexos constituyen un caso particular, donde la síntesis empieza y termina en la mitocondria, pero algunos pasos intermedios ocurren en un plástido no fotosintético llamado apicoplasto. Entre estos protistas se encuentra el género *Plasmodium*, causante de la malaria [Koreny, *et al.*, 2010 - Panek y O'Brian, 2002]. En todos los casos, la síntesis de hemo finaliza por la incorporación del ión de hierro en el centro del anillo protoporfirínico por una enzima con actividad ferroquelatasa (FeCH).



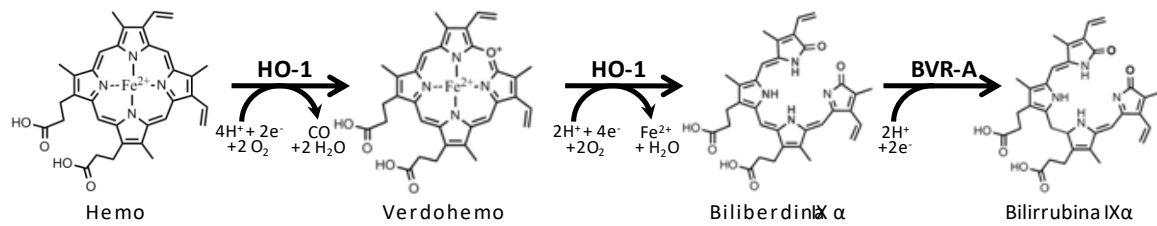
**Figura 3. Esquema de la compartimentalización de las enzimas de la vía de síntesis de hemo.** A) Las enzimas se localizan en el cloroplasto de los organismos fotosintéticos. B) En eucariotas no fotosintéticos, las enzimas se localizan tanto en la mitocondria como en el citoplasma. C) En organismos apicomplejos, las enzimas responsables de los pasos intermedios de la síntesis se localizan en el apicoplasto. Adaptado de Koreny, 2013 [Koreny, *et al.*, 2013].

Esta ruta también aporta intermediarios para la síntesis de otras porfirinas donde además de variar algunas de las cadenas laterales del anillo, puede cambiar el ión

metálico que se encuentra coordinado en el centro de la estructura [Khan y Quigley, 2011]. Por ejemplo, en organismos fotosintéticos aporta los precursores para la síntesis de clorofilas y bacterioclorofilas, que se lleva a cabo en el cloroplasto, donde luego de la formación de PP se inserta el ión  $Mg^{2+}$  y posteriormente se modifican las cadenas laterales [Warren y Smith, 2009]. Por otro lado, en la síntesis de la vitamina B12 (cobalamina), que solo se sintetiza *de novo* en procariotas, se produce una bifurcación de la vía a partir del precursor URO III que luego sufre modificaciones en sus cadenas laterales y la inserción de un ión  $Co^{2+}$  [Warren y Smith, 2009]. Tanto el hemo como los intermediarios de su síntesis pueden ser tóxicos, por lo que esta vía se encuentra regulada en función de la demanda de manera de no generar exceso de hemo, siendo la primera reacción -catalizada por la enzima ALAS- el paso limitante en eucariotas no fotosintéticos [Hamza y Dailey, 2012].

### III.1.2 Degradación y detoxificación de hemo

Los organismos poseen mecanismos de detoxificación con el fin de evitar la acumulación de exceso de hemo. La estrategia mejor descrita es la ruta canónica de degradación catalizada por enzimas hemooxigenasas (HO) (Figura 4) [Kumar y Bandyopadhyay, 2005]. Esta vía permite además la reutilización del hierro presente en el cofactor, por lo que muchos organismos patógenos la utilizan para recuperar este elemento a partir del hemo que incorporan desde el hospedador [Wilks y Burkhard, 2007]. El mecanismo de reacción de las HO se basa en la capacidad del hierro central de coordinarse al oxígeno molecular y romper el anillo de protoporfirina luego de una serie de oxidaciones-reducciones, donde se obtienen como productos:  $Fe^{2+}$ , CO y biliverdina IX $\alpha$  (pasando por el intermediario verdohemo). En humanos, la enzima biliverdina IX $\alpha$  reductasa-A actúa sobre la biliverdina IX $\alpha$  dando como resultado bilirrubina IX $\alpha$ , que es excretada por la bilis luego de ser conjugada a ácido glucurónico en el hígado para aumentar su solubilidad. En plantas y cianobacterias la vía de degradación de hemo catalizada por enzimas HO se utiliza además para producir pigmentos - ficobilinas y fitocromobilinas - derivados de la biliverdina [Khan y Quigley, 2011 - Kim, *et al.*, 2006 - Protchenko y Philpott, 2003 - Sakamoto, *et al.*, 2002 - Warren y Smith, 2009 - Wilks y Ikeda-Saito, 2014].



**Figura 4. Degradación de hemo.** Ruta canónica de la degradación de hemo por acción de la hemooxigenasa (HO-1) y la biliverdina IX $\alpha$  reductasa-A (BVR-A), dando como producto la formación de bilirrubina IX $\alpha$ .

Resulta interesante que en células de levaduras *Saccharomyces cerevisiae hmx1Δ* (*knockout* para el gen *HMX1*, que codifica para una enzima con actividad HO) se observó la degradación residual de hemo que apoyaría la existencia un mecanismo de degradación alternativo [Protchenko y Philpott, 2003]. Se han reportado otras enzimas que utilizan una ruta diferente para la degradación de hemo en *Mycobacterium tuberculosis* y *Staphylococcus aureus* entre otros [Nambu, *et al.*, 2013 - Wilks y Ikeda-Saito, 2014]. También se ha reportado que el glutatión reducido es capaz de degradar directamente el hemo en solución a pH 7 en presencia de oxígeno [Kumar y Bandyopadhyay, 2005] y ensayos realizados en eritrocitos mostraron que el glutatión protege del estrés oxidativo al degradar el hemo que está unido a las membranas de los mismos [Atamna y Ginsburg, 1995].

Otra forma de evitar los efectos tóxicos del exceso de hemo consiste en la formación de agregados, o su acumulación en organelas específicas, como se ha descrito en diversos organismos. Por ejemplo, el mosquito *Aedes aegypti* utiliza la matriz peritrófica para la retención selectiva de hemo protegiendo el epitelio intestinal [Toh, *et al.*, 2010]. La garrapata *Rhipicephalus microplus* produce un agregado no cristalino en una organela especializada de las células epiteliales llamada hemosoma donde se acumula el exceso de hemo que adquiere de la digestión de sangre. Posteriormente estas células digestivas se desprenden y se eliminan con las heces [Toh, *et al.*, 2010]. Por otro lado, la hemozoina, también conocida como pigmento malárico, es un polímero cristalino de hemo identificado por primera vez en enfermos de malaria. Si bien se desconoce el mecanismo de formación, se han identificado las proteínas HDP (debido a su nombre en inglés *Heme Detoxification Protein*) en especies de *Plasmodium*, que podrían participar en el sitio de iniciación o nucleación [Hamza y Dailey, 2012 - Jani, *et al.*, 2008 - Toh, *et al.*,

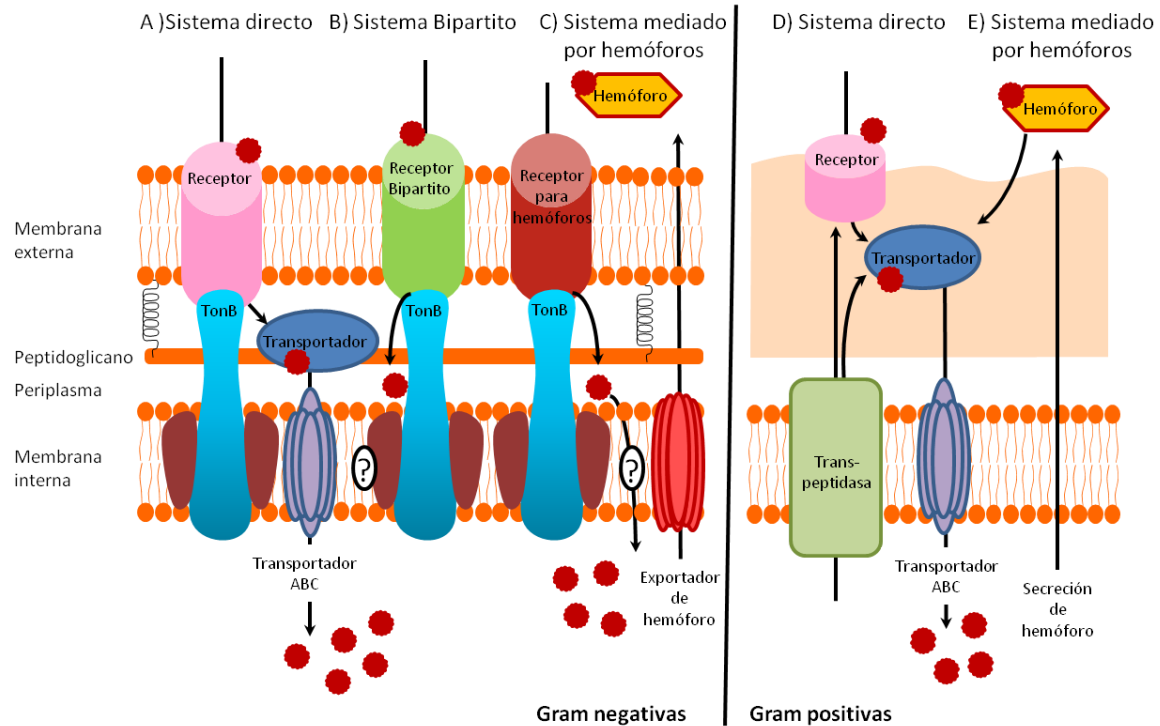
2010]. Este compuesto también se ha encontrado en el lumen intestinal del gusano parásito *Schistosoma mansoni* y del insecto hematófago *Rhodnius prolixus*.

En resumen, los organismos han desarrollado diferentes estrategias para defenderse de los efectos tóxicos del hemo cuando el mismo no se encuentra formando parte de hemoproteínas. Estos mecanismos de detoxificación consisten tanto en la degradación del hemo, como en su asociación a diferentes moléculas protectoras o su restricción a compartimentos especializados para su almacenamiento y eliminación.

### **III.1.3 Utilización del hemo como fuente de hierro**

El hierro es un cofactor esencial requerido para diversos procesos relacionados con la vida, como ser la formación de centros hierro-azufre, o su participación como componente de la ribonucleótido reductasa, entre otros [Lieu, *et al.*, 2001]. Es por ello que los organismos han desarrollado diversos mecanismos para la captación de este ión metálico. También se ha reportado que muchas bacterias patógenas requieren hierro para sus mecanismos de virulencia y patogenicidad [Wilks y Ikeda-Saito, 2014] y debido a que el hemo es la fuente de hierro más abundante en los vertebrados, muchas de ellas han desarrollado diferentes sistemas dedicados a su adquisición, degradación y posterior aprovechamiento del hierro.

Hasta la fecha se han caracterizado en profundidad diferentes mecanismos de importación de hemo, tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Figura 5) [Tong y Guo, 2009]. En bacterias Gram negativas se describieron tres sistemas de transporte diferentes: sistemas directos de captación de hemo, receptores bipartitos de hemo y sistemas de captación de hemo mediados por hemóforos. Los sistemas directos de captación de hemo unen las hemo-proteínas a un receptor de la membrana externa y transportan el hemo al periplasma mediante un sistema TonB dependiente. TonB es parte de un complejo de la membrana citoplásmica que aporta la energía necesaria para la captación de sustratos específicos hacia el periplasma, combinando la fuerza protón motriz de la membrana interna con la membrana externa. Una vez en el periplasma, el hemo es transportado al citosol mediante un transportador del tipo ABC en un proceso dependiente de ATP [Anzaldi y Skaar, 2010]. El sistema bipartito se diferencia del sistema directo en que tanto el receptor en la membrana externa, HpuB, como la lipoproteína de



**Figura 5. Mecanismos bacterianos para la incorporación de hemo.** Se identificaron tres sistemas de incorporación de hemo en bacterias Gram negativas (izquierda). A) Sistema directo, B) Sistema bipartito, C) Sistema mediado por hemóforos. La mayoría de los sistemas de importación de hemo en Gram negativas dependen de la energía suministrada por el sistema TonB. La incorporación de hemo en las bacterias Gram positivas (derecha) puede darse por dos vías: D) Sistema directo o E) Sistema mediado por hemóforos. Adaptado de Anzaldi, 2010 [Anzaldi y Skaar, 2010].

membrana HpuA deben estar asociados a TonB para poder unir y transportar hacia el interior celular, tanto hemoglobina como el complejo hemoglobina-haptoglobina, los cuales son utilizados luego como fuente de hierro [Anzaldi y Skaar, 2010]. Los sistemas de captación de hemo mediados por hemóforo implican la secreción de una proteína de unión a hemo, llamada hemóforo, que luego de su unión al cofactor es reconocida por un receptor de membrana externa que media la importación del hemo. Se han descrito dos sistemas de captación de hemo que utilizan hemóforos. Uno de ellos usa el hemóforo HasA y el otro HxuA. El sistema HasA encontrado en *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* y *Yersinia pestis*, codifica un complejo de exportación (HasDEF), un receptor de hemóforo (HasR) y proteínas reguladoras (HasI y HasS). La energía necesaria para el transporte es proporcionada por TonB. El receptor HasR también puede unir hemo libre así como hemo unido a hemoglobina, aunque estos procesos son menos eficientes que la adquisición de hemo mediada por el hemoforo HasA. El sistema HxuA ha sido descrito solo para *Haemophilus influenzae* tipo b y consiste en grupo de genes

hxCBA. Se cree que HxB exporta a HxA al exterior donde HxA se une al complejo hemo-hemopexina. El receptor para el complejo hemo-HxA aún no ha sido identificado, aunque se propone que la proteína HxC puede cumplir dicho rol. Mientras que el sistema HxA aumenta la diversidad de sustratos utilizables para la incorporación de hemo, el sistema HasA posee una mayor eficiencia para el transporte de hemo [Anzaldi y Skaar, 2010].

Las bacterias Gram positivas poseen sistemas de captación de hemo que consisten en receptores expuestos a la superficie celular, que transportan el hemo hasta el interior celular utilizando un transportador del tipo ABC. Estos sistemas suelen estar formados por diversas proteínas encargadas de la unión de hemoglobina o hemoglobina-haptoglobina, a partir del cual el hemo es recuperado y posteriormente degradado para liberar hierro. Estos sistemas son similares a los transportadores de hemo directos de bacterias Gram negativas, pero el sistema debe transportar el hemo a través de la gruesa pared celular de bacterias Gram positivas. Solo se identificó un sistema de captación de hemo mediado por hemóforo en bacterias Gram positivas en *Bacillus anthracis*. Dicho sistema se compone de dos proteínas secretadas, IsdX1 y IsdX2. Se sabe que IsdX1 es capaz unir el hemo de la hemoglobina y entregarlo al receptor para su transporte. Por otro lado, el papel fisiológico de IsdX2 no se ha identificado con claridad hasta el momento [Anzaldi y Skaar, 2010].

Debido a la importancia en la supervivencia de los microorganismos patógenos, la importación de hemo es considerado un blanco para el diseño de nuevas drogas antimicrobianas [Wilks y Burkhard, 2007].

### **III.1.4 Transporte de hemo en organismos eucariotas**

La mayoría de los eucariotas son capaces de sintetizar hemo. Sin embargo, existen algunos que carecen de la capacidad de producir este cofactor, entre los que se encuentran organismos protistas parasitarios, como ser *Giardia*, *Entamoeba*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Trichomonas* quienes adaptaron su vida a un entorno anaerobio o con poca abundancia de oxígeno [Pyrih, *et al.*, 2014]. En general estos organismos carecen de mitocondria, o poseen una mitocondria rudimentaria, y no necesitan de las proteínas encargadas de la detoxificación de las especies reactivas del

oxígeno. Además, se han descrito organismos eucariotas aerobios que requieren del grupo hemo como cofactor, pero no pueden producirlo porque carecen total o parcialmente de las enzimas para su síntesis, debiendo incorporarlo desde su dieta o desde el entorno. En los últimos años se ha avanzado hacia la identificación y caracterización de proteínas que podrían actuar *in vivo* como posibles transportadores de hemo [Yuan, *et al.*, 2013], aunque no se ha descrito íntegramente ningún sistema de transporte. El organismo modelo para el estudio del transporte de hemo en eucariotas es el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*, que carece de todas las enzimas de la vía de síntesis de hemo [Rao, *et al.*, 2005]. Mediante diversos ensayos se han identificado más de 370 genes de *C. elegans* cuya transcripción respondió a cambios en la concentración de hemo en el medio de cultivo y se denominaron genes HRG (debido a su nombre en inglés *Heme Responsive Genes*) [Severance, *et al.*, 2010]. Cuatro de ellos fueron estudiados en profundidad y fue posible asignarles una función relacionada al transporte de hemo. Entre ellos se encuentran los que codifican para las proteínas CeHRG-1 y CeHRG-4. Éstas son proteínas integrales de membrana y mediante estudios bioinformáticos se postuló que presentarían 4 hélices transmembrana y sus extremos amino como carboxilo terminal estarían expuestos al interior celular. Mediante la expresión de la proteína recombinante CeHRG-4 como proteína de fusión a YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) fue posible detectarla en la membrana plasmática de las células endoteliales del intestino del nematodo y se ha propuesto que mediaría la importación de hemo a partir de la ingesta. Por otro lado, la expresión de la proteína recombinante CeHRG-1 como proteína de fusión a GFP (*Green Fluorescent Protein*) fue detectada en compartimentos intracelulares y regularía la disponibilidad de hemo en estos compartimentos [Yuan, *et al.*, 2012]. Existen proteínas ortólogas a éstas en otros organismos como humanos, ratones, peces cebras, pollos y ranas [Rajagopal, *et al.*, 2008]. Por otro lado, la proteína CeHRG-2, que presentaría una única hélice transmembrana, participaría en la homeostasis de hemo en tejido hipodérmico extra intestinal, detectándose en retículo endoplasmático (RE) y en la membrana plasmática [Chen, *et al.*, 2012]. Se ha propuesto que la proteína CeHRG-3 sería responsable de llevar hemo del intestino materno a los oocitos durante el desarrollo de *C. elegans*, participando así de un transporte entre diferentes tipos de células [Chen, *et al.*, 2011].

Entre los organismos eucariotas de relevancia para la salud humana que necesitan incorporar hemo del entorno se encuentran los tripanosomátidos, los cuales carecen parcial o totalmente de una vía de síntesis de este cofactor. Estos organismos son protistas parasitarios que pueden causar enfermedades en el hombre y en animales alrededor del mundo. Entre los más relevantes se encuentran *Trypanosoma brucei*, causante de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana, diversas especies de *Leishmania*, causante de leishmaniasis, y *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas. [Berriman, *et al.*, 2005 - Koreny, *et al.*, 2010 - Tripodi, *et al.*, 2011].

### **III.2 Enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas fue identificada y estudiada por el médico brasileño Carlos Chagas (1879-1934), quien identificó a *T. cruzi* como el agente etiológico de la enfermedad (Figura 6), al vector hematófago y el hospedador, así como las manifestaciones clínicas y la epidemiología de la enfermedad. En Argentina, el médico Salvador Mazza (1886-1946) fue quien estudió la enfermedad a partir de 1926, mostrando la importancia sanitaria de esta endemia en el país, describiendo además las formas clínicas [Rassi, *et al.*, 2010]. Esta enfermedad es una zoonosis muy compleja que está presente en casi todo el territorio americano. Se encuentra distribuida principalmente en las zonas rurales y originalmente fue asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda. Actualmente los parámetros epidemiológicos hablan de 8 millones de personas infectadas en el mundo, en su mayoría en América Latina. Cada año, cerca de 10.000 muertes se asocian a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y más de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de contraerla (<http://www.who.int/chagas/disease/en/>). La enfermedad de Chagas es considerada la enfermedad parasitaria de mayor impacto económico en América Latina debido a su elevada cronicidad, con un costo anual de 4,7 mil millones de dólares [Lee, *et al.*, 2013].

La enfermedad de Chagas puede presentar una etapa aguda con cuadros febriles en un 10-15% de los casos. Esta etapa puede durar entre 4 y 8 semanas, y durante la misma el parásito puede detectarse en sangre. En algunos casos, principalmente en pacientes inmunodeprimidos, pueden darse cuadros de miocarditis y meningoencefalitis que llevan a la muerte al 5-10% de los casos sintomáticos. Cuando la enfermedad es



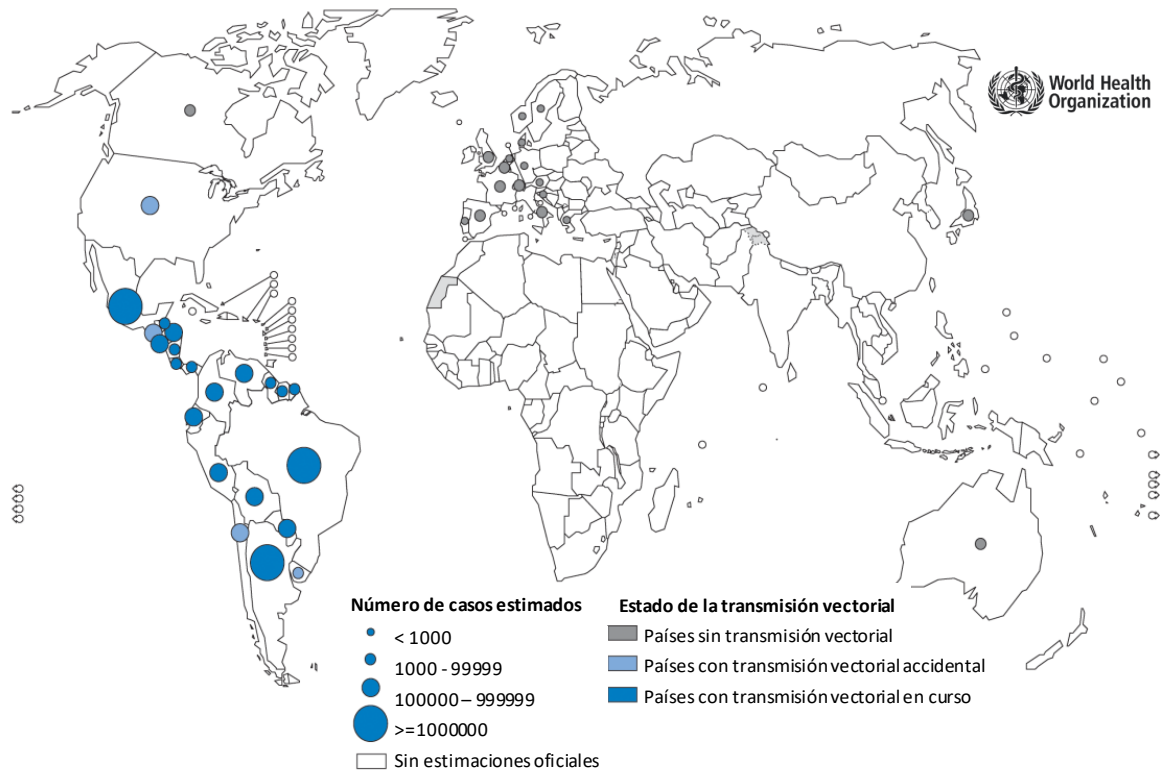
**Figura 6. Láminas del trabajo original de Carlos Chagas de 1909.** En la lámina de la izquierda se observan los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* encontrados en la sangre de humanos y animales infectados. En la lámina de la derecha se observan las formas encontradas en el insecto hematófago. En cada dibujo se detalla el núcleo y kinetoplasto en rojo. Adaptado de Chagas, 1909 [Chagas, 1909]

contraída por vía oral los síntomas suelen ser más severos, con múltiples afecciones digestivas, y además presenta mayor tasa de mortalidad, alcanzando al 35% de los casos. La etapa crónica de la enfermedad presenta sintomatología en el 30-40% de los pacientes. Los síntomas se manifiestan al cabo de 10 años o más de la primoinfección. Las principales patologías en esta etapa son miocardiopatías o dilatación patológica de vísceras huecas, como esófago o colon (mega síndromes). Los síntomas son causados por la anidación del parásito en estos órganos, y dependen tanto de la genética del hospedador como de la cepa de *T. cruzi*, ya que las mismas presentan tropismo por diferentes tejidos [Alarcon de Noya, *et al.*, 2010 - Andrade y Andrews, 2005 - Rassi, *et al.*, 2010].

### III.2.1 Formas de transmisión y distribución geográfica de la enfermedad

La forma original de transmisión de la enfermedad de Chagas es aquella que involucra directamente al insecto vector. Los triatomíneos capaces de transmitir la enfermedad pertenecen a 3 géneros de la familia Reduviidae subfamilia Triatominae: *Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. Los vectores más importantes en zonas urbanas son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma infestans*, siendo este último el de mayor relevancia en Argentina donde generalmente es conocido como vinchuca. Existen unas 100 especies de vertebrados que pueden ser infectados, entre los que se encuentran los murciélagos, perros, ratas, y otros mamíferos pequeños como mapaches y zarigüeyas [Clayton, 2010 - Fernandes y Andrews, 2012], que forman el reservorio original de la enfermedad. En un comienzo, la transmisión se daba mediante la picadura de los insectos hematófagos infectados a los animales sanos, o por ingesta del insecto o de un animal infectado. Si bien existen registros de humanos portadores de la enfermedad en la antigüedad, como las momias de 9 mil años encontradas en el norte de Chile y el sur de Perú [Clayton, 2010 - Coura, 2006 - Coura y Vinas, 2010], la problemática se incrementó cuando el hombre expandió las fronteras agrarias invadiendo los nichos originales de los triatomíneos, los cuales se adaptaron fácilmente al hábitat urbano.

Actualmente las formas más comunes de transmisión de la enfermedad son la transmisión vectorial (a través del insecto hematófago), la transmisión vertical (transmisión de una madre embarazada a su hijo en gestación), y la transmisión por vía oral (mediante la ingestión de alimentos contaminados). El parásito también puede entrar a través de la piel dañada en alguna lesión, o a través de las mucosas como ojos o boca. Otras formas de transmisión involucran accidentes de laboratorio, transfusión de sangre y el trasplante de órganos infectados. Estos últimos generaron un gran impacto debido al movimiento migratorio de personas portadoras del parásito a zonas no endémicas, donde no se realizaban los controles necesarios y provocó que la enfermedad de Chagas haya tomado relevancia en países de otras regiones como en EE.UU., Europa y Asia [Coura y Vinas, 2010 - Rassi, *et al.*, 2010] (Figura 7). Se estima la existencia de 300 mil personas infectadas en EE.UU., más de 5,5 mil en Canadá y más de 80 mil en Europa y Asia. Solo EE.UU., Canadá, España, Reino Unido, Francia, Suecia, Suiza e Italia controlan las



**Figura 7. Distribución geográfica de *Trypanosoma cruzi*.** Distribución de casos de infección por *T. cruzi*, basados en las estimaciones oficiales y el estado de la transmisión vectorial. 2006-2009. Adaptado de la Organización Mundial de la Salud. (<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>.)

donaciones de sangre, mediante análisis bioquímicos o mediante criterios de exclusión de donantes provenientes de zonas endémicas [Angheben, *et al.*, 2015]. Recientemente se mostraron evidencias de que la enfermedad de Chagas también podría transmitirse por vía sexual [Alarcon de Noya, *et al.*, 2010 - Clayton, 2010 - Ribeiro, *et al.*, 2016].

La principal estrategia de control de la enfermedad se basa en la interrupción de la transmisión vectorial mediante la eliminación del insecto de las zonas habitadas. Las campañas de fumigación, han permitido que Uruguay, Chile, Brasil y algunas provincias Argentinas, declaren ser libres de transmisión por *Triatoma infestans* con la consecuente disminución en la incidencia de casos humanos. También se hace énfasis en la detección y tratamiento de la transmisión congénita y en la administración de tratamientos a los casos agudos y a los niños. Estas intervenciones han contribuido a la interrupción de la transmisión en amplias regiones del continente americano.

En la actualidad no existe una vacuna contra *T. cruzi*, y los únicos dos medicamentos disponibles que se encuentran en el mercado desde hace más de 40 años

son el Benznidazol (Rochagan<sup>R</sup>, Radanil<sup>R</sup>), lanzado por Roche en 1972 y el Nifurtimox (Lampit<sup>R</sup>), lanzado por Bayer en 1967. En Argentina, ELEA ha comenzado a producir beznidazol (Abrax<sup>R</sup>) en 2012, luego de varios años en los que la producción había sido suspendida. Los tratamientos para esta enfermedad suelen ser largos (60 días) y solo son recomendados durante la fase aguda, en casos de Chagas congénito o en casos crónicos de pacientes menores de 14 años, donde suelen tener una efectividad del 80%. La principal dificultad para un tratamiento efectivo suele ser su discontinuidad debido a los efectos secundarios que ocasionan como dermatitis, anorexia, insomnio, vómitos, náuseas y neuropatías, entre otros [Clayton, 2010 - Rassi, *et al.*, 2010 - Schofield, *et al.*, 2006]. El tratamiento de los pacientes adultos con Chagas crónico es controversial. Si bien existen algunos estudios que muestran una disminución de la progresión de los cuadros clínicos, la mejoría no resultó ser significativa. Por otro lado, el tratamiento causó una disminución de la detección del parásito en sangre, pero esto no se correlacionó con una mejora en la progresión de los cuadros clínicos (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis* BENEFIT). En el último reporte sobre la Enfermedad de Chagas, tripanosomiasis Africana y leishmaniasis, realizado por el grupo de trabajo científico de la Organización Mundial de la Salud, se recomienda: promover la investigación en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y detección de estas enfermedades, incluyendo los casos de resistencia a drogas; promover el desarrollo de tratamientos con combinación de drogas anti-kinetoplástidos, reposicionando las drogas existentes y desarrollando nuevos fármacos y, finalmente, promover el desarrollo de nuevas tecnologías para el control vectorial y el estudio de características del vector, incluyendo la resistencia a insecticidas, entre otros. (Datos y recomendaciones tomadas del Reporte del Grupo de trabajo científico sobre la Enfermedad de Chagas, 27 de noviembre de 2012) ([http://www.who.int/tdr/news/2012/research\\_priorities/en/](http://www.who.int/tdr/news/2012/research_priorities/en/)).

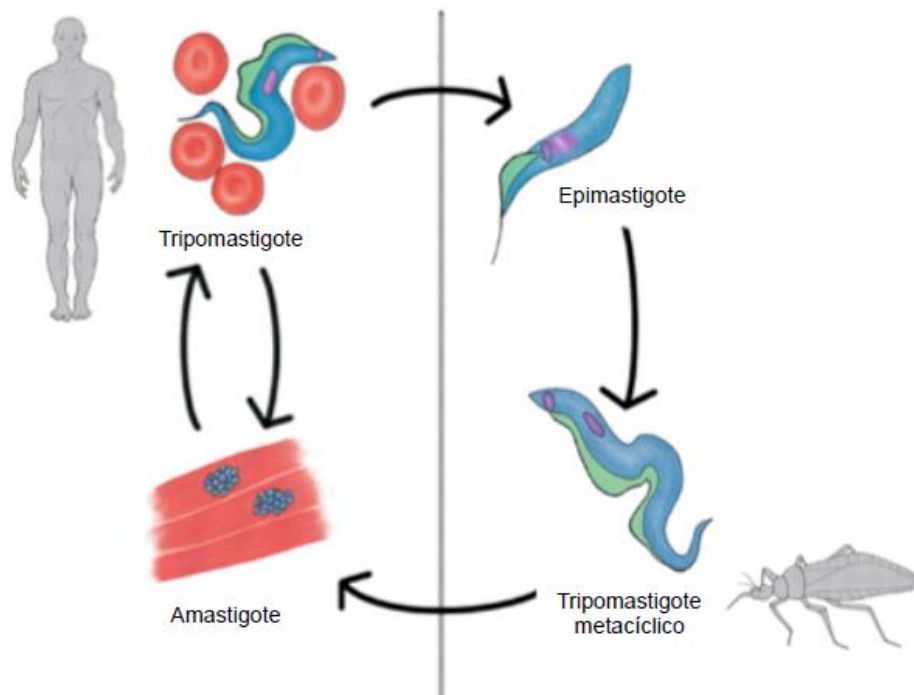
### **III.3 Aspectos generales de *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* es un protista perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* dentro del orden Kinetoplastida. Este orden incluye a un grupo de protozoos que se caracterizan por poseer una organela característica, el kinetoplasto, que es una porción modificada de una gran y única mitocondria donde se encuentra compactado el ADN

mitocondrial. El kinetoplasto se ubica próximo al núcleo y se encuentra conectado por estructuras filamentosas al cuerpo flagelar [Souto-Padron, *et al.*, 1984 - Souza, 2008]. *T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo (digenético) que comprende varias etapas diferenciadas en dos huéspedes. Tanto la estructura y localización del kinetoplasto, como el tamaño de la mitocondria, y la porción emergente de flagelo, varían de acuerdo al estadio del ciclo de vida que esté transitando el parásito [Tyler y Engman, 2001].

### III.3.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* presenta un ciclo de vida digenético, alternando entre un hospedador hematófago invertebrado y uno vertebrado (Figura 8). El ciclo comienza cuando el hospedador invertebrado se alimenta de sangre infectada del hospedador vertebrado. Durante la ingesta, los tripomastigotes (forma infectiva no replicativa) presentes en la sangre del hospedador vertebrado infectado son incorporados por el insecto. En el estómago del insecto, los tripomastigotes se diferencian a esferomastigotes y subsecuentemente a epimastigotes. Estos últimos son la forma replicativa en el insecto vector, que se dividen repetidamente por fisión binaria en el intestino medio, y luego se adhieren a las células intestinales durante su trayecto por el tracto digestivo. Una vez en el recto, se adhieren a la cutícula rectal, y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, los cuales son eliminados con las heces y la orina inmediatamente después que el insecto se alimenta de sangre [de Souza, *et al.*, 2010 - Tyler y Engman, 2000 - Tyler y Engman, 2001]. De esta forma, los tripomastigotes presentes en las heces y la orina quedan depositados sobre el hospedador vertebrado al cual infectan, penetrando por heridas o membranas mucosas. En los mamíferos el ciclo comienza con la penetración de los tripomastigotes metacíclicos a diversas células nucleadas, entre las que se encuentran macrófagos, fibroblastos o células epiteliales, mediante un proceso de endocitosis. Luego de la invasión, los parásitos se encuentran en una vacuola endocítica, denominada vacuola parasitófora, donde gradualmente se diferencian a amastigotes (forma replicativa dentro del huésped mamífero) y casi simultáneamente rompen la membrana que rodea la vacuola [Barrias, *et al.*, 2013 - de Souza, *et al.*, 2010 - Fernandes y Andrews, 2012 - Stecconi-Silva, *et al.*, 2003]. Posteriormente los amastigotes se dividen en contacto



**Figura 8. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** El parásito alterna entre un hospedador vertebrado y un insecto hematófago. Los tripomastigotes circulan en la sangre de los huéspedes infectados pero deben ingresar a las células y convertirse en amastigotes para replicarse. El insecto vector se infecta por ingestión de tripomastigotes al alimentarse de sangre de un mamífero infectado. Dentro del insecto los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes y se replican. Luego se transforman en tripomastigotes metacíclicos y pueden iniciar nuevas infecciones en mamíferos. Adaptado de Atwood, 2005 [Atwood, *et al.*, 2005].

directo con las estructuras citoplasmáticas. Luego de varios ciclos de división, un gran número de amastigotes puede hallarse en el interior de la célula. Un estímulo aún no caracterizado provoca la diferenciación de los amastigotes a epimastigotes intracelulares y luego a tripomastigotes sanguíneos, que se liberan al espacio intercelular por ruptura de la célula, ingresando así al torrente sanguíneo o linfático. Estas formas son capaces de infectar nuevas células y amplificar la infección en el hospedador vertebrado. Cuando un insecto se alimenta de sangre infectada del hospedador vertebrado, el ciclo vuelve a comenzar [Andrade y Andrews, 2005 - De Souza, 2002 - de Souza, *et al.*, 2010 - Souza, 2009 - Tyler y Engman, 2001].

### III.3.2 Características morfológicas de *Trypanosoma cruzi*

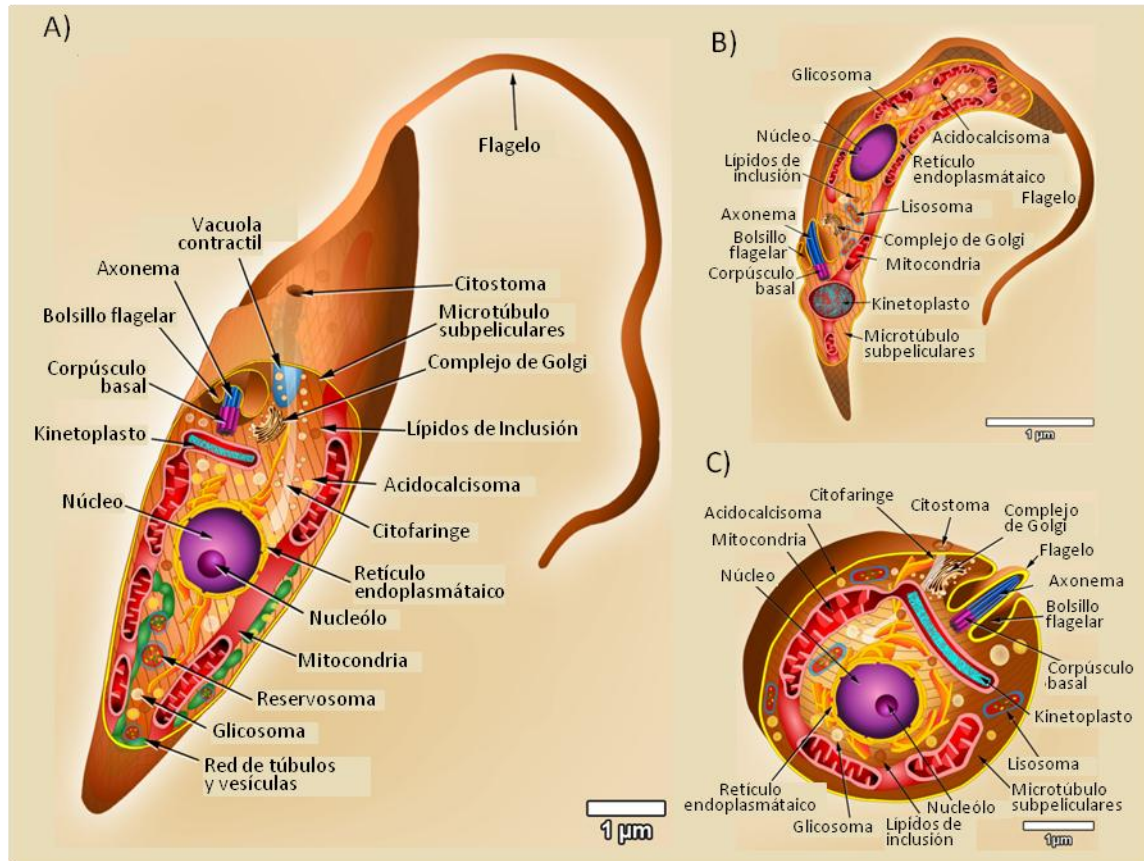
*T. cruzi* presenta algunas características que lo diferencian de otros eucariotas y muchas de ellas son compartidas por otros tripanosomátidos [de Souza, 2008]:

La superficie celular se compone de la membrana plasmática, no presenta pared celular, y debajo de la membrana se encuentra una red de microtúbulos subpeliculares que envuelven al parásito. Pueden distinguirse 3 regiones del parásito: el cuerpo celular, el flagelo, que se extiende desde el bolsillo flagelar y el bolsillo propiamente dicho. Este último es de gran importancia ya que no posee la red de microtúbulos subpeliculares y su membrana presenta una gran actividad endocítica y exocítica [Souza, 2009]. Los tripanosomátidos poseen una única mitocondria, donde el ADN mitocondrial forma una estructura compacta llamada kinetoplasto que es una característica distintiva de los kinetoplástidos. Este ADN representa entre el 20 y 25% del ADN total de las células y se compone por minicírculos de 0,5 - 2,5 Kpb y una docena de maxicírculos de 20 - 40 Kpb [Souza, 2009].

Los diferentes estadios del ciclo de vida pueden diferenciarse morfológicamente:

Los epimastigotes presentan morfología fusiforme (20-40  $\mu\text{m}$  de largo), con el kinetoplasto en forma de barra o bastón localizado en la región anterior respecto al núcleo. El flagelo emerge del bolsillo flagelar, localizado a un lado del cuerpo del parásito, y se mantiene unido al mismo mediante una membrana ondulante mientras recorre el cuerpo celular, hasta alcanzar la región anterior del parásito, desde donde se extiende libremente. En este estadio del ciclo de vida pueden detectarse los reservosomas, que son compartimentos ácidos ubicados en la parte posterior de la célula. Estas organelas/compartimientos se forman a partir de la fusión de vesículas de la vía endocítica que provienen del bolsillo flagelar junto con vesículas que provienen del aparato de Golgi y cumplen un rol importante en la acumulación y degradación de proteínas y almacenamiento de lípidos [Cunha-e-Silva, *et al.*, 2006 - Souza, 2009]. Los epimastigotes son la forma replicativa que se encuentra en el tubo digestivo del insecto vector y puede ser mantenido en cultivos axénicos (Figura 9A).

Los tripomastigotes también presentan morfología fusiforme (20-25 x 2  $\mu\text{m}$ ), pero en este estadio el kinetoplasto es redondeado y se encuentra localizado en la región posterior respecto al núcleo. Una característica de este estadio es que no puede detectarse el nucléolo. El flagelo emerge del bolsillo flagelar en la zona posterior del parásito y se adhiere a lo largo del cuerpo del parásito a través de una membrana ondulante que recorre todo el cuerpo celular, volviéndose libre en la región anterior. Esta



**Figura 9. Representaciones las diferentes formas de *Trypanosoma cruzi*.** A) Epimastigote. B) Tripomastigote. C) Amastigote. Se indican las organelas y estructuras celulares más importantes. Adaptado de Teixeira, 2012 [Teixeira, *et al.*, 2012].

forma es altamente infectiva, carece de capacidad replicativa y puede ser encontrada en la porción posterior del intestino (tripomastigotes metacíclicos) del insecto vector, en la sangre y el espacio intercelular de los hospedadores vertebrados (tripomastigotes sanguíneos) y también pueden obtenerse a través de cultivos de células infectadas ó en cultivo axénico (metacicloogénesis *in vitro*) (Figura 9B).

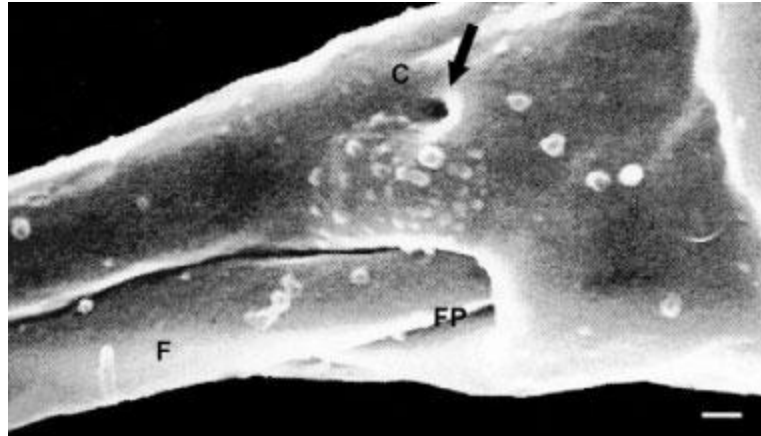
Los amastigotes presentan morfología ovoide (3-6 μm), con el kinetoplasto en forma de barra o bastón localizado en la región anterior respecto al núcleo. Poseen un flagelo corto (no visible al microscopio óptico) que apenas emerge del bolsillo flagelar. Esta es la forma replicativa que se encuentra dentro de las células del hospedador vertebrado y se puede obtener por infección de células en cultivo. También se han descrito protocolos de formación de amastigotes en cultivos axénicos, pero no queda claro cuan similares son estas formas obtenidas *in vitro* a los amastigotes celulares (Figura 9C).

### III.3.3 Mecanismos de transporte de metabolitos en tripanosomátidos

Una característica particular de los tripanosomátidos es la expresión de diversas proteínas en su superficie que le permiten evadir el sistema inmune del hospedador. Esto hace que muchas de las proteínas necesarias para el transporte de metabolitos se encuentren restringidas en sectores especializados de las células. En los tripanosomátidos en general, los procesos de transporte ocurren en el bolsillo flagelar, que es la región de donde emerge el flagelo y se forma por la invaginación de la membrana plasmática, la cual se continúa con la membrana del flagelo. En la región donde el flagelo emerge del bolsillo, las membranas están tan próximas que se considera que esto puede restringir el ingreso de ciertas macromoléculas al bolsillo. Existe vasta evidencia que indica que la membrana del bolsillo flagelar está altamente especializada en el transporte de metabolitos. Además, es la única región del parásito que no presenta la barrera de microtúbulos subpeliculares, por ello los procesos de endocitosis y exocitosis pueden darse con mayor facilidad [De Souza, 2002 - Landfear y Ignatushchenko, 2001 - Souza, 2009]. Por otra parte, en *T. cruzi* se ha reportado la existencia de otro complejo mediante el cual pueden internalizarse diversas macromoléculas: el citostoma-citofaringe, que solo se observa en los estadios de epimastigotes y amastigotes (Figura 10) [Porto-Carreiro, *et al.*, 2000 - Souza, 2009]. Este complejo consiste en una invaginación de la membrana plasmática donde la apertura se llama citostoma y el tubo que forma la invaginación es llamado citofaringe. El citostoma se encuentra próximo al bolsillo flagelar, mientras que las reconstrucciones tridimensionales del citofaringe demuestran que el mismo se extiende hacia la región posterior del kinetoplasto, finalizando cerca del núcleo, o incluso posterior al mismo [Alcantara, *et al.*, 2014 - Ramos, *et al.*, 2011]. Al igual que el bolsillo flagelar, se considera que este complejo cumple una función esencial en los procesos endocíticos y de transporte en general [Eger y Soares, 2012 - Ramos, *et al.*, 2011].

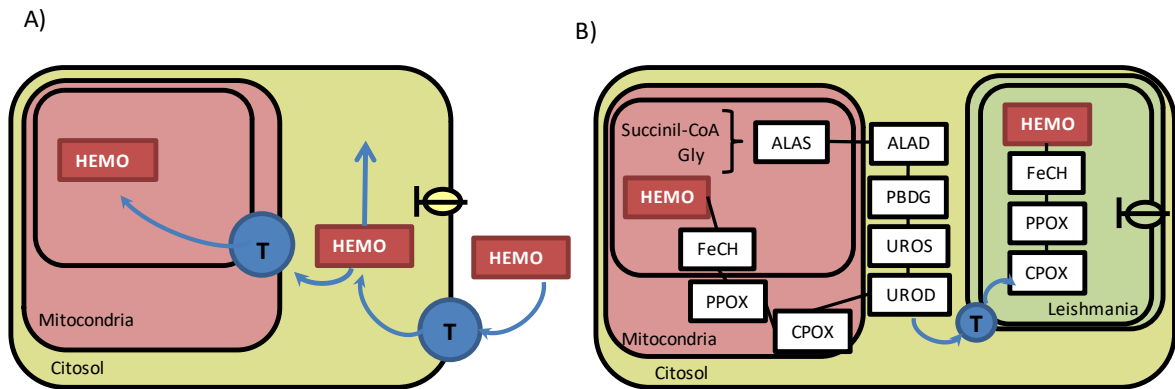
### III.3.4 El metabolismo de hemo en tripanosomátidos

Anteriormente mencionamos que *T. cruzi* al igual que otros tripanosomátidos requieren hemo como cofactor esencial debido a que carecen de la habilidad para producirlo [Berriman, *et al.*, 2005 - El-Sayed, *et al.*, 2005].



**Figura 10. Citostoma y bolsillo flagelar de epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.** Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de un epimastigote de *T. cruzi* donde puede observarse el citostoma (C), el flagelo (F) y el bolsillo flagelar (FP). La flecha indica la apertura del citostoma. Barra= 0,1  $\mu$ m. Tomado de de Souza, 2009 [de Souza, *et al.*, 2009].

Si bien las enzimas de la ruta de síntesis de hemo se encuentran muy conservadas en los tres dominios de la vida, es válido preguntarse si en estos organismos no existiría una vía alternativa, no conservada para su producción y que estas enzimas fueran a su vez lo suficientemente divergentes como para no ser detectadas mediante búsqueda por homología [Berriman, *et al.*, 2005 - El-Sayed, *et al.*, 2005]. Esta opción es muy poco probable ya que la evidencia recabada muestra que la vía se encuentra conservada incluso en organismos altamente divergentes como lo son especies de *Plasmodium*. A su vez, los intermediarios de la ruta no pudieron ser detectados en *T. cruzi*, apoyando la hipótesis de la ausencia de una vía de síntesis de hemo [Lombardo, *et al.*, 2003 - Salzman, *et al.*, 1982]. Por otro lado, se ha demostrado que algunos tripanosomátidos, entre los que se encuentran especies de *Leishmania* y *Crithidia fasciculata*, pueden crecer en medios de cultivo donde la hemina es reemplazada por PP (protoporfirina IX), indicando que dichos organismos presentarían actividad ferroquelatasa (FeCH), la última enzima de la vía [Akilov, *et al.*, 2007 - Chang, *et al.*, 1975 - Sah, *et al.*, 2002]. Este hecho fue confirmado luego de que se identificaran las enzimas ortólogas a las últimas 3 enzimas de la vía (CPOX, PPOX y FeCH), en el genoma de *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*, por lo que se piensa que estos organismos podrían sintetizar hemo a partir de sus intermediarios tomados desde el hospedador, aunque esto aún no ha sido demostrado (Figura 11). Se ha postulado que un ancestro común de todos los tripanosomátidos existentes perdió los genes necesarios para la síntesis de hemo durante la evolución, posiblemente debido a su adaptación a un estilo de vida parasitario. El ancestro común



**Figura 11. Esquema de obtención y producción de hemo por diferentes tripanosomátidos.** A) Tripanosomátidos que carecen de las enzimas de la vía de síntesis de hemo, deben incorporar hemo del hospedador. B) Macrófago infectado por *Leishmania*, donde además de poder incorporar hemo del hospedador, puede incorporar los intermediarios y completar la síntesis gracias a que posee las 3 últimas enzimas de la vía. Adaptado de Konery, 2009 [Konery, *et al.*, 2010].

de los tripanosomátidos, que no son *Trypanosoma*, podría haber establecido una relación de endosimbiosis con  $\gamma$ -proteobacterias, las cuales brindarían el hemo necesario. Posteriormente, estos tripanosomátidos habrían adquirido los genes que codifican para las enzimas de los últimos tres pasos de la síntesis de hemo por transferencia horizontal de genes a partir de los endosimbiontes antes de perderse en el proceso evolutivo [Konery, *et al.*, 2010].

### III.3.5 Los tripanosomátidos y el transporte de hemo

Siendo los tripanosomátidos auxótrofos para hemo, deben incorporarlo desde medio extracelular para suplir esta carencia, ya sea en el insecto vector o en el hospedador vertebrado. Una vez dentro del parásito, el hemo debe ser transportado y ensamblado en las proteínas que lo requieran, así como también puede ser utilizado como fuente de hierro [Tong y Guo, 2009]. Se ha reportado que *Leishmania* puede utilizar tanto hemo libre con hemoglobina en los estadios replicativos del parásito, ya sea en amastigotes intracelulares en el hospedador mamífero como en promastigotes en el insecto vector, para suplir sus necesidades tanto de hemo como del ión hierro [Campos-Salinas, *et al.*, 2011 - Carvalho, *et al.*, 2009].

Recientemente se han descrito proteínas de tripanosomátidos cuya función estaría relacionada con el transporte y/o metabolismo de hemo. En *L. amazonensis* se ha identificado una proteína de localización en membrana plasmática y compartimentos

intracelulares acídicos que posee cierta homología con la proteína CeHRG-4, denominada LHR1 (*LaHR1* para diferenciar a las proteínas de la familia identificadas en distintas especies de *Leishmania*), cuyos niveles de transcritos responden a la presencia de hemo en el medio de cultivo y es capaz de regular los niveles intracelulares de hemo en promastigotes [Huynh, *et al.*, 2012]. Cabe destacar que si bien las secuencias nucleotídicas no tienen gran homología, las predicciones bioinformáticas para las proteínas codificadas por estos genes indican en todos los casos que las mismas presentarían cuatro dominios transmembrana con los extremos amino y carboxilo dirigidos hacia el citoplasma. *LaHR1* se encontraría involucrada en la importación de hemo libre cuando se localiza en la membrana plasmática aunque se desconoce si es en sí misma el transportador, o si actúa en conjunto con otras proteínas formando parte de un complejo. Por otro lado, la hemoglobina sería incorporada mediante endocitosis mediada por receptor [Carvalho, *et al.*, 2009 - Krishnamurthy, *et al.*, 2005] dirigiéndose a compartimentos endocíticos. En este caso, la proteína LABC5, que se localiza en vesículas internas, se encargaría del tráfico intracelular del hemo proveniente de la degradación de la hemoglobina hacia la mitocondria [Campos-Salinas, *et al.*, 2011]. En este proceso, *LaHR1* también participaría del proceso de transporte localizándose en compartimentos endocíticos. Además se ha reportado que esta proteína es importante tanto para la replicación de promastigotes como para el proceso de infección y la replicación de amastigotes [Huynh, *et al.*, 2012 - Miguel, *et al.*, 2013 - Renberg, *et al.*, 2015].

También se ha observado que la forma replicativa sanguínea de *T. brucei* es capaz de incorporar hemo a partir de la hemoglobina mediante un proceso de endocitosis en el bolsillo flagelar, captando el complejo haptoglobina-hemoglobina (HpHb) mediante su receptor *TbHpHbR* expresado en la membrana del bolsillo [Vanhollebeke, *et al.*, 2008]. Receptores de este tipo también fueron encontrados en *T. vivax* y *T. congolense*, que presentan estadios sanguíneos extracelulares en los hospedadores mamíferos al igual que *T. brucei*. Además se ha mostrado que, para la obtención de hierro, la forma sanguínea de *T. brucei* expresa las proteínas ESAG6 y ESAG7, que forman un heterodímero localizado en el bolsillo flagelar que media la incorporación de la transferrina por endocitosis [Taylor y Kelly, 2010]. Por otro lado, la forma procíclica de *T. brucei* (forma replicativa dentro del

insecto) es capaz de incorporar hemo a partir de su forma libre y no desde la hemoglobina [Perez-Morga, *et al.*, 2005 - Vanhamme, *et al.*, 2003 - Vanhollebeke, *et al.*, 2008 - Vanhollebeke, *et al.*, 2007].

Estudios realizados en epimastigotes de *T. cruzi* mostraron que su proliferación requiere de la presencia de hemo ya sea en su forma libre o presente en la hemoglobina. Se ha propuesto que *T. cruzi* podría utilizar diferentes fuentes de hierro dependiendo del estadio celular en que se encuentre ya que durante su ciclo de vida, el parásito alterna entre ambientes muy diferentes en cuanto a calidad y disponibilidad de nutrientes [Lara, *et al.*, 2007]. De este modo, los epimastigotes podrían incorporar transferrina, hemoglobina y hemo provenientes de la ingesta de sangre por el insecto hematófago, los tripomastigotes sanguíneos podrían incorporar hemoglobina y transferrina, y los amastigotes podrían incorporar mioglobina y hemo de las células musculares [Taylor y Kelly, 2010]. Además, se ha demostrado que los epimastigotes son capaces de incorporar hemoglobina por endocitosis y hemo mediante un transportador de membrana, ocurriendo ambos procesos en el bolsillo flagelar. La incorporación de hemo procedería a mayor velocidad que la internalización de hemoglobina. Una vez en el interior celular, ambos compuestos se acumularían en la zona posterior del parásito, posiblemente en reservosomas [Lara, *et al.*, 2007]. Por otra parte, se ha mostrado que el sistema de transporte de hemo involucraría la actuación de un complejo proteico que es afectado por la presencia de inhibidores de transportadores del tipo ABC [Cupello, *et al.*, 2011 - Lara, *et al.*, 2007].

### **III.3.6 Relevancia del estudio del metabolismo de hemo en *Trypanosoma cruzi***

Los tripanosomátidos son auxótrofos para el hemo, por lo que deben incorporarlo del medio [Koreny, *et al.*, 2010], transportarlo a los diferentes compartimentos subcelulares donde es requerido, incluida la mitocondria (matriz y espacio intermembrana), insertarlo en las hemo-proteínas blanco, y al mismo tiempo deben controlar la concentración intracelular de hemo libre o lábil para evitar su citotoxicidad. Por ello conocer en detalle la vía de transporte, distribución y su regulación resultan atractivos para ser validados como posibles blancos terapéuticos que permitan controlar

la proliferación y desarrollo de esta parásito, así como se ha propuesto para bacterias, donde los mecanismos de transporte y distribución de hemo son distintos a los empleados por eucariotas y en especial el humano [Wilks y Burkhard, 2007]. Por otro lado, es interesante mencionar que la mayoría de los organismos modelo normalmente empleados poseen una vía de biosíntesis de hemo, dificultando el estudio del transporte de este metabolito ya que resulta complejo poder distinguir entre el hemo endógeno y aquel incorporado desde medio extracelular. Es por esto que *T. cruzi* resulta un modelo interesante para el estudio de los mecanismos de transporte de hemo, por ser una ruta esencial para el parásito, donde podrían encontrarse mecanismos novedosos para el transporte de este metabolito.

### **III.4 Objetivos**

Es por todo lo antes expuesto que, como objetivo general de esta Tesis nos proponemos el estudio del proceso de importación del cofactor hemo en los diferentes estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, analizar su regulación y procurar la identificación de proteínas que cumplan su función en alguna de las etapas del transporte de hemo.

Para lograr este objetivo general, nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la dependencia de hemo en el estadio de epimastigotes, estudiando los efectos de la ausencia o exceso del cofactor sobre el parásito y corroborar el transporte de hemo en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, utilizando análogos fluorescentes de hemo, mediante el empleo de técnicas de microscopía.
- Identificar la/las proteínas involucradas en el transporte de hemo y/o su regulación.
- Evaluar el rol de las proteínas identificadas (*TcHTE*) utilizando organismos modelos para corroborar su funcionalidad y localización.
- Estudiar la proteína (*TcHTE*) en *Trypanosoma cruzi*, analizando su relación con el transporte de hemo y los mecanismos de regulación, en los distintos estadios del ciclo de vida del parásito.
- Evaluar a *TcHTE* como posible proteína responsable del transporte de hemo.

## **IV- Materiales y Métodos**

## **IV.1. Análisis bioinformáticos**

### **IV.1.1 Búsqueda de secuencias y análisis predictivos.**

La búsqueda de secuencias ortólogas al gen LHR1 se realizó por el programa BLAST en la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>), utilizando como semilla la secuencia LmjF.24.2230 perteneciente a *Leishmania major*. La base de datos también proporcionaba las traducciones de los ORFs encontrados. La secuencia de aminoácidos de LHR1 fue obtenida del trabajo publicado por el Dr. Huynh C [Huynh, *et al.*, 2012]. La secuencia del gen CeHGR-4 isoforma b se obtuvo de la base de datos WormBase (<http://wormgene.org>).

Las secuencias proteicas se analizaron con el programa CCTOP (*Constrained Consensus TOPology prediction server*, <http://cctop.enzim.ttk.mta.hu>) [Dobson, *et al.*, 2015], así como con el programa TMHMM *server* 2.0, <http://cbs.dtu.dk/services/TMHMM>, perteneciente al Centro de Análisis Biológico de Secuencias Proteicas de Dinamarca para predecir las posibles regiones transmembrana y la orientación de los bucles intermedios. Además se utilizó el programa I-TASSER de la Universidad de Michigan, (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), para la predicción de estructura en tres dimensiones [Zhang, 2008].

Las predicciones de antigenicidad fueron realizadas con el programa Preditop de la Universidad Complutense de Madrid (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.html>) [Kolaskar y Tongaonkar, 1990].

El árbol filogenético se realizó con el programa Phylogeny.fr [Dereeper, *et al.*, 2010 - Dereeper, *et al.*, 2008]. Los alineamientos múltiples de secuencia fueron realizados con los programas Clustal W y Clustal X versión 2.0, (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) [Larkin, *et al.*, 2007]. Los porcentajes de identidad y similitud se calcularon a partir de estos alineamientos obtenidos en el programa Sci Ed Central Clone manager 7, versión 7.11.

## IV.1.2 Análisis de los resultados de secuenciación

Para el análisis de secuencias, alineamientos y diseño de cebadores se utilizó el programa Sci Ed Central Clone manager 7, versión 7.11.

Las secuencias de ADN resueltas por el servicio “DNA Sequencing Facility” de la Universidad de Maine, EE.UU., fueron analizadas con el programa Chromas Lite versión 2.01, Technelysium Pty Ltd, (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>).

## IV.2 Cepas bacterianas, levaduras y líneas celulares

### IV.2.1 Cepas bacterianas utilizadas

Para el clonado de los genes en estudio y para el mantenimiento de los plásmidos utilizados se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : *F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 hsdR17(*rK mK*<sup>+</sup>)  $\lambda$ <sup>-</sup>*.

Para la expresión y posterior purificación de proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizó la cepa BL21(DE3)pLysS': *F' ompT (*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>+</sup>*) dcm gal (DE3) pLys' Cm<sup>r</sup>*.

### IV.2.2 Cepas de levaduras utilizadas

Para los estudios de la funcionalidad de las proteínas estudiadas se utilizaron las siguientes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*:

- **salvaje (WT)**, DY5113: MATa (W303) *ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1 $\Delta$  ura3-1* (donada por Dennis R. Winge, Universidad de Utah, EE.UU.).
- **hem1 $\Delta$** , derivada de DY5113 (W303): MAT, *ura3-52, leu2-3, 112, trp1-1, his3-11, ade6, can1-100(oc), hem1::LEU2*

### IV.2.3 Líneas celulares utilizadas

Para el estudio del metabolismo de hemo en *Trypanosoma cruzi* se utilizó la cepa Dm28c (DTU I, aislado en Carabobo – Venezuela, de *Didelphis marsupialis*).

Para obtener los estadios de amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, se realizaron infecciones de células Vero (ATCC CCL-81, derivadas de células epiteliales de riñón de mono verde africano) disponibles en el laboratorio.

Para el estudio de la conformación estequiométrica de TcHTE y su topología, se utilizaron células HEK293-T (ATCC CRL-3216, derivadas de riñón embrionario humano), disponibles en el laboratorio.

### **IV.3 Técnicas de cultivo**

#### **IV.3.1 *Escherichia coli***

##### **IV.3.1.1 Medios de cultivo para *Escherichia coli***

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio rico Luria-Bertani (LB) que contiene: 0,5% p/v extracto de levadura, 1% p/v peptona, 1% p/v NaCl (Difco<sup>®</sup>). En su forma sólida, este medio incluye 1,5% p/v agar-agar. Se emplearon los siguientes antibióticos: 50 µg/ml kanamicina, 30 µg/ml cloranfenicol y 150 µg/ml ampicilina, según fuera necesario. A menos que se indique lo contrario, los cultivos fueron incubados a 37 °C.

##### **IV.3.1.2 Transformación de células de *Escherichia coli***

La transformación de células de *E. coli* con plásmidos o mezclas de ligación se realizó por el método químico en presencia de CaCl<sub>2</sub> [Sambrook, *et al.*, 1989] con las modificaciones que se detallan a continuación. A partir de un cultivo bacteriano saturado (crecido durante la noche, ON) se realizó una dilución 1/100 en medio LB fresco y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO<sup>600nm</sup> ~ 0,5 (aproximadamente 2 horas, en fase exponencial de crecimiento). Por cada evento de transformación, se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo y se la centrifugó durante 5 min a 2.500 x *g* a 4 °C. Como control negativo de la transformación, se tomó siempre una alícuota extra de cultivo pero en los pasos posteriores se le agregó 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (agua destilada) estéril en lugar de ADN. Una vez descartado el sobrenadante, las células se lavaron con 500 µl de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> frío y estéril, y se centrifugaron nuevamente. Se volvió a descartar el sobrenadante y las células se pusieron en suspensión utilizando 100 µl de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> frío y estéril.

Posteriormente se añadió el ADN plasmídico (aproximadamente 20 ng) o la mezcla de ligación completa (contenidos en un volumen no mayor a 10 µl) y las células se incubaron en hielo durante 30 min en el caso del plásmido o 60 min en el caso de la mezcla de ligación. Luego, se las sometió a un choque térmico, el cual consistió en una incubación durante 90 s a 42 °C e inmediatamente se las colocó en hielo. Se agregó medio líquido LB con 1% p/v glucosa y se incubaron las células a 37 °C durante 40 min. Finalmente, se sembraron en medio sólido LB suplementado con el antibiótico apropiado.

### **IV.3.2 *Saccharomyces cerevisiae***

#### **IV.3.2.1 Medios de cultivo para levadura *Saccharomyces cerevisiae***

Para el cultivo de *S. cerevisiae hem1Δ* se empleó medio de cultivo rico (YPD), que contiene: 1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona de carne y 2% (p/v) glucosa como fuente de carbono.

Para la selección y mantenimiento de células de *S. cerevisiae hem1Δ* transformadas con los plásmidos pRS426M25, pRS426M25.TcHTE-HIS o pRS426M25.TcHTE-HIS-GFP se utilizó medio de cultivo sintético SCDO (del inglés *Sinthetic Complete and Drop Out*), que contiene: 1,7 g/l YNB (del inglés *Yeast Nitrogen Base*), 5 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,1 g/l mezcla de 21 aminoácidos (*Drop Out mix*: 2,5 g adenina; 1,2 g arginina HCl; 6 g aspártico; 6 g glutámico, 1,8 g lisina HCl; 3 g fenilalanina; 22,5 g serina; 12 g treonina, 1,8 g tirosina y 9 g valina). Dependiendo de las características de la cepa a seleccionar, se agregó: 20 mg/l triptofano; 20 mg/l histidina; 100 mg/l leucina; 20 mg/l metionina y/o 20 mg/l uracilo. Como fuente de carbono se utilizó: 2% (p/v) glucosa (SCDO Glu) o 3% (v/v) glicerol con 3% (v/v) etanol (SCDO Gly/EtOH).

En los medios selectivos se omitió el agregado de leucina y uracilo, para seleccionar a la cepa *hem1Δ* y al plásmido, respectivamente. Tanto el medio YPD como el SCDO en su versión sólida contienen agar-agar al 1,5% (p/v). Ambos medios fueron suplementados con 250 µM δ-ALA, o hemina en concentración necesaria según el ensayo.

La concentración normal de metionina utilizada en el medio de cultivo fue de 20 mg/ml que permite un crecimiento óptimo. En algunos casos se utilizaron

concentraciones menores de esta para favorecer la expresión de los genes cuya expresión es controlada por el promotor *MET25* del vector pRS426M25 [Mumberg, *et al.*, 1994].

### **IV.3.2.2 Transformación de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae***

Las células de *S. cerevisiae* fueron sometidas a transformación por el método químico en presencia de Acetato de Litio (LiAc) [Gietz y Woods, 2002]. Las levaduras se crecieron a 30 °C con agitación en medio rico YPD durante toda la noche. Luego, se hizo una dilución de 3 ml del cultivo ON saturado en 30 ml de medio líquido YPD (dilución 1/10) tal que la  $DO^{600nm}$  sea aproximadamente 1 y se incubó durante 4 - 5 h en agitación hasta alcanzar una  $DO^{600nm} \sim 4$ . El cultivo se centrifugó a 2.500 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y las células se pusieron en suspensión utilizando 5 ml de solución de LiAc (10 mM Tris:HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8 y 0,1 M LiAc). Se repitió la centrifugación, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron utilizando la solución de LiAc residual. Por cada evento de transformación a realizar se agregó a un tubo eppendorf 3 µl de ADN plasmídico (20 ng/µl), 60 µl de suspensión de células de levadura y 10 µl de ADN simple hebra *carrier* (ADN de esperma de salmón Sigma-Aldrich 10 mg/ml previamente hervido por 10 min y mantenido en hielo hasta su uso). Luego se añadió 0,45 ml de solución de 40% (p/v) PEG (10 mM Tris:HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8, 0,1 M LiAc y 40% (p/v) PEG 3500) y se incubaron las células a 30 °C por 40 min. Como control negativo de la transformación, se tomó siempre una alícuota extra de cultivo que se procesó igual que al resto, pero se agregó 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril en lugar del ADN. A continuación, se sometió a las células a un choque térmico durante 15 min a 42 °C y luego fueron dejadas a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 2.500 x *g* durante 5 min, y se pusieron en suspensión utilizando 200 µl de YPD. Por último, las células se sembraron en el medio sólido selectivo correspondiente y se incubaron a 30 °C por 2 - 3 días.

### IV.3.3 Células Vero y HEK293-T

#### IV.3.3.1 Medios de cultivo para células Vero y HEK293-T

Para el cultivo de células Vero y HEK293-T se utilizó el medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM<sup>R</sup>, de Gibco) suplementado con 0,15% (p/v) NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (DMEM-10% SFB).

#### IV.3.3.2 Técnicas de cultivo de células Vero y HEK293-T

Para los mantenimientos de rutina se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie con un volumen de 5 ml de medio, realizando pasajes dos veces por semana. Las células fueron crecidas en medio DMEM-10% SFB a 37 °C en atmosfera húmeda conteniendo 5% CO<sub>2</sub>. Para el pasaje, las células se disgregaron incubándolas con solución de Tripsina-EDTA (0,05% (p/v) Tripsina, 1,25 mM EDTA en PBS – *Phosphate Buffered Saline*, solución que contiene 137 mM NaCl, 4,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 2,7 mM KCl) a 37 °C durante 4 min y sembrando unas 8 a 16 x 10<sup>3</sup> células por cm<sup>2</sup>.

#### IV.3.3.3 Transfección de células HEK293-T

Para la transfección de las células HEK293-T se utilizaron 2 protocolos distintos. Para la verificación de la localización celular de la proteína TcHTE-HIS-GFP se utilizó el protocolo de transfección química, mientras que para los ensayos de microscopía TIRF se utilizó la transfección con Lipofectamina<sup>R</sup> 2000.

##### IV.3.3.3.1 Transfección química

Se sembraron 8 x 10<sup>3</sup> células por cm<sup>2</sup> en placas de 35 mm de diámetro por 24 h en un volumen de 1,5 ml de DMEM-10% SFB a 37 °C en atmosfera húmeda conteniendo 5% CO<sub>2</sub>. Se preparó la mezcla de transfección que consiste en pasar una mezcla de 65 µl de solución amortiguadora TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 7,9, 1 mM EDTA pH 8) + 7 µl 2,5 M Cl<sub>2</sub>Ca + 2 µg de ADN plasmídico, gota a gota sobre una solución conteniendo 67 µl de solución amortiguadora HBS 2X (50 mM HEPES pH 7, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 280 mM NaCl, pH

7,12). Dicha mezcla de transfección se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Luego se renovó el medio de cultivo de las células y se agregó la totalidad de la mezcla de transfección, gota a gota sobre la placa de cultivo. Se mezcló por agitación suave y se procedió a incubar las células por 24-48 h a 37 °C en atmosfera húmeda conteniendo 5% CO<sub>2</sub>, período suficiente para observar células transfectantes.

#### **IV.3.3.2 Transfección con lipofectamina**

Para las transfecciones con lipofectamina 2000 (Invitrogen<sup>R</sup>, Inc.) se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se cultivaron células HEK293-T en placas de 35 mm con cubreobjetos, hasta alcanzar 70-90% confluencia. Se preparó la mezcla de transfección que consiste en 10 µl de lipofectamina en 120 µl de medio Opti-MEM<sup>R</sup>, agregados sobre un tubo conteniendo 3 µg de ADN plasmídico con 145 µl de medio Opti-MEM<sup>R</sup>. Se incubó la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente, y se procedió al agregado de la misma gota a gota sobre las células. Se mezcló por agitación suave y se incubaron las células por 24 h a 37 °C, en atmosfera húmeda conteniendo 5% CO<sub>2</sub>, período suficiente para observar células transfectantes.

#### **IV.3.4 *Trypanosoma cruzi***

##### **IV.3.4.1 Cultivo de *Trypanosoma cruzi***

Los epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c fueron mantenidos en fase exponencial de crecimiento (5 a 40 x 10<sup>6</sup> parásitos/ml) por pasajes sucesivos cada 3 - 5 días en medio indefinido *Liver Infusion Tryptose* (LIT – 0,4% (p/v) NaCl, 0,04% (p/v) KCl, 0,8% (p/v) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% (p/v) Triptosa, 0,5% (p/v) infusión de hígado y 0,8% (p/v) glucosa) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (LIT-10% SFB) y 5 µM hemina a 28 °C. Para los mantenimientos de rutina se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie con volúmenes de 2 a 5 ml de medio.

Para el mantenimiento de epimastigotes transfectantes, se suplementó el medio con 200 µg/ml higromicina B (Hyg) para la selección de los vectores derivados de pTcINDEX-GW o 250 µg/ml de geneticina (G418) para la selección del vector pLEW-13.

Los tripomastigotes metacíclicos se obtuvieron por diferenciación espontánea de epimastigotes Dm28c en cultivos en fase estacionaria de crecimiento en medio LIT-10% SFB suplementado con 5  $\mu$ M hemina a 28 °C.

Para realizar las infecciones con *T. cruzi* se utilizaron células Vero mantenidas en medio DMEM suplementado con 0,15% (p/v) NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml estreptomycin y 2% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (DMEM-2% SFB) a 37 °C en atmosfera húmeda conteniendo 5% CO<sub>2</sub>. Amastigotes y tripomastigotes derivados de células se obtuvieron después de infectar una monocapa de células Vero con tripomastigotes (metacíclicos o derivados de células). Se utilizó un período de infección de 4 h, posterior al cual, los tripomastigotes que no fueron internalizados, fueron removidos por lavado de las células con PBS. Después de dos rondas de infección, los tripomastigotes derivados de células fueron usados para los ensayos de transporte, y la obtención de extractos proteicos totales y de ARNm. Los amastigotes para la preparación de extractos proteicos totales o la obtención de ARNm fueron obtenidos a partir de las células Vero 48 - 72 h post-infección. La pureza de todos los estadios se evaluó por microscopía óptica. Para el mantenimiento del ciclo infectivo de *T. cruzi*, se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie con un volumen de 5 ml de DMEM-2% SFB donde se sembraron unas 8 a 24 x 10<sup>3</sup> células Vero por cm<sup>2</sup> con 1 ml de cultivo de tripomastigotes provenientes de una infección anterior.

Debido a que las células Vero no son resistentes a higromicina B y geneticina, los parásitos transfectantes en los estadios de amastigotes y tripomastigotes se mantuvieron sin el agregado del antibiótico de selección. Periódicamente se comprobó que los parásitos mantenían la capacidad de expresar el gen introducido en el vector, por microscopía confocal de fluorescencia o por ensayos de Western blot.

#### **IV.3.4.2 Recuento de parásitos**

Para el recuento de parásitos, se preparó una dilución de los mismos (generalmente 20  $\mu$ l en un volumen final de 200  $\mu$ l) en 3,7% (p/v) formaldehido en PBS para fijar los parásitos, y posteriormente se contaron en cámara de Neubauer (Boeco<sup>R</sup>) de 1/10 mm de espesor. Se calculó el número de parásitos por ml en función de la dilución realizada, la cantidad de cuadrantes contados y el espesor de la cámara utilizada.

### IV.3.4.3 Transfección de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c conteniendo el plásmido pLEW13 [Taylor y Kelly, 2006] disponibles en el laboratorio, se crecieron en LIT-10% SFB suplementado con 5  $\mu\text{M}$  hemina y 250  $\mu\text{g/ml}$  G418 a 28 °C a una densidad de cultivo de aproximadamente  $3 \times 10^7$  células/ml. Las células se colectaron por centrifugación a  $2000 \times g$  por 5 min, se lavaron 2 veces con PBS, se suspendieron a una densidad celular de  $1 \times 10^8$  células en 0,4 ml de solución de electroporación (PBS junto a 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) y luego las células se transfirieron a una cubeta de 0,2 cm de paso. La solución de transfección fue preparado con 15 - 30  $\mu\text{g}$  total de ADN plasmídico en 40  $\mu\text{l}$  de PBS 10X, 4  $\mu\text{l}$  de 50 mM  $\text{MgCl}_2$  y 4  $\mu\text{l}$  de 10 mM  $\text{CaCl}_2$  y completado con  $\text{H}_2\text{O}_d$  hasta un volumen de 400  $\mu\text{l}$ . Una muestra de epimastigotes se resuspendió con solución de transfección sin ADN, como control negativo. La mezcla se colocó en hielo por 15 min y luego se le aplicó un pulso de 450 V y 500  $\mu\text{F}$  usando un electroporador GenePulser II<sup>R</sup> (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.). Luego, las células se transfirieron a botellas de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  de superficie con 3 ml de LIT-10% SFB suplementado con 5  $\mu\text{M}$  hemina y 250  $\mu\text{g/ml}$  G418, y se incubaron a 28 °C. A las 48 h, se agregó higromicina B (Hyg) a una concentración inicial de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Luego de 72 – 96 h, los cultivos se mantuvieron por diluciones periódicas y se llevó gradualmente a una concentración final de 200  $\mu\text{g/ml}$  higromicina B. Se obtuvieron líneas estables después de 30 – 45 días de la transfección, cuando las mismas recuperaron la velocidad normal de crecimiento (tiempo de duplicación de 30 – 36 h) y el control negativo dejó de crecer.

## IV.4 Estudios de transporte de hemo

### IV.4.1 Preparación de hemina y análogos de hemo

La solución *stock* de hemina (sal de cloruro de hierro(III) protoporfirina IX, forma comercial) se preparó a partir de droga sólida (Frontier Scientific<sup>R</sup>) disolviendo la misma en una mezcla 50% (v/v) etanol con 0,01 N NaOH a una concentración final de 1 mM. Se esterilizó por filtración en filtros de membrana con tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . La concentración de hemina real se determinó espectrofotométricamente ( $\epsilon_{385\text{nm}} = 58400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La solución de hemina se fraccionó y almacenó a -80 °C hasta su utilización.

Las soluciones *stock* de los análogos de hemo (AHs) - Zn(II) mesoporfirina IX (ZnMP), Zn(II) protoporfirina IX (ZnPP), Sn(IV) mesoporfirina IX (SnMP) y Ga(III) protoporfirina IX (GaPP)- se prepararon a una concentración de 10 - 20 mM en DMSO y se conservaron a -80 °C hasta su uso. Para su utilización en los ensayos, previamente se diluyeron en 0,01 N NaOH alcanzando una concentración final de 1 mM.

El GaPP fue donado por el Dr. Iqbal Hamza (Universidad de Maryland, EE.UU.). El ZnPP, ZnMP y SnMP fueron adquiridos en Frontier Scientific<sup>R</sup> (Logan, UT, EE.UU.).

## **IV.4.2 Ensayos en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

### **IV.4.2.1 Efectos de la disponibilidad de hemo sobre el perfil de crecimiento**

Para estudiar la dependencia del crecimiento de los epimastigotes con el hemo, se monitorearon cultivos de epimastigotes a una dilución inicial de  $5 - 10 \times 10^6$  parásitos/ml en un volumen de 1,5 ml de LIT-10% SFB suplementado con distintas concentraciones de hemina en una microplaca de 24 pocillos (1,9 cm<sup>2</sup> de superficie por pocillo). Se ensayaron distintas concentraciones de hemina: 0, 5, 20, y 50 μM. Previo a los ensayos, los parásitos fueron mantenidos durante al menos los 3 días en medio LIT-10% SFB con 5 μM hemina (generando una condición estándar o repleta de hemo) o en medio LIT-10% SFB sin agregado de hemina (generando una condición de hambreado de hemo), según se indica en cada caso.

Se realizaron dos tipos de curvas de crecimiento. En una de ellas (curva continua), una vez inoculado el medio de cultivo con los parásitos, no se modificaron las condiciones de cultivo, dejando que el mismo alcance el estadio estacionario. En el otro tipo de curva (curva con dilución periódica), los parásitos fueron mantenidos en fase exponencial de crecimiento realizando diluciones al medio cada dos días manteniendo el volumen final constante. En ambos casos, el crecimiento de los parásitos se monitoreó tomando muestras periódicamente y contando la cantidad de parásitos en cámaras de Neubauer.

#### IV.4.2.2 Cuantificación de hemo (hemo B) intracelular

La técnica desarrollada por Berry [Berry y Trumpower, 1987] permite la cuantificación de hemos (A, B y C) espectroscópicamente mediante las medidas de absorción características de complejos (hemocromos) que se forman entre los distintos hemos (A, B y C) y la piridina. La concentración de los hemocromos se calcula a partir de la absorbancia a una longitud de onda dada del espectro diferencial del hemocromo, reducido (con ditionito de sodio,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) menos oxidado (con  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Para el hemo B se calcula a partir del valor de absorbancia a 557 nm del espectro diferencial donde el coeficiente de extinción molar es  $\epsilon=23,98 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

En nuestro caso, esta técnica se utilizó para cuantificar el contenido de hemo B total en epimastigotes. Prácticamente,  $150 \times 10^6$  epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento fueron colectados, lavados 2 veces con PBS y directamente procesados o congelados a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización. Los epimastigotes se resuspendieron en 300  $\mu\text{l}$  de PBS y se combinaron con 300  $\mu\text{l}$  de una solución que contiene 0,2 N NaOH y 40% (v/v) piridina. La mezcla se agitó vigorosamente mediante *vortex*, se centrifugó a  $16.000 \times g$  durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a una cubeta de cuarzo de 1 ml. Se registró el espectro de absorbancia (espectro oxidado) entre 450 nm y 700 nm; y luego se registró el espectro reducido mediante el agregado de unos granos de ditionito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Se realizaron al menos dos agregados de ditionito hasta tener dos espectros constantes, es decir, verificándose que la reducción se hubiera completado. La concentración de hemo se determinó utilizando el máximo de absorción a 557 nm a partir del espectro diferencial y el  $\epsilon=23,98 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . El límite de detección del método corresponde a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  hemo; esta concentración corresponde a 0,4 nmoles hemo cada  $10^9$  parásitos cuando se usan de  $50 \times 10^6$  parásitos procesados en un volumen final de 1 ml.

### **IV.4.3 Utilización de análogos de hemo en el estudio del transporte**

#### **IV.4.3.1 Ensayos en células Vero**

##### **IV.4.3.1.1 Ensayos de viabilidad de las células Vero frente a los diferentes análogos de hemo**

Se cultivaron las células Vero en microplacas de 96 pocillos a dos concentraciones:  $12,5 \times 10^3$  y  $31,25 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio DMEM-2% de SFB. Luego de 24 h de crecimiento se agregaron los AHs a concentraciones de 5, 20, 50 y 100  $\mu$ M y se incubaron las células a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se adicionaron 200  $\mu$ l de una solución de trabajo de bromuro difeniltetrazolium dimetiliazol (MTT) (stock 5 mg/ml, solución de trabajo: 180  $\mu$ l DMEM + 20  $\mu$ l de stock MTT por pocillo) y se procedió a incubar las células por 1 h a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este período, se retiró el sobrenadante y se disolvió el producto formado (sales de formazán) con DMSO (100  $\mu$ l) para luego medir la densidad óptica en un lector de placa a una longitud de onda de 540 nm. Cada experimento fue realizado por triplicado y se utilizó 0,1% DMSO en DMEM-2% SFB como control negativo de toxicidad el cual fue referenciado como 100% de viabilidad.

##### **IV.4.3.1.2 Ensayo de transporte de análogos de hemo en células Vero**

Para el corroborar la incorporación de los análogos de hemo en células Vero, se procedió a cultivar las mismas en placas de 24 pocillos con cubreobjetos por 24 h en DMEM-10% SFB a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar un 80% de confluencia. Una vez adheridas las células, se procedió a incubarlas con los AHs a una concentración de 100  $\mu$ M en el volumen final de 200  $\mu$ l en DMEM-2% SFB, por 30 min. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS, y procesadas para ser observadas en microscopía confocal de fluorescencia.

#### **IV.4.3.2 Ensayos de transporte de análogos de hemo en tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Para estudiar el transporte de análogos de hemo en tripomastigotes de *T. cruzi*, se procedió de la siguiente manera. Tripomastigotes de la cepa Dm28c provenientes de cultivos celulares infectados se colectaron por centrifugación a  $3.000 \times g$  por 5 min, se lavaron dos veces con PBS y se suspendieron a  $20 \times 10^6$  células cada 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Luego, se agregó igual volumen de los diferentes análogos a una concentración inicial de 200  $\mu\text{M}$  en PBS (quedando a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en el volumen final de 200  $\mu\text{l}$ ). Las células se incubaron de 0 a 5 min a 28 °C y luego la incorporación de los AHs se detuvo con el agregado de 800  $\mu\text{l}$  de una solución fría de 0,5 mM hemina en PBS. La incubación a tiempo 0 se considera al momento del agregado simultáneo de la solución de AHs y la solución de hemina concentrada fría. Luego las muestras se mantuvieron en baño de agua-hielo durante todo el proceso de lavado. Las células se lavaron 3 veces mediante centrifugación por 5 min a 4 °C a  $4.000 \times g$  y su posterior suspensión en 200  $\mu\text{l}$  de PBS frío. Finalmente, las muestras fueron fijadas con 3,7% (p/v) formaldehído en PBS por 5 min y luego procesadas para ser observadas en microscopía confocal de fluorescencia.

#### **IV.4.3.3 Ensayos de transporte de análogos de hemo en amastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Para estudiar el transporte de análogos de hemo en amastigotes, se procedió a cultivar células Vero en placas de cultivo de 24 pocillos con cubreobjetos hasta un 50% de confluencia. Una vez adheridas las células, se procedió a su incubación con tripomastigotes de la cepa Dm28c con una MOI (del inglés *Multiplicity of Infection*) de 40. Cuatro horas post infección, las células fueron lavadas con PBS para retirar los tripomastigotes que no fueron internalizados. Posteriormente las células fueron incubadas con DMEM-2% SFB, por 48 h en incubador a 37 °C en atmosfera húmeda conteniendo 5%  $\text{CO}_2$ . Una vez que los amastigotes fueron visibles bajo microscopía óptica, se procedió a incubar las células infectadas con los AHs a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en DMEM-2% SFB, en el volumen final de 200  $\mu\text{l}$ , por 30 min. Posteriormente las células

fueron lavadas con PBS, y procesadas para ser observadas en microscopía confocal de fluorescencia.

## **IV.5 Manipulación de ácidos nucleicos**

### **IV.5.1 Plásmidos**

En la siguiente tabla1 se detallan los plásmidos utilizados en este trabajo de Tesis:

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este trabajo de Tesis

Vectores	Características
pET-32a	Este vector permite el donado de las secuencias de interés como fusión a la secuencia Trx-Tag <sup>TM</sup> , así como a una secuencia de 6 histidinas y la secuencia S-Tag. Esto facilita la posterior purificación de la proteína recombinante al someter un extracto celular total a una cromatografía de afinidad. Amp <sup>R</sup> .
pET-32a.P17cHTE	Se utilizó para expresar los péptidos P17cHTE como fusión a TRX en <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS'. Fragmento donado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I. Amp <sup>R</sup> .
pTcGFPN [Batista, <i>et al.</i> , 2010]	Secuencia sintética que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, <i>Green Fluorescent Protein</i> ) sin los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción internos. Resistencia a geneticina para la selección en <i>T. cruzi</i> . Clm <sup>R</sup> y Amp <sup>R</sup> .
pENTR3C de la serie Gateway <sup>R</sup> pENTR <sup>TM</sup> Vectors (Invitrogen)	Contiene secuencias de terminación de la transcripción <i>rrnB</i> que previenen la expresión basal del inserto de interés en <i>E. coli</i> y los sitios <i>attL1</i> y <i>attL2</i> para la recombinación sitio específica del vector de entrada con un vector de destino GateWay. Además, posee la secuencia consenso Kozak y un sitio de unión a ribosomas para una iniciación de la traducción eficiente en sistemas eucariotas y procariotas, respectivamente. Contiene el gen <i>cadB</i> localizado entre los dos sitios <i>attL</i> para la selección negativa y el gen de resistencia a kanamicina para la selección en <i>E. coli</i> . Tiene

---

	un origen de replicación pUC de alto número de copias.
pENTR3C.TcHTE-HIS.noStop (construidos en este trabajo)	Contiene el gen <i>TcHTE</i> de <i>T. cruzi</i> , como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas, pero sin codón de terminación, clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I. Kan <sup>R</sup> .
pENTR3C.TcHTE-HIS-GFP (construido en este trabajo)	Contiene el gen de <i>TcHTE</i> de <i>T. cruzi</i> como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas y a una secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, <i>Green Fluorescent Protein</i> ), clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Xba</i> I. Kan <sup>R</sup> .
pENTR3C.TcHTE-HIS (construido en el trabajo de Tesina de grado de J. Hernández, [Hernández, 2013])	Contiene el gen <i>TcHTE</i> de <i>T. cruzi</i> como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas, clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I. Kan <sup>R</sup> .

---

pRS426M25 [Buchensky, <i>et al.</i> , 2010]	Plásmido derivado del vector de expresión en levaduras pRS426 [Mumberg, <i>et al.</i> , 1994] y puede replicarse tanto en <i>S. cerevisiae</i> , donde la selección es por reversión de la auxotrofia para uracilo (marcador de selección <i>URA3</i> ), como en <i>E. coli</i> (selección por resistencia a ampicilina). Además, posee un casete de expresión constituido por el promotor regulable del gen <i>MET25</i> , un sitio de múltiple clonado (SMC) y la secuencia terminadora del gen <i>CYC1</i> (citocromo <i>c1</i> ).
pRS426M25.TcHTE-HIS (construido en el trabajo de Tesina de grado de J. Hernández, [Hernández, 2013])	Contiene el gen de <i>TcHTE</i> de <i>T. cruzi</i> como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I. Amp <sup>R</sup> .
pRS426M25.TcHTE-HIS-GFP (construido en este trabajo)	Contiene el gen de <i>TcHTE</i> de <i>T. cruzi</i> como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas y a una secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, <i>Green Fluorescent Protein</i> ). Fragmento clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Xba</i> I. Amp <sup>R</sup> .
pRS426M25.CeHRG4	Contiene la secuencia del gen CeHRG4 de <i>Caenorhabditis</i>

elegans. Amp<sup>R</sup>

pLEW13 [Taylor y Kelly, 2006]	Posee el gen de la <i>ARN polimerasa T7</i> , el gen <i>tetR</i> que reprime la expresión del promotor del vector pTcINDEX en ausencia de tetraciclina y el gen <i>neo</i> para la selección por geneticina (G418). El vector se mantiene episomalmente.
pTcINDEX-GW [Alonso, <i>et al.</i> , 2014]	Plásmido derivado del vector pTcINDEX [Taylor y Kelly, 2006] integrativo en las zonas espaciadoras entre los genes ARN ribosomales del genoma de <i>T. cruzi</i> , zonas transcripcionalmente silentes. Posee el casete GateWay para su recombinación con la enzima LR Clonasa con otros vectores que posean dicho casete. Posee el gen higromicina B fosfotransferasa ( <i>hyg</i> ) bajo el promotor T7 de expresión constitutiva. Con el agregado de higromicina se selecciona indirectamente al plásmido pLEW13 debido a que es necesario la ARN polimerasa T7 de este para transcribir la resistencia a esta droga. La secuencia clonada en el SMC queda bajo el control del promotor T7 que posee un operador <i>TetO</i> corriente arriba que lo hace reprimible en ausencia de tetraciclina. Flanqueando el SMC posee secuencias intergénicas de actina de <i>T. cruzi</i> para proveer sitios de poliadenilación, sitio aceptor del <i>transsplicing</i> de la proteína ribosomal P2β y terminador de la ARN polimerasa de T7. Amp <sup>R</sup> .
pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP (construidos en este trabajo)	Contiene el gen de <i>TcHTE</i> de <i>T. cruzi</i> como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas y a una secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, <i>Green Fluorescent Protein</i> ). Hyg <sup>R</sup> . Amp <sup>R</sup> .
pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS (construido en este trabajo)	Contiene los genes de <i>TcHTE</i> de <i>T. cruzi</i> como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas. Hyg <sup>R</sup> . Amp <sup>R</sup> .
pcDNA3.1	Este vector está diseñado para una expresión constitutiva de alto nivel en diversas líneas de células de mamíferos. Contiene un sitio de clonación múltiple, y marcador de selección por

---

geneticina. Amp<sup>R</sup>.

pcDNA3.1.TcHTE-HIS-GFP (construido en este trabajo) Contiene el gen de TcHTE de *T. cruzi* como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas y a una secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*). Amp<sup>R</sup>.

---

## IV.5.2 Oligonucleótidos

En la tabla 2 se detallan los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de Tesis:

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo de Tesis. Subrayados los sitios de reconocimientos para endonucleasas de restricción.

Inserto amplificado	Oligonucleótidos	Secuencias 5'-3'
TcHTE-HIS	FP_TcHTE	GCGGATCCATGCTATTTTCAGAAAAGAAGTG Posee el sitio de restricción para <i>Bam</i> HI
	RP_TcHTE-HIS	CCGCTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGACC-CATAATATCTGCGTTCTTTTCG Posee el sitio de restricción para <i>Xho</i> I
HIS.noStop	RP_HIS.noStop	CGCCTCGAGACCATGGTGATGGTGATGATG Posee el sitio de restricción para <i>Xho</i> I
GFP	FP_GFP	TACCTCGAGATGAGCAAGGGCGAGGAGCTG Posee el sitio de restricción para <i>Xho</i> I
	RP_GFP	CCTCTAGATATCGAATTCTTCACGACTTGTACAGCTCGTCC Posee los sitios de restricción para <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV y <i>Xba</i> I
P1TcHTE	FP_P1TcHTE	TCCGGATCCATGATGGCCGCAAAGTGGTG Posee el sitio de restricción para <i>Bam</i> HI
Insertos en el vector	Ext-attI1	TAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGC

pENTR3C	Ext-attI2	CAGAGCTGCAGCTGGATGGC
		Utilizados para secuenciación en pENTR3C
Insertos en el vector pTcINDEX-GW	attI1	CAACTTTGTACAAAAAGCAGGC
	attI2	GTACAAGAAAGCTGGGTCTAG
		Utilizados para secuenciación en pTcINDEX-GW
Insertos en el vector pTcINDEX-GW	FP_HX1	CTTTTCCAATTCTTTTATGATG
	RP_lg.Act	CAAGGACAGAAAACGGTAAG
		Utilizados para secuenciación en pTcINDEX-GW
TcHTE	FP-qPCR-TcHTE	TAATTATTGGGCGGCGGCT
	RP-qPCR-TcHTE	GAAGTACGAACTCCCCGTCC
GAPDH	FP-qPCR-GAPDH	GTGGCAGCACCGGTAACG
	RP-qPCR-GAPDH	CAGGTCTTTCTTTTGCGAATAGG

### IV.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

#### IV.5.3.1 Amplificación de la secuencia codificante TcHTE

Las reacciones de PCR para amplificación de la secuencia codificante de TcHTE se llevaron a cabo en un volumen total de 50  $\mu$ l conteniendo aproximadamente 50 ng de ADN, los cebadores FP\_TcHTE, RP\_TcHTE-HIS (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos) en concentraciones 0,3  $\mu$ M cada uno; 0,3 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 mM de MgSO<sub>4</sub> y 2,5 U de Pfx platinum ADN Polimerasa (Invitrogen<sup>R</sup>) con su correspondiente solución amortiguadora. Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 90 s a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 30 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 53 °C
- 4- Elongación: 90 s a 68 °C

5- Elongación final: 10 min a 68 °C

Los sitios *Bam*HI y *Xho*I introducidos con los cebadores empleados se utilizaron para el posterior clonado del inserto amplificado en el vector correspondiente.

#### **IV.5.3.2 Amplificación de la secuencia codificante *Tc*HTE-HIS.noStop**

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como molde el plásmido pENTR3C.*Tc*HTE-HIS. El mismo se genera al subclonar la secuencia *Tc*HTE-HIS en el vector pENTR3C, entre los sitios *Bam*HI y *Xho*I. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl conteniendo aproximadamente 50 ng de ADN plasmídico, los cebadores FP\_*Tc*HTE y RP\_HIS.noStop (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos) en concentraciones 0,3 µM cada uno; 0,3 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 mM de MgSO<sub>4</sub> y 1 U de *Pfx* platinum ADN Polimerasa (Invitrogen<sup>R</sup>) con su correspondiente solución amortiguadora. Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

1- Desnaturalización inicial: 90 s a 94 °C

2- Desnaturalización: 15 s a 94 °C

3- Anillado: 30 s a 53 °C

4- Elongación: 90 s a 68 °C

5- Elongación final: 10 min a 68 °C

El cebador reverso utilizado hibrida sobre la secuencia de 6 histidinas y agrega el sitio *Xho*I a continuación de estas, eliminando el codón de terminación que se encontraba luego de las 6 histidinas. Los sitios *Bam*HI y *Xho*I introducidos con los cebadores empleados se utilizaron para el posterior clonado del inserto amplificado en el vector pENTR3C. La eliminación del codón de terminación en el extremo C-terminal de esta secuencia permitió que la secuencia que se clone luego del sitio *Xho*I de la misma pueda ser traducida como un único polipéptido por la maquinaria traduccional, en este caso se agregó una secuencia codificante de la proteína GFP.

### IV.5.3.3 Amplificación de la secuencia codificante de GFP

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como molde el plásmido pTcGFPN (aproximadamente 10 ng de ADN) en un volumen total de 50 µl conteniendo además los cebadores FP\_GFP y RP\_GFP (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos) en concentraciones 0,3 µM cada uno; 0,3 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 mM de MgSO<sub>4</sub> y 1 U de *Pfx* platinum ADN Polimerasa (Invitrogen<sup>R</sup>) con su correspondiente solución amortiguadora. Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 2 min a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 25 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 58 °C
4. Elongación: 90 s a 68 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 68 °C

Los sitios *XhoI* y *XbaI* introducidos con los cebadores se utilizaron para el posterior clonado del inserto amplificado en el vector pENTR3C-*TcHTE-HIS.noStop*. En el extremo 3' de la secuencia *TcHTE-HIS.noStop* se encuentra el sitio *XhoI* y luego un sitio *XbaI*, que pertenece a la secuencia del vector. Además de estos sitios, 3' de la secuencia de la GFP se agregaron los sitios *EcoRV* y *EcoRI* codificados en el cebador reverso (entre el codón de terminación de la secuencia de la GFP y el sitio *XbaI*). Los sitios *XbaI* y *EcoRI* (junto al sitio *BamHI*) permitieron el posterior clonado de la secuencia resultante (*TcHTE-HIS-GFP*) en el vector pENTR3C y en el vector pRS426M25, respectivamente. En el caso del pTcINDEX-GW se clonó entre utilizando el sistema que utiliza recombinación con la enzima LR Clonasa (Invitrogen<sup>R</sup>) y el casete GateWay presente en el vector.

### IV.5.3.4 Amplificación de la secuencia codificante de *TcHTE-HIS-GFP*

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como molde el plásmido pENTR3C-*TcHTE-HIS-GFP* (aproximadamente 10 ng de ADN) en un volumen total de 50 µl conteniendo además los cebadores FP\_*TcHTE* y RP\_GFP (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos) en concentraciones 0,3 µM cada uno; 0,3 mM de cada

desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 mM de  $MgSO_4$  y 1 U de *Pfx* platinum ADN Polimerasa (Invitrogen<sup>R</sup>) con su correspondiente solución amortiguadora. Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 2 min a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 25 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 58 °C
4. Elongación: 90 s a 68 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 68 °C

#### **IV.5.3.5 Amplificación de la secuencia codificante de P17cHTE**

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como molde el plásmido pENTR3C.7cHTE-HIS. La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50  $\mu$ l conteniendo aproximadamente 50 ng de ADN plasmídico, los cebadores FP\_P17cHTE y RP\_7cHTE-HIS (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos) en concentraciones 0,3  $\mu$ M cada uno; 0,3 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 mM de  $MgSO_4$  y 1 U de *Pfx* platinum ADN Polimerasa (Invitrogen<sup>R</sup>) con su correspondiente solución amortiguadora. Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 90 s a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 15 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 53 °C
- 4- Elongación: 60 s a 68 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 68 °C

#### **IV.5.3.6 PCR de colonias**

La técnica PCR de colonias se utilizó para verificar la presencia del inserto de interés en las células obtenidas luego de una transformación con una mezcla de ligación. Para ello se eligieron al azar diferentes colonias presentes en las placas de las

transformaciones, las cuales fueron recogidas con palillos estériles y colocadas en micro-tubos individuales conteniendo 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_d$  estéril. Con el mismo palillo se hizo inmediatamente una réplica en una nueva placa con LB-agar y el antibiótico de selección apropiado. Las muestras fueron hervidas por 15 min y 5  $\mu\text{l}$  de éstas se usaron como molde en una reacción de PCR. Los cebadores fueron utilizados en una concentración 0,5  $\mu\text{M}$  cada uno. Además se utilizó: 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 2,5 U de *Taq* ADN Polimerasa con su correspondiente solución amortiguadora, en un volumen final de reacción de 25  $\mu\text{l}$ . Los programas de amplificación fueron los mismos utilizados para amplificar el inserto blanco, excepto por la temperatura de extensión que fue de 72 °C debido a la polimerasa utilizada.

#### IV.5.4 Clonados

Los productos de PCR fueron clonados en diversos vectores. Para ello, tanto los vectores como los productos de PCR fueron tratados con las enzimas de restricción correspondientes. Posteriormente los productos de digestión fueron resueltos mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (p/v). Posteriormente los fragmentos de ADN fueron recuperados a partir del gel, y fueron sometidos a reacción de ligación. El producto de ligación se utilizó para la transformación de células de *E. coli* Dh5 $\alpha$ , que fueron recuperadas mediante su sembrado en placas de medio LB sólido con el antibiótico de selección correspondiente. Posteriormente se procedió a la verificación de la construcción mediante PCR de colonia, o mediante recuperación del ADN plasmídico seguido de digestión con enzimas de restricción y análisis del tamaño de los fragmentos de ADN originado.

Los donados en el vector pTcINDEX-GW [Alonso, *et al.*, 2014] se realizaron mediante la utilización de la enzima LR Clonasa (Invitrogen<sup>R</sup>) la cual produce reacciones de recombinación entre los sitios attI y attR entre los vectores de origen y destino utilizados.

### **IV.5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Las diferentes muestras de ADN (plásmidos, fragmentos de restricción y productos de PCR) fueron resueltas mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% (p/v), utilizando el sistema de tipo submarino [Sambrook, *et al.*, 1989]. La solución de agarosa 1% (p/v) se preparó en solución amortiguadora TAE (40 mM Tris:Acetato, 1 mM EDTA pH 8) y una vez fundida se agregó el colorante GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) diluido 1/10.000 para la posterior visualización de las bandas en el transiluminador de luz azul Safe Imager (Invitrogen<sup>R</sup>). El marcador de masa molecular empleado fue ADN de fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III (Productos Bio-Lógicos). Las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,25% (p/v) azul de bromofenol; 0,25% (p/v) xilencianol y 30% (v/v) glicerol en una relación 5:1. La corrida electroforética se efectuó en solución amortiguadora TAE a un voltaje constante de 75 V.

### **IV.5.6 Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa**

Para la purificación de los fragmentos de ADN a partir de bandas cortadas de geles de agarosa 1% (p/v), se utilizó el *kit* comercial *Wizard SV Gel<sup>R</sup> and PCR clean-up system<sup>R</sup>* (Promega) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante.

### **IV.5.7 Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Para la digestión de los diferentes plásmidos y de los productos de PCR se emplearon las endonucleasas de restricción de Fermentas o Promega. En general, las digestiones se llevaron a cabo durante 2 horas a 37 °C siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

### **IV.5.8 Reacciones de ligación de fragmentos de ADN**

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se realizaron utilizando la enzima T4 ADN Ligasa (Fermentas) siguiendo las indicaciones y utilizando las soluciones amortiguadoras recomendadas por el fabricante. Se trabajó sobre una relación molar inserto:vector 3:1 en un volumen final de 10  $\mu$ l, conteniendo 10-20 ng de ADN en total. El inserto y el vector fueron previamente incubados a 65 °C por 5 min e inmediatamente

colocados en hielo durante 10 min. Las mezclas de ligación, que contienen la enzima, el vector, el inserto y la solución amortiguadora adecuada se incubaron toda la noche (ON) a 4 °C. Para evaluar la posible religación de vector en ausencia de inserto, se realizaron controles incluyendo los mismos componentes de la mezcla de ligación y reemplazando el agregado de inserto por un volumen equivalente de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril (control de religación).

#### **IV.5.9 Purificación de ADN plasmídico a partir de células de *Escherichia coli***

Las purificaciones de ADN plasmídico se realizaron usando el *kit* comercial *Wizard<sup>R</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) según las recomendaciones del fabricante.

#### **IV.5.10 Secuenciación de fragmentos de ADN**

La resolución de las secuencias de ADN fue realizada por el servicio *DNA Sequencing Facility* de la Universidad de Maine, EE.UU., sobre una muestra de ADN plasmídico. Las muestras se enviaron según las condiciones especificadas por dicho establecimiento: 5 µl de ADN a concentración 100 ng/µl y 3 µl de oligonucleótidos correspondientes (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos) a concentración 5 µM. Para la secuenciación de insertos en el vector pENTR3C, se utilizaron los cebadores Ext-attl1 y Ext-attl2 (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos). Para la secuenciación de insertos en el vector pTcINDEX-GW, se utilizaron los cebadores attl-1 y attl-2 o FP\_HX1 y RP\_Ig.Act (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos) según fuera conveniente.

#### **IV.5.11 Cuantificación de ADN**

Para determinar la concentración del ADN purificado en solución acuosa, se realizaron medidas de absorbancia a 260 nm y se empleó la relación 1 Unidad de Absorbancia a 260 nm = 50 ng/µl de ADN doble hebra.

#### **IV.5.12 Purificación de ARNm de *Trypanosoma cruzi***

Para la obtención de ARNm se utilizó Tri-Reagent<sup>R</sup> (Molecular Research Center, INC) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se colectaron las células por centrifugación y se resuspendieron a razón de  $10^8$  células por ml de reactivo. Luego se adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo, agitando vigorosamente por 15 s. Posteriormente se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min previo centrifugación a 12.000 x g por 20 min a 4 °C. El ARN fue recuperado por precipitación con 500  $\mu$ l de isopropanol a partir de la fase acuosa. Luego fue lavado con 75% (v/v) etanol, y resuspendido en H<sub>2</sub>O-DEPC. El ARN fue cuantificado por absorbancia a 260 nm y 2  $\mu$ g del mismo fueron tratados con DNAsa RQ1 y cuantificados nuevamente.

#### **IV.5.13 Reacciones de Retro-transcripción**

Se colocaron 0,5  $\mu$ g de ARN con 0,3  $\mu$ M de los cebadores hexaméricos inespecíficos en un volumen de 11  $\mu$ l, y se incubaron 5 min a 65 °C. Posteriormente se adicionaron 10 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), y 40 U de enzima transcriptasa reversa M-MuLV (Thermo-Scientific) con su correspondiente solución amortiguadora en un volumen final de 20  $\mu$ l. La mezcla se incubó 5 min a 25 °C, seguida de 60 min a 37 °C, y luego 5 min a 70 °C. Posteriormente, los ADN complementarios se guardaron a -80 °C.

#### **IV.5.14 Reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)**

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un equipo StepOne<sup>TM</sup> Instrument de 48 pocillos, en un volumen de 10  $\mu$ l, conteniendo 5  $\mu$ l de TransStart<sup>R</sup> Green qPCR SuperMix (AP Biotech), 0,2  $\mu$ l de cebadores directo y reverso (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos) (20  $\mu$ M), 0,2  $\mu$ l de ROX, y 2  $\mu$ l de una dilución 1/10 de cada muestra.

Utilizando el siguiente programa de ciclado, se realizaron 40 repeticiones de las etapas 2 y 3:

- 1- Desnaturalización inicial: 10 min a 95 °C
- 2- Desnaturalización: 15 s a 95 °C

3- Anillado/Elongación: 60 s a 60 °C

Luego se realizó una curva de desnaturalización

4- Desnaturalización: 15 min a 95 °C

5- Anillado: 1 min a 60 °C

6- Desnaturalización: 15 min a 95 °C

Teniendo como finalidad garantizar que las reacciones de amplificación presentaban condiciones óptimas de eficiencia, sensibilidad y reproducibilidad, y permitir la cuantificación del gen de interés, se realizaron diluciones seriadas de utilizando plásmidos cuantificados en número de copias como testigos tanto del gen de interés como del gen de referencia que fueron amplificados en la misma reacción de amplificación que las muestras. La cuantificación se realizó mediante método de Curva Estándar, permitiendo obtener en cada caso la relación entre el número de copias del gen de interés y el número de copias del gen de referencia (o “*housekeeping*”).

## **IV.6 Manipulación de proteínas**

### **IV.6.1 Obtención de extractos celulares totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Los epimastigotes de *T. cruzi* salvajes o transfectados con las diferentes construcciones, procedentes de los diferentes tratamientos según el experimento realizado, fueron colectados mediante centrifugación a 2.000 x *g* durante 5 min. Luego fueron lavados 2 veces con PBS y resuspendidos en solución de lisis (8 M urea, 20 mM HEPES pH 8) a razón de 1 x 10<sup>6</sup> parásitos/μl. Las muestras se congelaron a -80 °C hasta su utilización. Esta solución de lisis será la utilizada para la obtención de extractos totales de parásitos en todos los casos, a menos que se indique lo contrario.

### **IV.6.2 Obtención de extractos celulares totales de los distintos estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

Los tripomastigotes derivados de células se colectaron por centrifugación a 6.000 x *g* por 10 min, se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en solución de lisis a razón de 1 x 10<sup>6</sup> parásitos/μl (8 M urea, 20 mM HEPES pH 8).

Los amastigotes se obtuvieron de células Vero infectadas mantenidas en DMEM-2% SFB. Luego de 48 h, la monocapa de células se lavó 2 veces con PBS frío y se levantaron con un raspador de células (*cell scraper*) en 5 ml de PBS. Las células se colectaron por centrifugación a 1.500 x *g* por 8 min y se suspendieron en 1 ml de PBS. Las células se disgregaron pasándolas 10 veces por una jeringa de tuberculina (27 G). Los amastigotes se colectaron por centrifugación a 1.500 x *g* por 8 min y luego fueron suspendidas en solución de lisis (8 M urea, 20 mM HEPES pH 8) a razón de  $1 \times 10^6$  parásitos/ $\mu$ l. Los distintos extractos se fraccionaron y congelaron a -80 °C hasta su utilización.

### IV.6.3 Obtención de extractos celulares totales de células Vero

Las células Vero fueron crecidas en medio DMEM-10% SFB a 37 °C en atmosfera húmeda conteniendo 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se disgregaron incubándolas con solución de tripsina-EDTA (0,05% (p/v) tripsina, 1,25 mM EDTA en PBS – *Phosphate Buffered Saline*, solución que contiene 137 mM NaCl, 4,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 2,7 mM KCl) a 37 °C durante 4 min. Luego fueron lavadas con PBS y luego fueron suspendidas en solución de lisis (8 M urea, 20 mM HEPES pH 8) a razón de  $1 \times 10^6$  células/ $\mu$ l. Los distintos extractos se fraccionaron y congelaron a -80 °C hasta su utilización.

### IV.6.4 Obtención de P17cHTE

La obtención de P17cHTE se realizó a partir de su expresión en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS' portadoras del vector pET32a.P17cHTE. Brevemente, las células fueron crecidas a 37 °C en medio LB con agitación. Cuando se alcanzó una OD ~ 0,6 se adicionó IPTG a una concentración final de 0,6 mM y se incubó a 24 °C durante la noche. Luego la células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 0,1  $\mu$ g/ml DNAsa) y se congelaron a -20 °C. Posteriormente las células fueron sometidas a 8 pulsos de sonicado de 45 seg en hielo. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 26.000 x *g* por 20 min a 4 °C, el cual fue incubado durante la noche con resina Ni-NTA previamente equilibrada con solución (50 mM Tris-HC pH 8, 300mM NaCl, 10 mM Imidazol), a 4 °C en agitación. Posteriormente la resina fue lavada 6 veces con solución de lavado (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 20

mM Imidazol). Seguidamente la proteína de fusión TRX-6HIS-STag-P1TcHTE-HIS fue eluída con la solución de elución (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol). Se colectaron 10 fracciones de 1 ml cada una, que fueron guardadas a -20 °C hasta su utilización.

#### **IV.6.5 Electro-elución de proteínas**

Para recuperar las proteínas a partir de geles de acrilamida se utilizó el sistema “Electro-Eluter Model 422” (BioRad) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, luego de teñir los geles de poliacrilamida con Azul Brillante de Coomassie R-250, se cortaron las regiones del gel conteniendo la proteína de interés en pequeños pedazos, y se colocaron dentro del equipo. Las proteínas se recuperaron en la misma solución de electroforesis aplicando una corriente constante de 8-10 mA por cada tubo de proteína durante 3 a 5 h.

#### **IV.6.6 Obtención de anticuerpos policlonales contra P1TcHTE**

Para la obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína de fusión P1TcHTE, se utilizaron conejos *New Zeland* y se procedió según se detalla a continuación. El protocolo de inmunización [Clark, *et al.*, 2002 - Hendriksen, 2005] y la manipulación de animales fueron llevados a cabo por el personal del bioterio perteneciente a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR, aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, resolución número 935/2015.

Se realizó una primera extracción de sangre previa a las inmunizaciones, de la cual se obtuvo el denominado suero pre-inmune. Se comprobó mediante Western blot que el mismo no reconociera la proteína a inocular (utilizando extractos de *E. coli* sobreexpresando la proteína a inocular), ni proteínas de masa molecular similar (sobre extractos totales de *T. cruzi*), antes de realizar la inmunización. Corroborado esto, se realizó la inmunización mediante tres inoculaciones con el siguiente esquema:

En cada inoculación se necesitaron unos 200 µg del péptido P1TcHTE, por eso se utilizan aproximadamente 800 µg de la fusión TRX-6HIS-STag-P1TcHTE-HIS en cada inoculación.

La primera inoculación se realizó de manera subcutánea con la muestra correspondiente. Para la obtención de anticuerpos anti-TcHTE se utilizó una mezcla de 800 µg de TRX-6HIS-STag-P1TcHTE-HIS en 400 µl llevado a volumen con PBS y 400 µl de adyuvante de Freud completo. A las 3 semanas y a las 8 semanas se realizó una segunda y tercera inoculación subcutánea, pero utilizando adyuvante incompleto. A la semana 5, 10, 15 y 19 se realizaron las extracciones de sangre y obtención del suero. La sangre extraída se incubó a 37 °C durante 2 horas (o toda la noche a temperatura ambiente) y se centrifugó durante 15 min a 3.000 x g para separar el suero. Se reservó una fracción para ensayar, mediante un ensayo de Western blot, la actividad del suero contra la proteína recombinante que se utilizó para inocular el conejo y un control negativo de extracto total de *E. coli* BL21(DE3) pLysS'.

A los 6 meses de la primera inoculación, se realizó una re-inoculación con 800 µg de TRX-6HIS-STag-P1TcHTE-HIS en 400 µl llevado a volumen con PBS y 400 µl de adyuvante de Freud completo. Luego de esta re-inoculación, se realizaron dos extracciones más de sangre (a las 2 y 7 semanas), con el mismo procedimiento anterior para separar el suero y se comprobó la reactividad mediante un ensayo de Western blot.

#### **IV.6.7 Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)**

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 15% (p/v) en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) [Sambrook, *et al.*, 1989]. Se utilizó un sistema discontinuo que consta de un gel de concentración (4% (p/v) poliacrilamida en 0,126 M Tris:HCl pH 6,8 y 0,1% (p/v) SDS) seguido por un gel de separación (15% (p/v) poliacrilamida en 0,375 M Tris:HCl pH 8,8 y 0,1% (p/v) SDS), ambos preparados a partir de una solución *stock* de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 (% (p/v)). Como iniciador de la reacción de polimerización se utilizó TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador de ésta el ión persulfato ( $S_2O_8^{2-}$ ) que se añadió en forma de persulfato de amonio (APS, preparado al 10% (p/v)).

Las muestras proteicas se mezclaron con solución de siembra para SDS-PAGE (25% (v/v) glicerol, 9% (p/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,5 mg/ml azul de bromofenol) en

una proporción 4:1. Dependiendo del origen de las muestras se hicieron distintos tratamientos: extractos proteicos bacterianos se hirvieron durante 5 min, extractos totales de *T. cruzi* se calentaron 30 min a 42 °C. De forma general, la cantidad de muestra sembrada en cada calle fue: a igual volumen de extracto por calle (10-20 µl) en el caso de los extractos proteicos bacterianos para verificar la expresión de la sobreexpresión de proteínas recombinantes, o a igual cantidad de células por calle (5 - 10 x 10<sup>6</sup> células) en el caso de extractos de parásitos.

El marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas<sup>R</sup>) se utilizó para estimar los pesos moleculares.

Para realizar la corrida electroforética se utilizó la solución amortiguadora Laemmli (0,3% (p/v) Tris, 1,44% (p/v) glicina y 0,1% (p/v) SDS) y se aplicó una corriente constante de 30 mA por gel de 1 mm de espesor. En todos los casos se empleó el equipo Mini-PROTEAN III<sup>R</sup> (Bio-Rad). Luego de la separación, los geles fueron utilizados para la detección de proteínas totales por tinción con Azul Brillante de Coomassie o para ser electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa con el fin de realizar ensayos de Western blot. Para el primer caso, las proteínas fueron fijadas por incubación durante 5 min en solución decolorante (30% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético, 60% (v/v) agua), y posteriormente los geles se tiñeron con una solución de Azul Brillante de Coomassie R250 1% (p/v) en etanol:ácido acético:agua (50:10:40). La posterior decoloración de los geles se consiguió mediante lavados con solución decolorante.

#### IV.6.8 Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham<sup>R</sup>) utilizando dos sistemas:

- el sistema submarino Mini-Trans-Blot<sup>R</sup> transfer (Bio-Rad). La transferencia se realizó con agitación permanente en baño de agua-hielo durante 90 min a 350 mA. La solución de transferencia empleada consistió en 25 mM Tris:HCl pH 8, 192 mM glicina y 20% (v/v) metanol.
- el sistema semi-seco Trans-Blot<sup>R</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó durante 90 minutos a 19 V. La solución de transferencia

empleada consistió en 48 mM Tris:HCl pH 8, 39 mM glicina, 0,05% (p/v) SDS y 20% (v/v) metanol.

Concluida la transferencia, se verificó la correcta transferencia de las proteínas por tinción reversible con el colorante rojo Ponceau S. Luego de lavar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, se llevó a cabo el bloqueo de la membrana incubando la misma con solución amortiguadora PBS-T leche durante toda la noche con agitación suave a 4 °C. Posteriormente la membrana se lavó con PBS-T y se incubó 2 horas a temperatura ambiente con una dilución del anticuerpo primario correspondiente en una solución de PBS-T. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios preparado: anti-His (Calbiochem<sup>R</sup>, 100 µg/ml, obtenidos de ratón) en una dilución 1/200, anticuerpos policlonales de conejo anti-TcHTE en una dilución 1/5000, anticuerpos de conejo anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology<sup>R</sup>) en una dilución 1/1000, anticuerpos monoclonales de ratón anti-α tubulina clon TAT-1 en una dilución 1/1000 (donado por K. Gull, Universidad de Oxford, Inglaterra). Posteriormente se realizaron 4 lavados de 10 min con PBS-T en agitación suave para eliminar los anticuerpos no unidos a la membrana y se incubó la misma con el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 horas a 4 °C en agitación suave preparados en una solución de PBS-T. Se utilizaron anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a la enzima peroxidasa HRP (Calbiochem<sup>R</sup>, 133 µg/ml, obtenidos de cabra) diluidos 1/3500 en solución PBS-T o anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa HRP (Calbiochem<sup>R</sup>, 133 µg/ml, obtenidos de cabra) en una dilución 1/10000. Seguidamente, se efectuaron 4 lavados de 10 min con la solución de lavado (PBS-T).

La detección de las señales correspondientes a las proteínas de interés se realizó mediante el método de desarrollo de quimioluminiscencia. Se empleó el *kit* comerciales ECL Prime Western Blotting Detection kit<sup>R</sup> (GE Healthceare<sup>R</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se incubaron 5 min con los reactivos comerciales mencionados y luego fueron expuestas entre 10 s a 30 min frente una placa autorradiográfica: la placa se incubó 2 min en la solución de revelado (Kodak<sup>R</sup>) y luego de lavar con agua, se incubó 2 min en la solución fijadora (Kodak<sup>R</sup>). Finalmente se enjuagó la placa autorradiográfica con agua y se dejó secar. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ [Schneider, *et al.*, 2012].

Con el fin de reutilizar las membranas de nitrocelulosa para detectar otras proteínas, estas fueron tratadas con soluciones de disrupción del complejo antígeno-anticuerpo (solución de *stripping*). Se utilizó el tratamiento con solución de *stripping* (100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% (p/v) SDS y 62,5 mM Tris:HCl pH 6,7) por 30-60 min a 50 °C. Luego del tratamiento con la solución, se procedió a lavar la membrana con PBS-T y se bloqueó la misma utilizando PBS-T-leche durante la noche. Finalmente se incubó con los anticuerpos alternativos y se procedió a repetir el resto de la técnica de Western blot.

#### **IV.6.9 Ensayos de solubilización de proteínas en solución de lisis no desnaturalizante**

Los epimastigotes crecidos en medio LIT-10% SFB 5  $\mu$ M hemina, fueron colectados por centrifugación a 2.000 x *g* durante 5 min, lavados 2 veces con PBS y resuspendidos en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glicerol, inhibidores de proteasas), conteniendo los siguientes detergentes: 0,1% (v/v) Tritón X-100, 1% (p/v) duodecil maltócido (DDM) y 2% (p/v) digitonina, a razón de 1 x 10<sup>6</sup> parásitos/ $\mu$ l. Los parásitos se agitaron vigorosamente mediante *vortex* y se congelaron y descongelaron 3 veces para facilitar la ruptura de los parásitos. Posteriormente los extractos celulares se centrifugaron a 6.000 x *g* por 20 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante y el pellet, para analizar la presencia de la proteína mediante ensayos de Western blot.

#### **IV.6.10 Ensayos de unión a hemo por cromatografía de afinidad a resina de hemina-agarosa**

Los epimastigotes crecidos en medio LIT-10% SFB 5  $\mu$ M hemina, fueron colectados por centrifugación a 2.000 x *g* durante 5 min, lavados 2 veces con PBS y resuspendidos en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glicerol, 2% (p/v) digitonina, inhibidores de proteasas) a razón de 1 x 10<sup>6</sup> parásitos/ $\mu$ l. Los parásitos se agitaron vigorosamente mediante *vortex* y se congelaron y descongelaron 3 veces para facilitar la ruptura de los parásitos. Posteriormente los extractos celulares se centrifugaron a 6.000 x *g* por 20 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. El mismo fue fraccionado e incubado con 0, 5, 20, 50, y 100  $\mu$ M hemina durante 30 min. Posteriormente se adicionó igual volumen de resina de hemina-agarosa (SIGMA-

ALDRICH<sup>R</sup>) previamente equilibrada con solución de lisis, y se incubó durante la noche a 4 °C en agitación. La resina se lavó 5 veces con solución de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glicerol, 2% (p/v) digitonina). La resina se trató 30 min a 42 °C con SB 5X y se recuperó el sobrenadante para ser resuelto por geles de poli-acrilamida.

## **IV.7 Estudio de expresión de genes recombinantes de *Trypanosoma cruzi***

### **IV.7.1 Ensayo de complementación en el sistema heterólogo *Saccharomyces cerevisiae***

Para este ensayo se prepararon placas con 20 ml de medio SCDO sólido, con diferentes fuentes de carbono y el correspondiente agregado de aminoácidos. Además, el medio de cultivo de las placas que contenían Glucosa como fuente de carbono fue suplementado con 250  $\mu$ M  $\delta$ -ALA o hemina a una concentración de 10, 1, 0,5, 0,1, 0,05 ó 0,01  $\mu$ M. El medio de cultivo de las placas que contenían Glicero-Etanol como fuente de carbono fueron suplementadas con 250  $\mu$ M  $\delta$ -ALA o hemina a una concentración de 20, 10 ó 5  $\mu$ M.

Se cultivaron células de *S. cerevisiae* transformadas con los diferentes plásmidos en 5 ml de medio SCDO Glu suplementado con 250  $\mu$ M  $\delta$ -ALA, sin el aminoácido correspondiente para la selección por auxotrofia a 30 °C en agitación por aproximadamente 18 horas (durante la noche). Al otro día se midió la DO a 600 nm y se hizo una dilución en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril de modo que la DO inicial fuera igual a 1. Luego se realizaron 4 diluciones seriadas 1/10 también en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril. Se sembraron gotas de 7  $\mu$ l de cada dilución en las placas de cada condición y se incubaron a 30 °C.

Las fotos de las placas con SCDO Glu fueron tomadas habitualmente al día 2 o 3 de crecimiento y con SCDO Gly/EtOH entre el día 5 y 8 de crecimiento. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ [Schneider, *et al.*, 2012]. Cada imagen fue convertida en escala de grises, se corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y el contraste, y se invirtieron los colores para una mejor visualización del crecimiento de las gotas de cultivo sembradas.

## **IV.7.2 Análisis del efecto de la sobreexpresión de proteínas recombinantes en el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Los epimastigotes transfectados con las construcciones clonadas en el vector pTcINDEX-GW, mantenidos en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu$ M hemina y 200  $\mu$ g/ml Hyg a 28 °C, se colectaron por centrifugación a 2.000 x g por 5 min y se resuspendieron a razón 5 x 10<sup>6</sup> parásitos/ml en 1,5 ml del mismo medio en pocillos de microplaca de 24 pocillos (1,9 cm<sup>2</sup> de superficie por pocillo).

Se realizaron dos tipos de curvas de crecimiento. Por un lado, se realizaron curvas de crecimiento sin dilución periódica dejando que los parásitos alcancen el estado estacionario. En el otro tipo de curvas de crecimiento, se realizaron diluciones periódicas al medio cada dos días, manteniendo el volumen final constante. En ambos casos, las células fueron mantenidas durante 7 - 16 días a 28 °C, monitoreando el crecimiento de las células por recuento de los parásitos en cámara de Neubauer.

## **IV.7 Microscopía**

### **IV.7.1 Coloración de Giemsa**

Para la coloración con Giemsa de las células se preparó un frotis del medio de cultivo fijado en 3,7 % (p/v) formaldehído en PBS y se procedió a teñir durante 20-30 min con el colorante Giemsa preparado fresco antes de usar agregando 1 gota del colorante por cada ml de solución estabilizadora (Solución amortiguadora fosfato, pH 6,8 diluido 1/50 en agua destilada). Posteriormente los preparados fueron lavados con agua destilada y se los dejó escurrir y secar en posición vertical, antes de montar con bálsamo de Canadá.

### **IV.7.2 Análisis de la incorporación de análogos de hemo**

Los tripomastigotes tratados con los AHs fueron fijados con 500  $\mu$ l de 3,7% (p/v) formaldehído en PBS a temperatura ambiente durante 10 min y luego lavados 2 veces con PBS. Las células se adhirieron a portaobjetos (pre-tratados con polilisina) durante 20 min,

se lavaron con PBS y finalmente se montaron utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories).

Tanto las células Vero como los amastigotes intracelulares tratados con los AHs fueron fijados con 500  $\mu$ l de metanol a temperatura ambiente durante 3 min y luego lavados 2 veces con PBS y finalmente se montaron utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories).

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 conteniendo los cubos de filtros: 99748-C55027 y 00740-C87049, utilizando el programa Nikon EZ-C1. La señal de fluorescencia roja se registró con el filtro correspondiente entre 605 y 675 nm excitando a 405 nm. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ [Schneider, *et al.*, 2012]. A cada imagen se le restó la señal obtenida en el control a tiempo cero.

### **IV.7.3 Microscopía de células de levaduras sobreexpresantes de TcHTE-HIS-GFP recombinante**

Para observar por microscopía muestras de levaduras transformadas con las construcciones pRS426M25.TcHTE-HIS-GFP se procedió de la siguiente manera. Se tomó 1 ml de cultivo ON de las levaduras crecidas en medio SCDO suplementado con glucosa como fuente de carbono, 20 mg/l metionina y sin el aminoácido correspondiente para la selección por auxotrofia a 30 °C, se lavó con PBS, se dejó adherir en portaobjetos pre-tratados con polilisina durante 20 min, se fijaron las células con 3,7% (p/v) formaldehído durante 20 min y se lavaron con PBS. Finalmente se montaron utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 conteniendo los cubos de filtros: 99748-C55027 y 00740-C87049, utilizando el programa Nikon EZ-C1. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ [Schneider, *et al.*, 2012]. A las imágenes previamente deconvolucionadas se les corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y el contraste.

#### **IV.7.4 Microscopía de parásitos sobreexpresantes de TcHTE-HIS-GFP**

Los epimastigotes y tripomastigotes sobreexpresantes de la proteína TcHTE-HIS-GFP fueron fijados con 500  $\mu$ l de 3,7% (p/v) formaldehído en PBS a temperatura ambiente durante 10 min y luego lavados 2 veces con PBS. Luego se adhirieron a portaobjetos pre-tratados con polilisina durante 20 min, se lavaron con PBS, se incubaron con 1  $\mu$ M DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y finalmente se montaron utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories). Los amastigotes intracelulares fueron fijados con metanol por 3 min. Luego lavados con PBS, incubados con 1  $\mu$ M DAPI y finalmente fueron montados utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 conteniendo los cubos de filtros: 99748-C55027 y 00740-C87049, utilizando el programa Nikon EZ-C1. La señal de fluorescencia verde corresponde a GFP y la azul a DAPI. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ [Schneider, *et al.*, 2012]. A las imágenes previamente deconvolucionadas se les corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y el contraste

#### **IV.7.5 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en epimastigotes**

Epimastigotes salvajes o sobreexpresantes de la proteína TcHTE-HIS fueron adheridos a portaobjetos (pretratados con polilisina) durante 20 min, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0,1% v/v Tritón X-100 en PBS durante 10 min. Luego se incubaron con Solución Universal de Inmunofluorescencia (UIB - 0,1% v/v Tween-20, 150 mM Tris pH 7,5 y 150 mM NaCl) con 1% p/v BSA (albumina sérica bovina) durante 30 min. Posteriormente se incubó con anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-TcHTE en UIB con 1% p/v BSA durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos no unidos se removieron mediante 3 lavados con UIB y luego se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugados con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Jackson Immuno Research, dilución 1/100) durante 1 hora a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Posteriormente los preparados se lavaron 3 veces con PBS-T y finalmente se montaron utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 conteniendo los cubos

de filtros: 99748-C55027 y 00740-C87049, utilizando el programa Nikon EZ-C1. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ [Schneider, *et al.*, 2012]. A las imágenes previamente deconvolucionadas se les corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y el contraste.

#### **IV.7.6 Purificación del complejo flagelar de epimastigotes**

Epimastigotes sobreexpresantes de la proteína TcHTE-HIS-GFP fueron colectados por centrifugación a 2.000 x *g* por 5 min, lavados con PBS y adheridos a portaobjetos (pre-tratados con polilisina) por 30 min. Luego los parásitos fueron incubados 3 veces con solución MME (10 mM MOPS pH 6,9, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>) con 0,1% (v/v) de Tritón X-100 por 10 min a temperatura ambiente. Luego los citoesqueletos fueron incubados en solución MME con 0,1% (v/v) de Tritón X-100 y 1 M NaCl por aproximadamente 1 minuto en hielo, confirmando la disolución de los microtúbulos subpeliculares por microscopía óptica. Luego los complejos flagelares fueron lavados con PBS, incubados con 3,7% (p/v) formaldehído en PBS por 20 min y 5 min en metanol frío. Luego los complejos flagelares fueron lavados con PBS y tratados con 0,2% (v/v) Tritón X-100 en PBS por 5 min. Posteriormente se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti- $\alpha$  tubulina clon TAT-1 diluidos en UIB por 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos no adheridos fueron lavados con 0,1% (v/v) Tween-20 en UIB luego los preparados fueron incubados con anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón (Alexa Fluor 555, Molecular Probes) por 1 h. Los preparados fueron luego lavados dos veces con 0,1% (v/v) Tween-20 en UIB y una vez con PBS. Finalmente, las muestras fueron montadas utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 conteniendo los cubos de filtros: 99748-C55027 y 00740-C87049, utilizando el programa Nikon EZ-C1.

#### **IV.7.7 Ensayo de protección frente a la digestión con proteasas**

Los ensayos de protección frente a la degradación de proteasas se realizaron adaptando el protocolo descrito por Chirstian Wunder [Wunder, *et al.*, 2010].

#### **IV.7.7.1 Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Brevemente, los parásitos sobreexpresantes de *TcHTE-HIS-GFP* fueron colectados por centrifugación a 2,000 x *g* por 5 min, lavados con PBS, fijados con formaldehído al 3,7% (p/v) en PBS por 5 min, lavados nuevamente y resuspendidos a razón de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml en PBS. Los parásitos fueron fraccionados en microtubos y sometidos a los siguientes tratamientos:

- 1- Incubación en PBS por 5 min
- 2- Tratamiento con 8 mM Tripsina por 5 min
- 3- Permeabilización con 0,1% Tritón X-100 en PBS por 5 min
- 4- Permeabilización con 0,1% Tritón X-100 en PBS por 5 min seguido de tratamiento con 8 mM Tripsina por 5 min.

La acción de la Tripsina se detuvo por el agregado de SFB. Luego de los tratamientos, los parásitos fueron montados en portaobjetos pre-tratados con polilisina por 20 min, lavados con PBS y montados utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 conteniendo los cubos de filtros: 99748-C55027 y 00740-C87049, utilizando el programa Nikon EZ-C1.

#### **IV.7.7.2 Células HEK293-T**

Brevemente, las células HEK293-T fueron sembradas en placas de 35 mm y transfectadas con el vector pCDNA.*TcHTE-HIS-GFP* utilizando lipofectamina. 24 h post-transfección, las células fueron lavadas con solución KHM (110 mM KAc, 20 mM HEPES pH 7,4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) y se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia excitando la muestra a 473 nm cada 20 ms mientras se realizaron los siguientes tratamientos. Se incubó con solución KHM por 1 min. Luego se adicionó 8 mM Tripsina y se incubó por 5 min. Se adicionó SFB para inactivar la Tripsina. Posteriormente se trataron las células con 20 μM Digitonina por 5 min. Finalmente se adicionó 8 mM Tripsina y se siguió registrando imágenes durante 2 min. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Olympus IX71. Se utilizó un obturador sincronizado digitalmente (Vincent Associates, Rochester,

NY) controlando el tiempo de exposición a través de un objetivo de alta apertura numérica (N.A. 1.49, 60X, oil; Olympus). La transmisión de fluorescencia se adquirió a 10 Hz usando micromanager (Vale Lab, UCSF, EE. UU.) y una cámara CCD (ORCA 12ER; Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ).

### **IV.7.7 Estudio de la estequiometría de TcHTE**

Para estudiar la estequiometría de asociación de la proteína TcHTE, se procedió a transfectar células HEK293-T con el plásmido pcDNA3.1.TcHTE-HIS-GFP por el método de lipofectamina. Veinticuatro horas luego de la transfección, las células fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas 1 h en solución Ringer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES) en ausencia de glucosa, a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% CO<sub>2</sub>.

Luego las células fueron analizadas por microscopía TIRF, registrando imágenes cada 10 ms hasta agotar la fluorescencia de la muestra. La obtención de imágenes se realizaron utilizando un objetivo adecuado para tal fin. Se generó un campo de evanescencia delgado junto a la interfaz de vidrio y agua utilizando un láser de bomba de diodo de 473 nm (LaserGlow Technologies, Toronto Canada). El láser se enfocó en una fibra óptica de 3,5 μm y fue transmitido a través del puerto de iluminación posterior de un microscopio Olympus IX71. Un obturador sincronizado digitalmente (Vincent Associates, Rochester, NY) se utilizó para controlar los tiempos de exposición a través de un objetivo de apertura numérica alta (N.A. 1,49, 60X, aceite; Olimpo). La transmisión de fluorescencia se adquirió usando micromanager (Vale Lab, UCSF, EE. UU.) y una cámara CCD (ORCA 12ER; Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ).

Las imágenes adquiridas se analizaron utilizando el programa ImageJ [Schneider, *et al.*, 2012], y los datos fueron procesados con el programa OriginPro 8, Versión 8.E, para determinar los pasos de decaimiento fluorescente. Una vez establecidos la cantidad de pasos de decaimiento fluorescente, los resultados fueron ajustados a la siguiente ecuación de predicción binomial para establecer la conformación estequiométrica.

$$P(x = k) = \frac{n!}{k!(n-k)!} \times p^k \times (1-p)^{n-k}$$

Donde  $P$  es la probabilidad de que la proteína GFP florezca (asumiendo  $P = 0,8$ ),  $n$  es el número estimado de subunidades y  $k$  representa el número esperado de subunidades GFP por partícula emisora, entre 1 y  $n$ .

### **IV.8 Análisis Estadístico**

Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada ensayo descrito y en cada uno se realizó por triplicado cada condición en estudio. Los resultados se procesaron utilizando GraphPad Prism version 6.0, aplicando el análisis estadístico correspondiente en cada caso.

## **V- Resultados y Discusión**

## **V.1 Trypanosoma cruzi y su dependencia por el grupo hemo**

*Trypanosoma cruzi* es auxótrofo para el hemo, para suplir esta necesidad debe incorporarlo desde el medio externo y distribuirlo a los diferentes compartimentos intracelulares donde es utilizado durante su ciclo de vida. Debido a las características fisicoquímicas del hemo que impiden que pueda atravesar las membranas biológicas por difusión simple, está ampliamente aceptado que debe existir algún mecanismo de transporte encargado de este proceso. Sumado a esto, la importación, distribución, almacenamiento, y/o degradación del hemo deben estar finamente reguladas, ya que un desbalance provocaría un exceso de hemo libre o de fácil disposición que puede generar efectos citotóxicos [Koreny, *et al.*, 2010]. En esta primera parte de este trabajo de Tesis se describirán los resultados obtenidos sobre relación entre la disponibilidad de hemo y el crecimiento del parásito, así como la incorporación de hemo en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

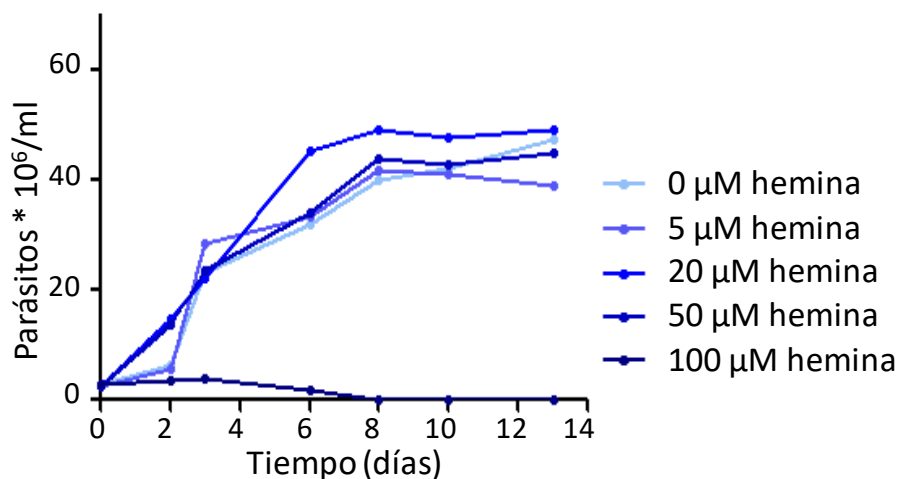
### **V.1.1 Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* pueden incorporar hemo**

Estudios previos realizados en cultivos axénicos de epimastigotes de *T. cruzi* mostraron que la proliferación de los mismos dependía de la presencia de una fuente de hemo (hemina o hemoglobina) [Lara, *et al.*, 2007]. Además, se propuso que existiría de un sistema proteico dedicado al transporte de hemo ya que el mismo fue afectado por la presencia de inhibidores de transportadores del tipo ABC [Cupello, *et al.*, 2011 - Lara, *et al.*, 2007]. En nuestro laboratorio observamos que la incorporación de hemo dependería de ATP, reforzando la hipótesis de la existencia de un transportador proteico (resultados no publicados). Para profundizar el estudio del transporte e incorporación de hemo en epimastigotes en particular y en *T. cruzi* en general, abordamos diferentes aproximaciones experimentales que se detallan a continuación.

### V.1.1.1 Las variaciones en la concentración de hemina en cultivos axénicos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* afectan su crecimiento

Para el mantenimiento de los cultivos axénicos de epimastigotes de *T. cruzi* se utilizan diferentes medios indefinidos como ser el medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) y el medio BIH (*Brain Heart Infusion*), suplementados con suero fetal bovino (SFB) inactivado por temperatura, normalmente al 10%, y con una fuente de hemo, que puede ser hemoglobina o hemina (la forma comercial de hemo). La concentración de hemina frecuentemente utilizada en BHI y LIT varía entre 20 y 30  $\mu\text{M}$  [Camargo, 1964 - Schuster y Sullivan, 2002 - Warren, 1960]. En nuestro laboratorio, los cultivos de epimastigote son mantenidos rutinariamente en fase exponencial de crecimiento en medio LIT suplementado con 10% SFB (LIT-10% SFB) y 20  $\mu\text{M}$  hemina a 28 °C [Camargo, 1964], donde su tiempo de duplicación es de 36 h aproximadamente y alcanzan su fase estacionaria a una concentración de 40-50 millones de parásitos por ml.

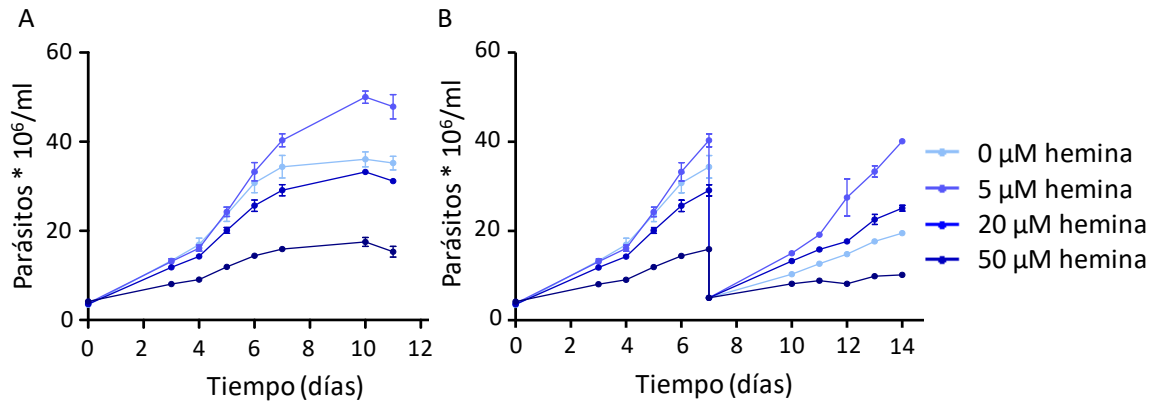
Para analizar la relación ente la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* y el hemo, en una primera etapa evaluamos el efecto de las variaciones en la concentración de hemina agregada al medio de cultivo sobre el perfil de crecimiento de epimastigotes de la cepa DM28c (DTU I). Ensayos previos realizados por nuestro grupo de trabajo mostraron que la adición de 5 y 20  $\mu\text{M}$  hemina permitieron obtener las mejores tasas de crecimiento de epimastigotes en cultivos axénicos con renovación periódica del medio (expresado como número de parásito por ml y tiempo de duplicación) y que el agregado de 100  $\mu\text{M}$  hemina resultaba letal para los epimastigotes (Figura 12) [Merli, *et al.*, 2016]. Estos resultados difieren de lo reportado por otros grupos donde no se observó un efecto negativo en el crecimiento del parásito a concentraciones de hemina superiores a 30  $\mu\text{M}$ , tolerando incluso el agregado de 1 mM hemina en el medio de cultivo [Cupello, *et al.*, 2011 - Lara, *et al.*, 2007]. Una posible explicación a estas discrepancias en las concentraciones de hemina toleradas y requeridas por los epimastigotes, podría deberse a la forma de preparación del reactivo y su agregado al medio de cultivo, llevando a que la concentración real disponible de hemina se menor que la reportada. En nuestro caso, estimamos la concentración de la solución de hemina stock luego de su preparación,



**Figura 12.** El crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* es afectado por la concentración de hemina en el medio de cultivo. Curva de crecimiento de epimastigotes de la cepa Dm28c en LIT-10% SFB suplementado con 0, 5, 20, 50 o 100  $\mu\text{M}$  hemina monitoreada durante 13 días. Previamente los parásitos se mantuvieron durante 3 días en LIT-10% SFB sin hemina (AYUNO).

registrando espectrofotométricamente la absorbancia a 385 nm, considerando el  $\epsilon_{385\text{nm}} = 58400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [Hanna, *et al.*, 2016] tal como se detalla en la sección IV.4.1 de Materiales y Métodos.

En primer lugar, decidimos profundizar nuestros estudios sobre el efecto provocado por las variaciones en la concentración de hemina agregada al medio de cultivo sobre el crecimiento de los epimastigotes, abarcando un rango de 0 a 50  $\mu\text{M}$  (concentraciones donde previamente no observamos efectos negativos severos en el crecimiento). Para ello, los parásitos mantenidos rutinariamente en LIT-10% SFB con 20  $\mu\text{M}$  hemina fueron desafiados a crecen en 0, 5, 20 o 50  $\mu\text{M}$  hemina, sin renovación periódica de medio, y su crecimiento se evaluó periódicamente durante 11 días por recuento del número de células en cámara de Neubauer, como se muestra en la Figura 13A. Los parásitos mostraron diferencias en los perfiles de las curvas de crecimiento. A partir del tercer día se observó un efecto negativo en la curva de los epimastigotes mantenidos en 50  $\mu\text{M}$  hemina, en clara diferencia al perfil mostrado por las otras condiciones. Al finalizar la primer semana de cultivo, cuando los parásitos se encontraba iniciando la fase estacionaria de crecimiento, también se observaron diferencias en los perfiles de crecimiento de los epimastigotes en las otras condiciones de cultivo. La mayor

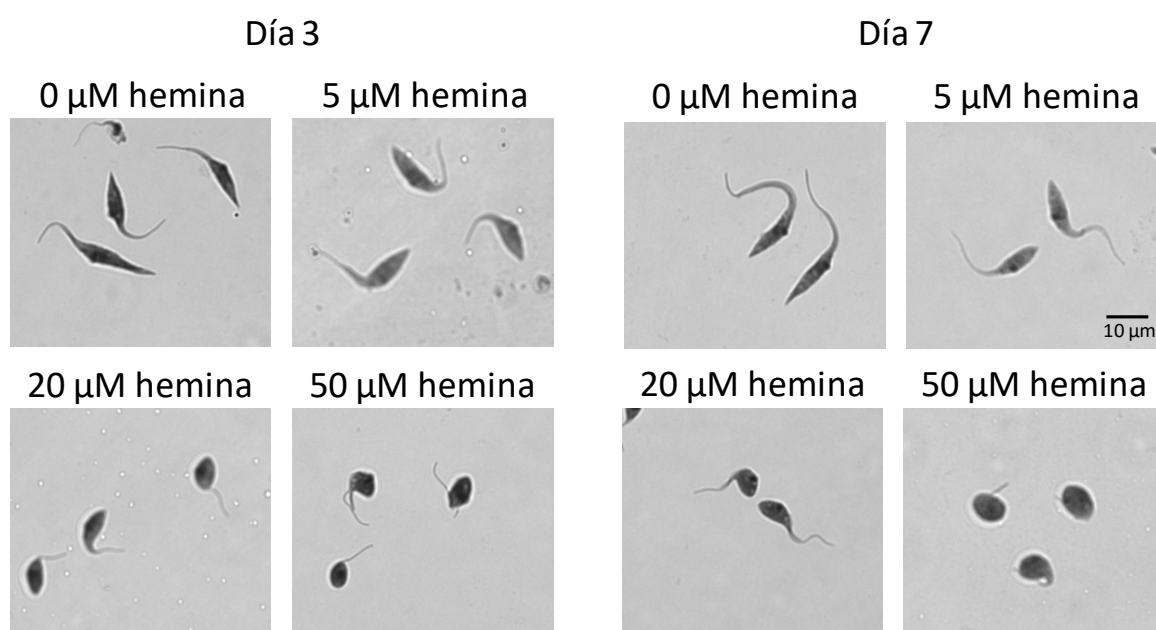


**Figura 13. La concentración de hemina en el medio de cultivo afecta el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.** Curva de crecimiento de epimastigotes de la cepa Dm28c en LIT-10% SFB suplementado con 0, 5, 20 o 50 µM hemina monitoreado durante 11 días (A), o durante 14 días, realizando una dilución a la concentración inicial en medio fresco en el día 7 (B). Previamente los parásitos se mantuvieron durante 3 días en LIT-10% SFB sin hemina (AYUNO). Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada.

concentración de parásitos fue alcanzada por los epimastigotes mantenidos con 5 µM hemina, seguidos por aquellos crecidos en ausencia de hemina y en 20 µM hemina. Estos efectos en el crecimiento se vieron exacerbados cuando, al séptimo día de crecimiento, se realizó una dilución en el mismo medio fresco a una concentración de  $5 \times 10^6$  parásitos por ml y se siguió el crecimiento periódicamente hasta el día 14. Como se muestra en la Figura 13B, durante la segunda semana las diferencias debido a las distintas concentraciones de hemina en el medio de cultivo fueron más notorias. Los parásitos mantenidos en 50 µM hemina prácticamente no aumentaron su concentración, sugiriendo que el exceso de hemina afectó negativamente su crecimiento. Los epimastigotes mantenidos en 20 µM hemina alcanzaron mayor concentración de células por ml que los mantenidos en ausencia de hemina. Aquí es importante destacar que el crecimiento observado en los epimastigotes mantenidos en medio LIT-10% SFB sin la adición de hemina podría deberse a las trazas de hemo detectadas en el SFB que fueron variables entre los diferentes lotes utilizados (Resultados reportados en la tesis doctoral del Dr. Merli mostraron una oscilación entre 0,6 a 6 µM) [Merli, 2016b]. Al término de la segunda semana de cultivo, los epimastigotes desafiados a crecer con 5 µM hemina alcanzaron la mayor concentración de parásitos por ml, confirmando lo observado durante la primera semana del experimento y de forma coincidente con los resultados

obtenidos a partir de las curvas de crecimiento con renovación periódica del medio de cultivo [Merli, *et al.*, 2016].

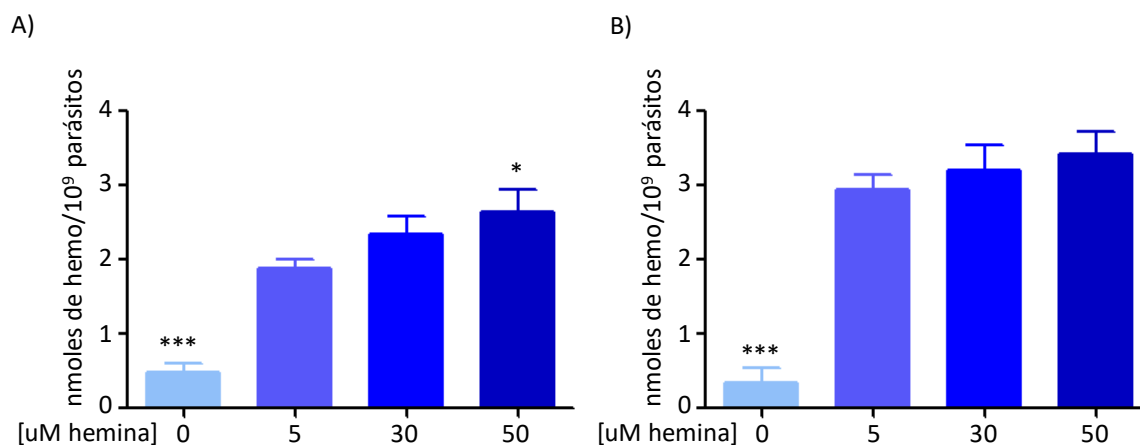
La inspección visual de los parásitos, permitió detectar un cambio tanto en la motilidad como en la morfología de los parásitos. En los días tres y siete de cultivo, se tomaron muestras de los parásitos para analizar su morfología mediante microscopía óptica. Imágenes representativas se muestran en la Figura 14, donde puede observarse que los epimastigotes desafiados a crecer en ausencia de hemina adquirieron una forma más ahusada que los aquellos crecidos en 5  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, los parásitos crecidos en 20  $\mu\text{M}$  hemina adquirieron una conformación más redondeada, con un cuerpo más pequeño y un flagelo más corto. El cambio en la morfología fue más notorio en los epimastigotes crecidos en 50  $\mu\text{M}$  hemina (adquiriendo forma más redondeada). Además, la motilidad de los epimastigotes se vio afectada por la disponibilidad de hemina en el medio de cultivo. Los parásitos mantenidos en ausencia de hemina mostraron gran motilidad, disminuyendo la misma considerablemente con el aumento de la concentración de hemina en el medio de cultivo, donde los parásitos mantenidos en medio con 50  $\mu\text{M}$  hemina prácticamente no se desplazaban. Estos cambios en la morfología y en la motilidad de los epimastigotes se mantuvieron y acentuaron al día siete de cultivo, indicando un posible efecto acumulativo con el tiempo.



**Figura 14.** La morfología de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* es afectada por la concentración de hemina presente en el medio de cultivo. Imágenes obtenidas a partir de

muestras tomadas los días 3 y 7 de las curvas de crecimiento detalladas en la Figura 13. Las imágenes son representativas de diferentes campos visuales.

Posteriormente decidimos analizar si la incubación de los parásitos en LIT-10% SFB suplementado con distintas concentraciones de hemina modificaba el contenido intracelular de hemo en epimastigotes. En este ensayo, los epimastigotes que de rutina eran mantenidos en 5  $\mu\text{M}$  hemina, fueron incubados por 48 h en LIT-10% SFB en ausencia de hemina (ayuno de hemo). Posteriormente fueron transferidos en medio fresco suplementado con 0, 5, 30 y 50  $\mu\text{M}$  hemina y se tomaron muestras a las 18 y 24 h donde se determinó la concentración intracelular de hemo por el método de la piridina básica (sección IV.4.2.2 de Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 15, en los parásitos incubados en ausencia de hemina el contenido intracelular de hemo fue menor a  $0,5 \pm 0,1$  nmoles de hemo cada  $10^9$  parásitos, encontrándose cerca del límite de detección del método. Si bien se observó una disminución en los valores obtenidos a las 24 h ( $0,3 \pm 0,4$  nmoles hemo cada  $10^9$  parásitos) (Figura 15B) comparado con los obtenidos a las 18 h ( $0,5 \pm 0,3$  nmoles hemo cada  $10^9$  parásitos) (Figura 15A), que podría ser atribuido al agotamiento del hemo intracelular con el paso del tiempo, las diferencias no resultaron significativas. Por otro lado, en los parásitos incubados en medio LIT-10% SFB suplementado con las diferentes concentraciones de hemina se observó un incremento en el contenido de hemo intracelular en función del aumento de la concentración de hemina en el medio de cultivo. Sin embargo, solo fueron significativas las diferencias en el contenido de hemo intracelular a las 18 h de cultivo, entre los parásitos incubados en 5 y 50  $\mu\text{M}$  hemina (Figura 15A). A las 24 h de incubación, el contenido de hemo intracelular de los epimastigotes incubados en presencia de hemina (5, 30 y 50  $\mu\text{M}$ ) aumentó levemente hasta alcanzar un valor medio de  $3,22 \pm 0,28$  nmoles de hemo cada  $10^9$  parásitos y no se observaron diferencias significativas entre estos grupos. Estos resultados sugieren que la incorporación de hemo se encontraría regulada y al alcanzar una concentración intracelular determinada (cuota de hemo), su incorporación se detiene o disminuye. De este modo una mayor concentración de hemina en el medio de cultivo no se ve reflejada en una mayor concentración intracelular de hemo. Resultados similares fueron obtenidos por el Dr. Marcelo Merli durante el proyecto de su tesis doctoral.



**Figura 15: El contenido intracelular de hemo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* disminuye ante la baja o nula concentración de hemina disponible en el medio de cultivo.** El contenido de hemo total fue determinado por el método de la piridina básica en muestras de parásitos tomadas luego de 18 (A) y 24 (B) horas de crecimiento en medio LIT-10% SFB suplementado con la cantidad de hemina indicada en cada caso. Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada una de las condiciones ensayadas. \* $p < 0,1$ , \*\*\* $p < 0,01$  (análisis de varianza ANOVA de un factor seguido por post-test de comparaciones múltiples de Dunnett't, utilizando la condición de 5  $\mu$ M hemina como condición control).

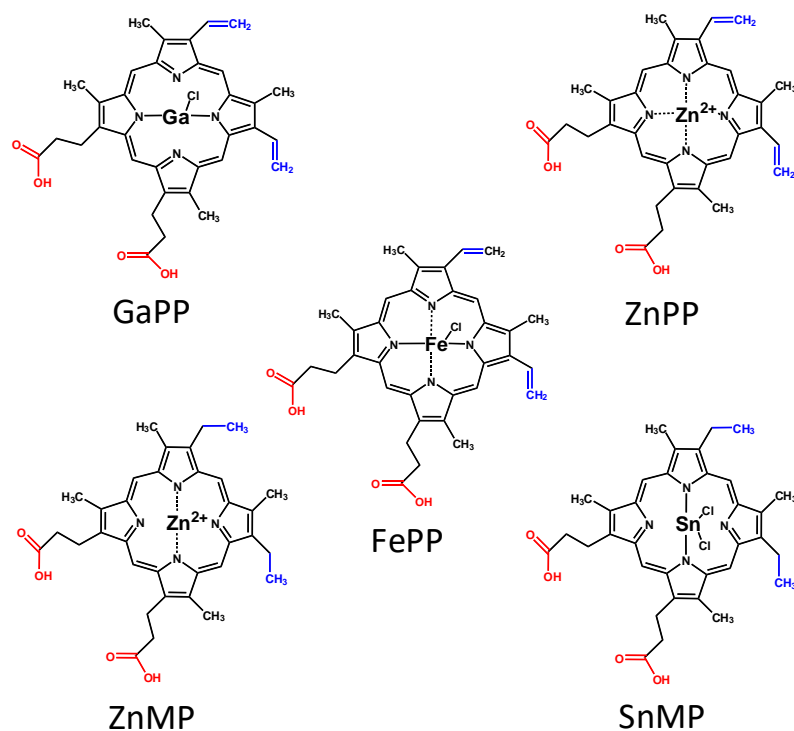
El análisis de los resultados hasta aquí expuestos confirma la necesidad del agregado de hemina (o alguna otra fuente de hemo) al medio de cultivo para un óptimo crecimiento de los epimastigotes tal como se ha reportado en numerosas ocasiones [Camargo, 1964 - Cupello, *et al.*, 2011 - Koreny, *et al.*, 2010 - Lara, *et al.*, 2007]. Si bien el perfil de crecimiento entre las condiciones de 5 y 20  $\mu$ M hemina no varió significativamente durante la fase exponencial de crecimiento, la morfología y motilidad de los parásitos si presentaron variaciones, presentando características más favorables aquellos epimastigotes crecidos en 5  $\mu$ M hemina. Además, la ausencia de diferencias significativas en el contenido intracelular de hemo en epimastigotes incubados en distintas concentraciones de hemina, indicarían que el parásito posee la capacidad de regular la cantidad de hemo incorporado, tomando suficiente para sus requerimientos nutricionales, pero evitando su incorporación en exceso. Por otro lado, el efecto tóxico observado en epimastigotes incubados a 50  $\mu$ M de hemina podría deberse a interacciones con la membrana plasmática o algún efecto sobre la superficie del parásito, ya que no se determinó un aumento en el nivel de hemo intracelular. Las observaciones realizadas durante esta sección nos permiten proponer que la concentración de hemina agregada a los medios de cultivo para epimastigotes se ajuste a 5  $\mu$ M.

## V.1.2 Utilización de análogos de hemo como herramienta para el estudio del transporte de hemo

Para estudiar el transporte de hemo en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* utilizamos los siguientes análogos fluorescentes de hemo (AHs): Ga(III) protoporfirina IX (GaPP), Zn(II) protoporfirina IX (ZnPP), Zn(II) mesoporfirina IX (ZnMP) y Sn(IV) mesoporfirina IX (SnMP), en los cuales el ion metálico central del anillo protoporfirínico o mesoporfirínico (que en el hemo es  $\text{Fe}^{3+}$  es reemplazado por  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  o  $\text{Sn}^{4+}$ ). Si bien estos compuestos son estructuralmente similares al hemo como se muestra en la Figura 16, no pueden sustituir su función debido a que los iones metálicos centrales no poseen la capacidad redox del hierro. Estos compuestos poseen un espectro de absorción similar al hemo, con un máximo a 405 nm (banda de Soret) y dos picos de menor intensidad a 530 y 570 nm. A diferencia del hemo, estos compuestos son fluorescentes, presentando dos máximos de emisión alrededor de los 580 y 630 nm cuando son excitados a 405 nm. Es esta característica la que los convierte en una herramienta sumamente útil para estudiar el transporte de hemo en diferentes modelos experimentales, ya que su incorporación puede seguirse utilizando dos estrategias diferentes. Por un lado, mediante medidas de fluorescencia directa a partir de extractos celulares totales de los parásitos incubados con los diferentes AHs. Por otro lado, mediante microscopia confocal de fluorescencia, donde la señal de fluorescencia correspondiente a los AHs internalizados puede detectarse en alguna región u organela específica de las células ( $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ , registrando las señales de emisión de fluorescencia roja utilizando los filtros correspondientes, de 605-675 nm).

### V.1.2.1 Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incorporan análogos de hemo

En nuestro grupo de trabajo, los estudios de transporte de hemo en epimastigotes utilizando AHs, fueron realizados por el Dr. Marcelo Merli durante su tesis doctoral. Debido a que sus resultados fortalecen la discusión sobre el transporte de hemo en los otros estadios del ciclo de vida del parásito, para los cuales hemos utilizado ensayos similares, resumiré algunos resultados obtenidos.



**Figura 16. Estructura química de los análogos fluorescentes de hemo.** Esquema de la estructura molecular de derivados de protoporfirina IX (PP): Ga(III)protoporfirina IX (GaPP), Zn(II)protoporfirina IX (ZnPP) y Fe(III)protoporfirina IX (hemina); y derivados de mesoporfirina IX: Sn(IV)mesoporfirina IX (SnMP) y Zn(II)mesoporfirina IX (ZnMP).

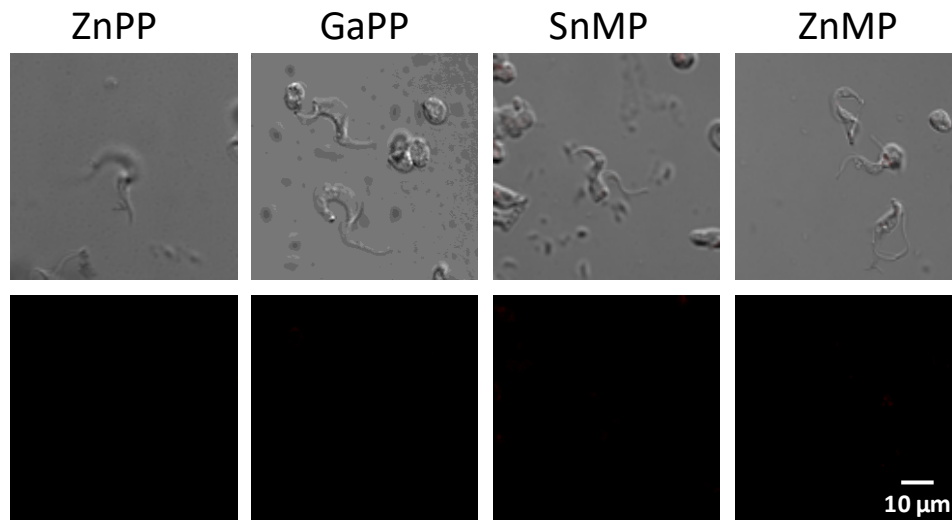
Los ensayos realizados en nuestro laboratorio mostraron que los epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c) incorporaron selectivamente los diferentes AHs utilizados. Mientras que el ZnMP, ZnPP y GaPP fueron detectados en el interior celular tanto por microscopía confocal de fluorescencia como por mediciones de fluorescencia directa de extractos celulares totales, el SnMP no pudo ser detectado en ninguno de los ensayos realizados [Merli, *et al.*, 2016]. Además, aquellos AHs que fueron internalizados, provocaron un efecto deletéreo en el crecimiento de los parásitos, presumiblemente debido a que generan un efecto tóxico al no suplir la función del hemo. A su vez, la incubación de los parásitos con los diferentes AHs, provocaron en todos los casos, una disminución en el contenido intracelular de hemo. Este último resultado está en acuerdo con lo reportado por Cupello y colaboradores que demostraron que el tratamiento de epimastigotes de *T. cruzi* con diferentes AHs (SnMP, PdMP y ZnMP) durante 10 min previene la incorporación de hemo por el parásito postulando una probable competencia de estos compuestos por el mismo transportador [Cupello, *et al.*, 2011]. Es interesante destacar que si bien en los ensayos realizados en nuestro laboratorio, el contenido intracelular de hemo de los epimastigotes incubados con los AHs (ZnMP, ZnPP, GaPP y SnMP) disminuyó en todos los

casos, reforzando la hipótesis de competencia el transportador de hemo, solo aquellos AHs que fueron internalizados provocaron un efecto deletéreo en el crecimiento del parásito.

### **V.1.2.2 Los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* no incorporan análogos de hemo**

Para profundizar el estudio del transporte de hemo en otros estadios del ciclo celular de *T. cruzi*, comenzamos evaluando la incorporación de AHs en tripomastigotes derivados de célula (Dm28c), utilizando un protocolo similar al empleado en los ensayos de transporte en epimastigotes como se describe en la sección IV.4.3.3 de Materiales y Métodos. Brevemente, los tripomastigotes fueron colectados del sobrenadante del cultivo de células Vero infectadas, lavados con PBS e incubados por 30 min con una solución 100  $\mu$ M de los diferentes AHs. Posteriormente los tripomastigotes fueron lavados, fijados y montados en un portaobjetos para su posterior análisis por microscopía confocal de fluorescencia. Debido a las características propias de los tripomastigotes, los mismos no pudieron ser sometidos a un período de ayuno o de cultivo especial en ausencia de hemo, ya que que las células huésped utilizadas para la obtención de los tripomastigotes son capaces de sintetizar hemo.

En la Figura 17 se muestran imágenes de microscopía confocal de fluorescencia representativas de al menos 6 repeticiones experimentales independientes, donde los tripomastigotes fueron incubados con los diferentes AHs. Si bien se han ensayado diferentes condiciones, variando tanto los tiempos de incubación o realizando las incubaciones en PBS o en medio de cultivo DMEM, no pudo detectarse señal fluorescente proveniente de ninguno de los AHs utilizados en el interior de los tripomastigotes. Estos resultados indican que el estadio infeccioso no replicativo de *T. cruzi* no sería capaz de incorporar hemo o sus análogos, al menos en las condiciones experimentales ensayadas [Merli, *et al.*, 2016].



**Figura 17: Los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* no incorporan AHs.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia de tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28c incubados 30 minutos con los diferentes análogos fluorescentes de hemo a una concentración de 100  $\mu$ M. Las imágenes son representativas de diferentes campos tomados de al menos tres experimentos independientes.

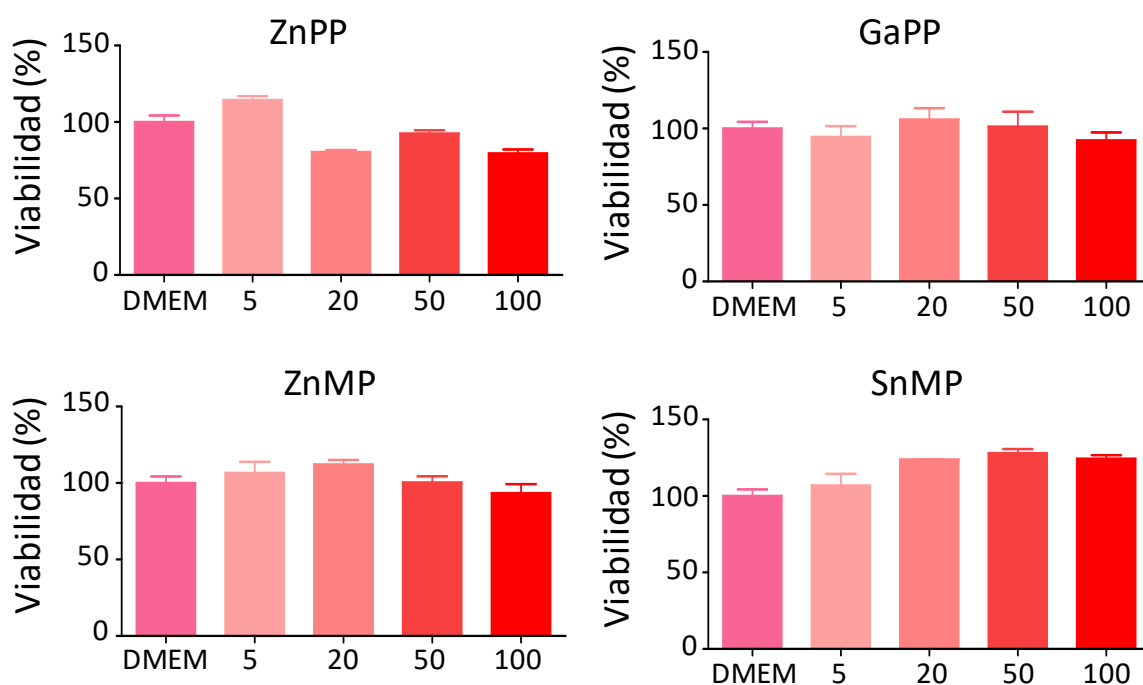
### V.1.2.3 Los amastigotes de *Trypanosoma cruzi* incorporan análogos de hemo

En nuestro laboratorio establecimos las condiciones experimentales que posibilitan el mantenimiento del ciclo infeccioso de *T. cruzi* *in vitro* utilizando células Vero, como células huésped. Además, este sistema de infecciones *in vitro* nos permiten realizar estudios en amastigotes intracelulares y evaluar los procesos de infección por tripomastigotes [Merli, *et al.*, 2017 - Merli, *et al.*, 2016]. Para estudiar la incorporación de hemo en el estadio intracelular de amastigotes de *T. cruzi* empleamos una estrategia similar a la reportada por Sartorello y col., donde eritrocitos infectados con *P. falciparum* fueron incubados 30 min con ZnMP y luego se evaluó el transporte de este AH por microscopía de fluorescencia en los tres estadios intraeritrocitarios [Sartorello, *et al.*, 2010]. De este modo, diseñamos un ensayo que nos permitió exponer las células Vero infectadas con amastigotes a los distintos AHs y luego analizar la distribución de la señal fluorescente de los mismo por microscopía confocal de fluorescencia. Previo a realizar este ensayo, debimos evaluar dos características esenciales para la factibilidad del mismo: la capacidad de los diferentes AHs de ser incorporados por las células Vero y la citotoxicidad que éstos pudieran producir a las células, con el fin de establecer

condiciones que permitan mantener a las células viables durante los tiempos requeridos para el ensayo.

### V.1.2.3.1 Citotoxicidad de los diferentes análogos de hemo sobre las células Vero

Para el evaluar la citotoxicidad de los AHs en las células Vero, utilizamos el método “*Cell proliferation Kit 1* (MTT)” de Roche como se detalla en la sección IV.4.3.1.1 de Materiales y Métodos. El objetivo de este ensayo fue verificar que durante el tiempo de exposición de las células infectadas a los diferentes AHs, definido en 30 min en función de lo reportado por Sarorello y col., estos compuestos no afecten la viabilidad celular. Para asegurarnos de cubrir el tiempo establecido, evaluamos la viabilidad de las células luego de ser tratadas por 2 h con distintas concentraciones (de 5 a 100  $\mu\text{M}$ ) de los diferentes AHs. Los valores de viabilidad se normalizaron con respecto a un control en el cual se utilizó medio DMEM-10% SFB sin el agregado de análogo. Como puede verse en la Figura 18, ninguno de los AHs causó un efecto significativo en la viabilidad de las células Vero tras un período de incubación de 2 h.

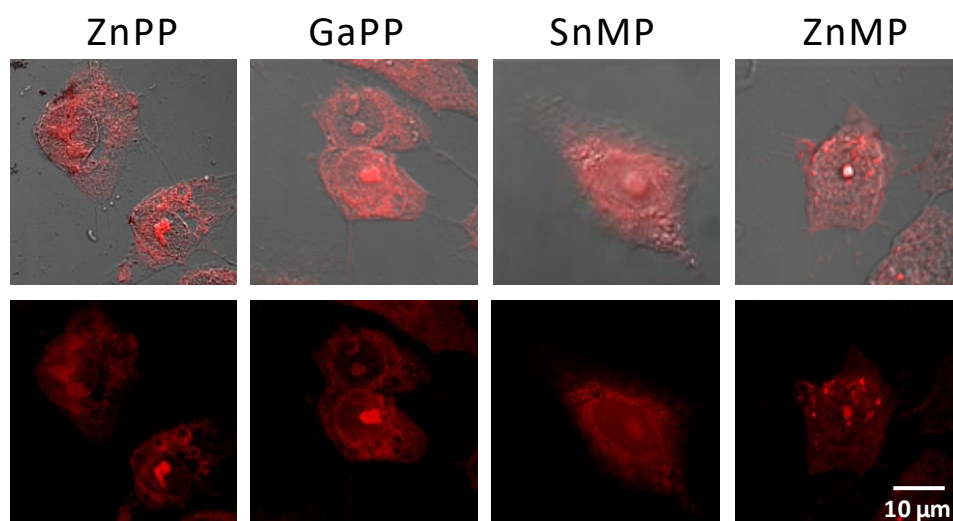


**Figura 18: Análisis de la citotoxicidad de los AHs sobre células Vero.** Medidas de viabilidad celular de las células Vero luego de 2 horas de incubación con soluciones de 5, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$  los diferentes AHs. Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas

independientes de cada una de las condiciones ensayadas. (análisis de varianza ANOVA Kruskal Wallis, seguido por post-test de comparaciones múltiples de Dunn).

### V.1.2.3.2 Las células Vero incorporan los diferentes análogos de hemo

Para evaluar la incorporación de los AHs por las células Vero, éstas fueron crecidas en monocapa en medio DMEM-2% SFB hasta alcanzar un 80% de confluencia, lavadas con PBS e incubadas con los diferentes AHs a una concentración de 100  $\mu$ M, por 30 min. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS, fijadas con metanol y luego fueron montadas para realizar estudios de microscopía confocal de fluorescencia. Como se observa en la Figura 19 la señal de fluorescencia roja correspondiente a los AHs se distribuyó homogéneamente en todo el citoplasma, confirmando que estos compuestos fueron incorporados por las células.

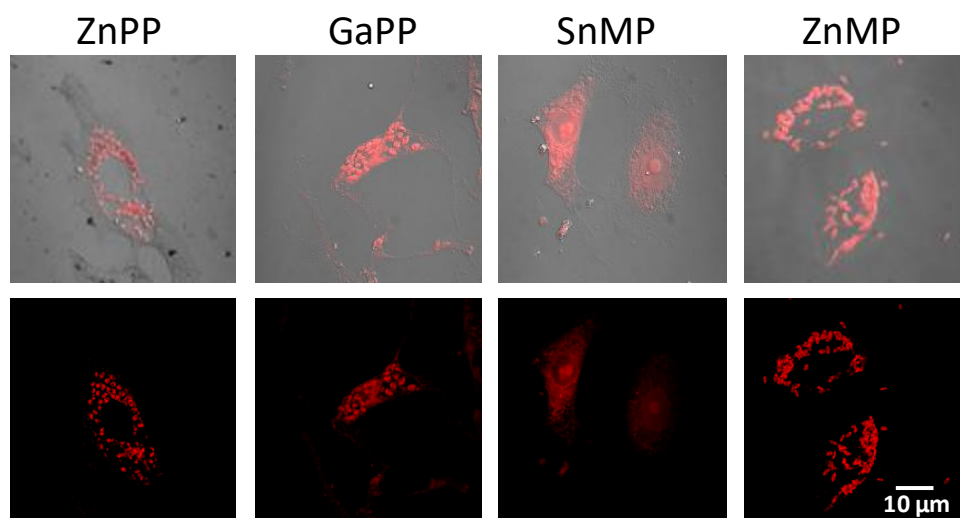


**Figura 19: Las células Vero incorporan AHs.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia de células Vero incubados 30 minutos con una concentración de 100  $\mu$ M de los diferentes AHs. Las imágenes son representativas de diferentes campos tomados de al menos tres experimentos independientes.

### V.1.2.3.3 Los amastigotes intracelulares de *Trypanosoma cruzi* incorporan análogos de hemo

Una vez establecido que los diferentes AHs son incorporados por las células Vero en un período de 30 min, y que durante este tiempo las células mantiene su viabilidad, procedimos a realizar el experimento de transporte en células infectadas con *T. cruzi*.

Para ello las células Vero se crecieron en monocapa hasta alcanzar un 50% de confluencia sobre cubreobjetos en medio DMEM-2% SFB y posteriormente fueron incubadas con tripomastigotes de *T. cruzi* respetando una MOI (*Multiplicity of Infection*) igual a 40 por 4 h para permitir el establecimiento de la infección. Luego se procedió al lavado de los parásitos que no fueron internalizados y, entre 48 y 72 h post-infección, cuando los amastigotes fueron visibles bajo el microscopio óptico, se procedió al ensayo de transporte propiamente dicho. Las células infectadas fueron lavadas con PBS e incubadas con una solución 100  $\mu$ M de los diferentes AHs por 30 min. Posteriormente se lavaron con PBS nuevamente, se fijaron con metanol y se montaron para realizar estudios de microscopía confocal de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 20 no se observó el mismo patrón de fluorescencia en las imágenes obtenidas de las células infectadas que fueron tratadas con los distintos AHs. En aquellas células incubadas con ZnMP, ZnPP y GaPP se registró una señal de fluorescencia intensa coincidente con la localización de los amastigotes intracelulares dejando limpio el citoplasma celular. Por otro lado, en las células tratadas con SnMP no se modificó el patrón de señal fluorescente respecto a las imágenes obtenidas de células no infectadas, es decir que la señal fluorescente correspondiente al SnMP no se localiza coincidentemente con los amastigotes. Estos resultados indican que, al igual que lo observado en epimastigotes, los amastigotes de *T. cruzi* serían capaces de incorporar los AHs ZnMP, ZnPP y GaPP pero no SnMP [Merli, *et al.*, 2016].



**Figura 20: Los amastigotes de *Trypanosoma cruzi* incorporan selectivamente AHs.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia de amastigotes intracelulares de *T. cruzi*

Dm28c incubados 30 minutos con una concentración 100  $\mu$ M de los diferentes AHs. Las imágenes son representativas de diferentes campos tomados de al menos tres experimentos independientes.

En resumen, los resultados hasta aquí descritos indican que los estadios replicativos no infectivos (epimastigotes y amastigotes) de *T. cruzi* son capaces de incorporar selectivamente los AHs, a diferencia del estadio infectivo no replicativo (tripomastigotes). Esta selectividad apoyaría la hipótesis de la existencia de un sistema de transporte proteico para la incorporación de hemo en *T. cruzi* y además que éste sería capaz de discriminar entre compuestos estructuralmente muy similares. Una posible causa de la diferencia observada en el transporte de los diferentes AHs podría deberse a la carga del ión central, y los contra-iones que se asocian a estos (+2 para el Zn, +3 para el Ga y +4 para el Sn). Asimismo, la diferencia en la incorporación observada entre los diferentes estadios podría indicar que el complejo encargado del transporte de hemo no se encuentre activo durante todo el ciclo de vida del parásito, gracias a que las proteínas que lo componen se expresen, ensamblen o activen de manera diferencial, explicando así la ausencia de actividad observada en tripomastigotes. Otra posibilidad es que el estadios de tripomastigote no requiera de la incorporación hemo, debido a que es un estadio de transición entre amastigote y amastigote (dentro del ciclo infectivo en el mamífero), amastigote y epimastigote (al ser ingerido por el insecto hematófago), o epimastigote y amastigote (al ser eliminado en las heces del insecto). La expresión diferencial de genes según el estadio del ciclo de vida, se ha reportado por ejemplo para los transportadores de glucosa en *T. cruzi*, *T. brucei* o *Leishmania spp.* [Silber, *et al.*, 2009 - Tetaud, *et al.*, 1994]. Se ha reportado en ensayos *in vitro* que los tripomastigotes presentan una vida libre, si no logran infectar una célula, de aproximadamente 24 h [Tyler y Engman, 2001]. A diferencia de los estadios replicativos que deben duplicar su contenido proteico (incluidas las hemoproteínas y su cuota de hemo, entre otros) durante el ciclo celular, los tripomastigotes podrían no necesitar incorporar más hemo ya que el parásito tendría satisfecha su cuota de hemo.

## **V.2. Transportadores de hemo en tripanosomátidos**

Si bien el transporte de hemo ha sido ampliamente estudiado en organismos procariotas, encontrando diferentes mecanismos de incorporación del cofactor [Anzaldi y

Skaar, 2010 - Tong y Guo, 2009 - Wilks y Burkhard, 2007], es relativamente poco el conocimiento que se tiene de este proceso en organismos eucariotas y menos aún en tripanosomátidos [Koreny, *et al.*, 2010 - Panek y O'Brian, 2002 - Severance y Hamza, 2009]. En los últimos años se han descrito diferentes proteínas que podrían, *in vivo*, actuar como transportadores de hemo. Entre ellas, debemos mencionar el trabajo realizado en el nematodo *C. elegans* que, al igual que los tripanosomátidos, es incapaz de sintetizar hemo y debe incorporarlo de su dieta. En este organismo se han identificado diferentes genes cuya transcripción es afectada por los cambios en la cantidad de hemo en la dieta (genes HRG), siendo de particular interés el que codifica para la proteína CeHRG-4, señalada como la proteína transportadora de hemo en la membrana plasmática de las células del epitelio intestinal del nematodo [Rajagopal, *et al.*, 2008]. Posteriormente, en *Leishmania amazonensis* se ha identificado una proteína homóloga a CeHRG-4, denominada LaHR1, y los ensayos realizados para su caracterización han permitido asignarle un rol como responsable del transporte de hemo [Huynh, *et al.*, 2012]. LaHR1 presenta un 15% de identidad y un 45% de similitud con CeHRG-4 [Cabello-Donayre, *et al.*, 2016 - Huynh, *et al.*, 2012] y es la primera proteína de tripanosomátidos que se ha relacionado directamente con el transporte de hemo. Tanto CeHRG-4 como LaHR1 pertenecen a la familia HRG, ya que su transcripción responde a la disponibilidad de hemo en los medios de cultivo [Huynh, *et al.*, 2012 - Rajagopal, *et al.*, 2008 - Yuan, *et al.*, 2012].

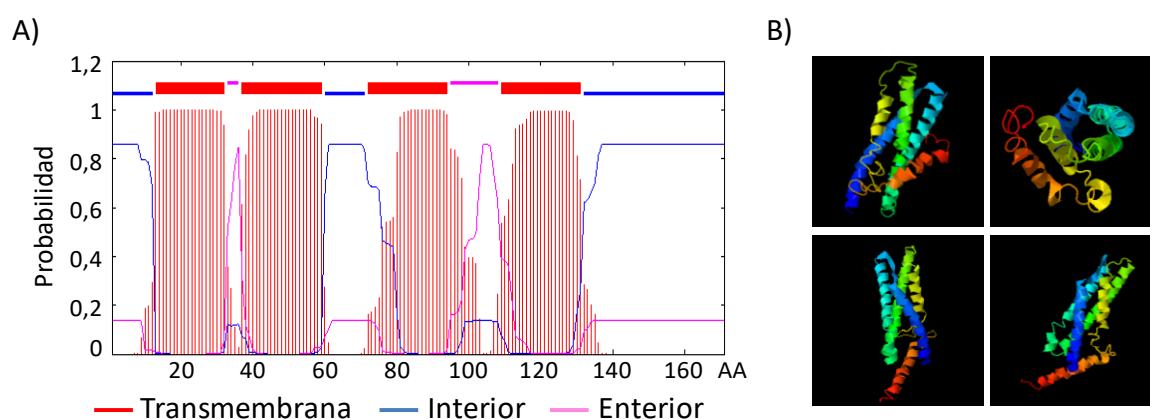
### **V.2.1 Identificación de una proteína de *Trypanosoma cruzi* con homología a LHR1**

En trabajos previos realizados en el laboratorio, utilizando como semilla la secuencia de LmHR1 de *Leishmania major* (LmjF.24.2230), se realizó una búsqueda en el genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener (base de datos TritrypDB, <http://tritrypdb.org>) en la cual se logró identificar una secuencia homóloga que codificaría para una proteína de 171 AA (TcCLB.504037.10 No esmeraldo; TcCLB.511071.190 Esmeraldo). En función de los primeros ensayos de caracterización realizados, hemos denominado a esta proteína TcHTE (del inglés *Heme Transport Enhancer*, se describe más adelante). La secuencia génica fue amplificada a partir de ADN genómico de *T. cruzi* de la cepa Dm28c disponible

en el laboratorio (identificación del probable gen AYLP01000162), clonada en el vector pENTR3c y luego corroborada por secuenciación. La secuencia de la proteína de *T. cruzi* presentó una similitud del 55% y una homología del 38% con *LmHR1* [Huynh, *et al.*, 2012 - Merli, *et al.*, 2016] y además, un 38% de similitud con *CeHRG-4* [Rajagopal, *et al.*, 2008]. Durante el transcurso de este trabajo de Tesis el grupo del Dr. Perez-Victoria ha caracterizado a la proteína homóloga de *T. brucei*, *TbHRG*, utilizando la misma estrategia experimental [Cabello-Donayre, *et al.*, 2016].

## V.2.2 Análisis de la secuencia de *TcHTE*

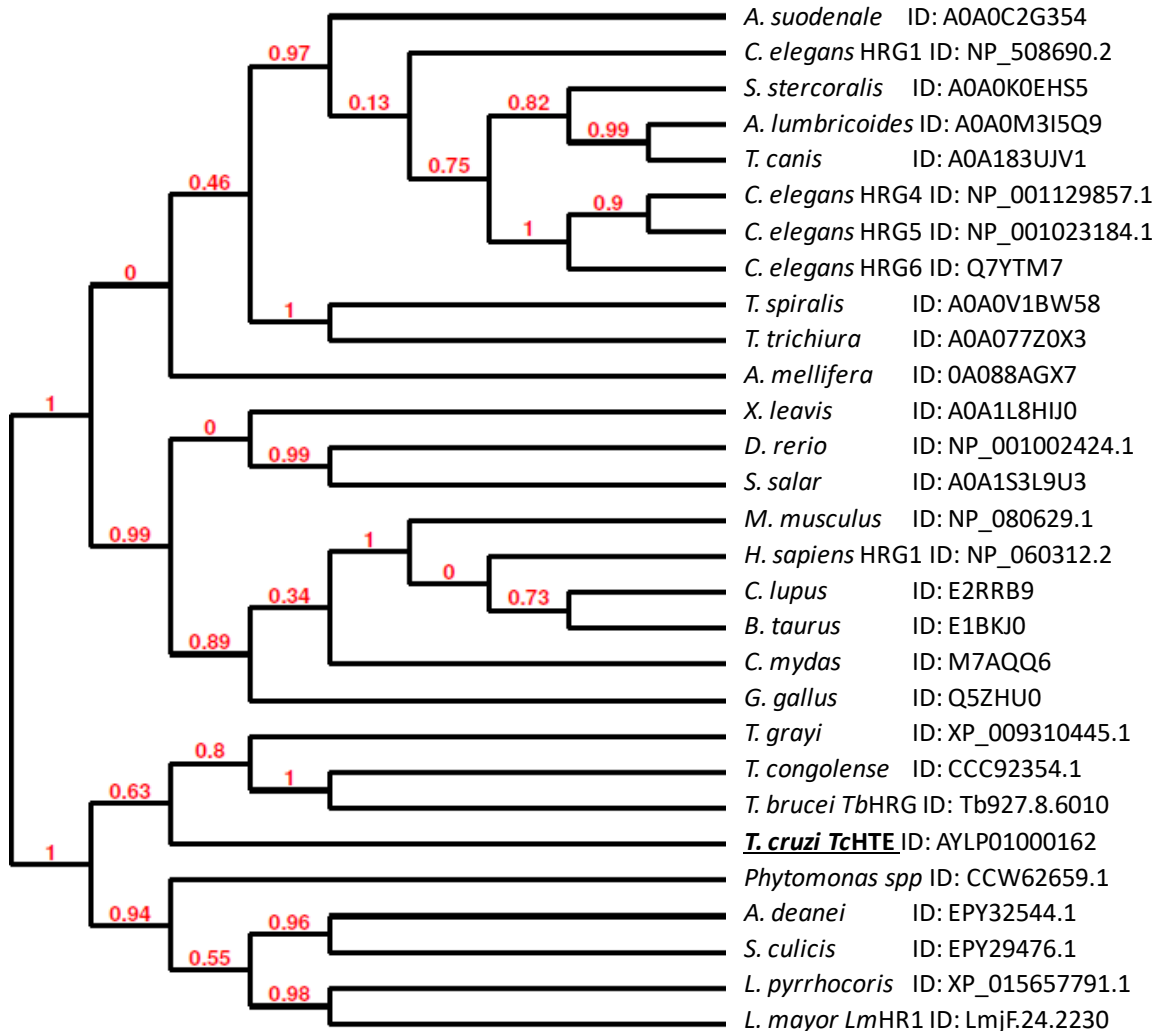
En primer lugar se realizó el análisis *in silico* de la secuencia proteica de *TcHTE* utilizando programas de uso libre como se describe en la sección IV.1 de Materiales y Métodos. En la Figura 21 se presentan las características principales obtenidas. La proteína *TcHTE* presentaría 4 regiones alfa hélice que formarían 4 dominios transmembrana, y los extremos N y C-terminales se encontrarían del lado citoplasmático, características compartidas por las proteínas *CeHRG-4*, *CeHRG-1*, *LaHR1* y *TbHRG* [Cabello-Donayre, *et al.*, 2016 - Horakova, *et al.*, 2017 - Huynh, *et al.*, 2012 - Merli, *et al.*, 2016 - Rajagopal, *et al.*, 2008 - Renberg, *et al.*, 2015 - Yuan, *et al.*, 2012].



**Figura 21. Predicción bioinformática de las regiones transmembrana y estructura de la proteína *TcHTE*.** A) Identificación de las posibles regiones transmembrana realizada con el programa TMHMM (<http://cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), además se muestran las secuencias dirigidas hacia el interior y hacia el exterior de la célula. El eje X corresponde a la numeración de los AA de la secuencia proteica. B) Predicciones de estructura en 3 dimensiones realizada con el programa I-TASSER [Zhang, 2008].

En la Figura 22 se muestra un árbol filogenético de proteínas de la familia HRG de diferentes organismos, donde se aprecia que la proteína de *T. cruzi*, *TcHTE*, se encuentra

filogenéticamente más próximo a la proteína de *T. brucei*, que a la de *Leishmania spp.* A su vez, las proteínas de los tripanosomátidos se encuentran en una rama diferente a las de *C. elegans*, a pesar de compartir características estructurales similares.



**Figura 22. Árbol filogenético de proteínas de la familia HRG.** Se muestra el árbol filogenético realizado con el programa Phylogeny.fr [Dereeper, *et al.*, 2010 - Dereeper, *et al.*, 2008], de proteínas de la familia HRG de diferentes organismos representativos, entre los que se encuentran *C. elegans*, *L. major*, *T. brucei*, y *T. cruzi*.

En la Figura 23 se muestra el alineamiento de las secuencias correspondientes a las proteínas homólogas TcHTE, LaHR1, TbHRG, CeHRG-4, donde se destacan las regiones transmembrana y los aminoácidos reportados como esenciales de cada organismo. Como puede notarse, solo algunos de estos residuos se hallan conservados, entre los que se encuentran las tirosinas Y18 y Y129 de LaHR1 [Renberg, *et al.*, 2015] que corresponderían

<i>Tc</i> HTe	1	-MAISEKKCLFI-----RV--ALLLFIAAYAAGVVVFII	SFSNYWAAAG
<i>Lm</i> HR1	1	-MNDLERKRRTF-----RIWLAIIIFALAYLSGVLLFCFV	HQNYWACGG
<i>Tb</i> HRG	1	-MALSEKACLRI-----RV--TVTIFLISYLVGAAVFVR	KFSNFMAASG
<i>Ce</i> HRG4	1	MTAENRGFCQLIICHINVRI--GWTIFGIVFGISAILTYAIK	FHNW SATAT
<i>Tc</i> HTe	43	FFLACIFIAITTVLYVV	PDKKLTARLPFGSLSR IIFQSTILIGTLGFFAV
<i>Lm</i> HR1	45	FVVVILLIALRVALLV	TPQYRLYKIFPPCSFNRIAYQTFFLCGLVGLSL
<i>Tb</i> HRG	43	FVAASIFIGLAIAMHVMG	TEGLQSRIQPRSLKRVVIMGVLVAADVALLTL
<i>Ce</i> HRG4	49	TAIATLFA CETLYLYWAL	KKNTIVNWKSSTFQLM IWPVNFVFIGLLGLLGC
<i>Tc</i> HTe	93	ALYLLARGIMLK-----QRWTCSSYFCSFIAFMMAAKWC	YFIGYRVHGLR
<i>Lm</i> HR1	95	GVWLMAGGIKHH-----QSWTARSYFCGMTGVWMAAKWS	YIVTVPIYELR
<i>Tb</i> HRG	93	SIYTLVVGIKRR-----EKWTGESNFCSTAMVCGLKWC	CSVCVYLLY---
<i>Ce</i> HRG4	98	LVCYIIAGITHQAGAGSIQAM	YGENLWFTGSWSLVITKWTW---QNAF FAR
<i>Tc</i> HTe	138	NDTRT-----IGKADPEEIKKFFEEVVP	DAWSNEKNADIM--
<i>Lm</i> HR1	140	EDTLEEDALIRLGLIDSEKNEASGNNEP	-VISKENCA-----
<i>Tb</i> HRG	135	---RS-----GTPSNPPEFDSLRLKGEED	GNGKEGPQTSML-
<i>Ce</i> HRG4	145	KYLNK-----IGTAS-----	EDGDIDDDDDVEVIKS

**Figura 23: TcHTe presenta características topológicas conservadas con proteínas de la familia HRG.** Alineamiento de las secuencias de *Tc*HTe de *T. cruzi* (ID: AYLPO1000162), y sus homólogos *Lm*HR1 (*L. major*, ID: LmjF.24.2230), *Tb*HRG (*T. brucei*, ID: Tb927.8.6010) y *Ce*HRG4 (*C. elegans*, ID: NP\_001129857.1) utilizando el programa ClustalW [Larkin, *et al.*, 2007]. Se muestran recuadradas y resaltadas en amarillo las 4 regiones transmembrana predichas. Resaltados en rojo se muestran los AA reportados como esenciales para el funcionamiento de las proteínas, en celeste aquellos residuos conservados en *Tc*HTe y al menos dos de las otras proteínas y en verde, otros AA cuya función fue reportada como importante.

a Y16 y Y127 en *T. cruzi*. La Y18 de *La*HR1 también se encuentra conservada en *Tb*HRG (Y16) [Horakova, *et al.*, 2017], pero no así la Y129. Por otro lado, la Y80 reportada como esencial para *La*HR1 se encuentra reemplazada por una fenilalanina en *Tc*HTe (F78) y no está presente en las secuencias de *Tb*HRG ni de *Ce*HRG-4. A su vez, la histidina en posición 36 (H36) que se reportó relevante para el funcionamiento de *La*HR1, se encuentra sustituida por fenilalanina en *Tc*HTe, *Tb*HRG y *Ce*HRG-4. Por otro lado, la Y63 de *Ce*HRG-4, que se considera esencial, se encuentra conservada en la posición 57 de *Tc*HTe, pero no está presente en las secuencias de *La*HR1 ni de *Tb*HRG. Otros residuos reportados como relevantes para el funcionamiento de *Ce*HRG-4 son la histidina 108 (H108), y el motivo FARKY en su extremo C-terminal [Yuan, *et al.*, 2012]. Si bien H108 se mantiene conservada en la secuencia de *La*HR1 (H105), no está presente en *Tc*HTe ni en *Tb*HRG. Además, el motivo FARKY de *Ce*HRG-4 no se encontró en las secuencias homólogas de

*Leishmania spp.*, *T. brucei*, ni *T. cruzi*, indicando que estos organismos podrían utilizar otros aminoácidos para mediar el transporte de hemo.

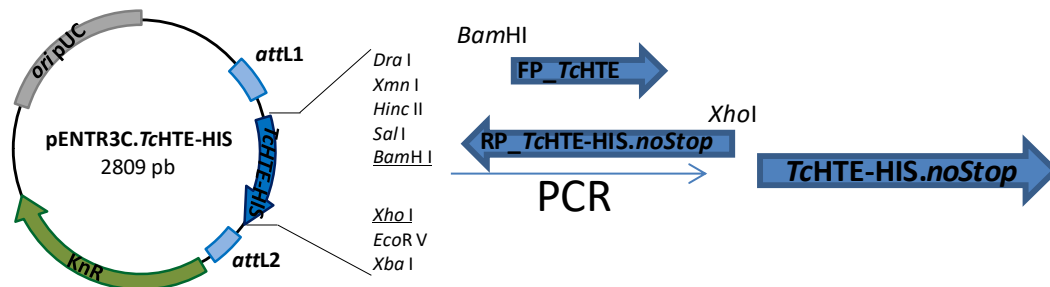
En síntesis, del análisis de las secuencias se desprende que no todos los residuos identificados como relevantes para la actividad de estas proteínas en un organismo se encuentran conservados, indicando que su función puede no ser esencial, dejando aún abierta la pregunta sobre el rol específico de estas proteínas en el transporte de hemo y la identificación de residuos y/o motivos claves para cumplir esta función.

### **V.2.3 Clonado de *TcHTE* en diversos vectores de expresión**

Debido a la similitud encontrada con las de las proteínas transportadoras de hemo en *C. elegans*, *Leishmania spp.* y *T. brucei*, *TcHTE* podría ser la proteína encargada del transporte de este cofactor en *T. cruzi*. Para estudiar su rol en el transporte de hemo, decidimos clonar su secuencia codificante en vectores que nos permitieron realizar diversos ensayos tanto en *S. cerevisiae* como en *T. cruzi*. Para ello diseñamos cebadores directos y reversos, que nos permitieron amplificar la secuencia codificante introduciendo los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I. Además, el cebador reverso introduce una secuencia que adiciona una cola de 6 histidinas en el extremo 3' (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de materiales y métodos). También se diseñaron los cebadores para la amplificación de la secuencia codificante de la proteína GFP, entre los sitios *Xho*I y *Eco*RI, *Eco*RV y *Xba*I, con el fin de generar la proteína de fusión *TcHTE*-HIS-GFP.

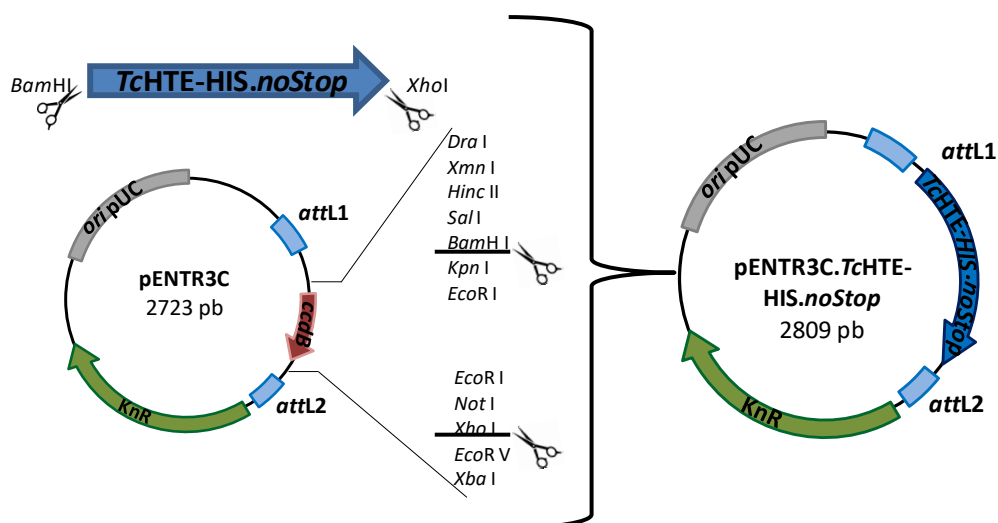
La secuencia codificante de *TcHTE* fue originalmente amplificada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico de la cepa Dm28c disponible en el laboratorio, utilizando los cebadores FP\_*TcHTE* y RP\_*TcHTE*-HIS (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de materiales y métodos). Posteriormente, el producto de PCR purificado y el vector pENTR3c fueron tratados con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I y una vez purificados, los productos de digestión se sometieron a reacción de ligación dando como resultado el vector pENTR3c.*TcHTE*-HIS, que posee la secuencia *TcHTE*-HIS entre los sitios mencionados. Posteriormente se transformaron células de *E. coli* Dh5 $\alpha$  con el vector, y se seleccionaron las células transformadas por sembrado en placas de cultivo conteniendo LB-Agar con el antibiótico de selección kanamicina. El plásmido fue posteriormente

recuperado de las células transformadas, y la construcción se verificó mediante digestión con enzimas de restricción y posterior análisis del tamaño de los fragmentos generados mediante la separación por electroforesis horizontal en geles de agarosa. A partir de dicho vector, la secuencia codificante de *TcHTE* se amplificó por PCR utilizando los cebadores FP\_*TcHTE* y RP\_*TcHTE*-HIS.noStop (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de materiales y métodos), dando como resultado la secuencia codificante de *TcHTE*, sin codón de stop, entre los sitios *Bam*HI y *Xho*I, tal como se muestra en la Figura 24.



**Figura 24.** Esquema de la amplificación de la secuencia *TcHTE*-HIS-noStop a partir del vector pENTR3C.*TcHTE*-HIS. La secuencia *TcHTE*-HIS-noStop se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores FP\_*TcHTE* y RP\_*TcHTE*-HIS.noStop.

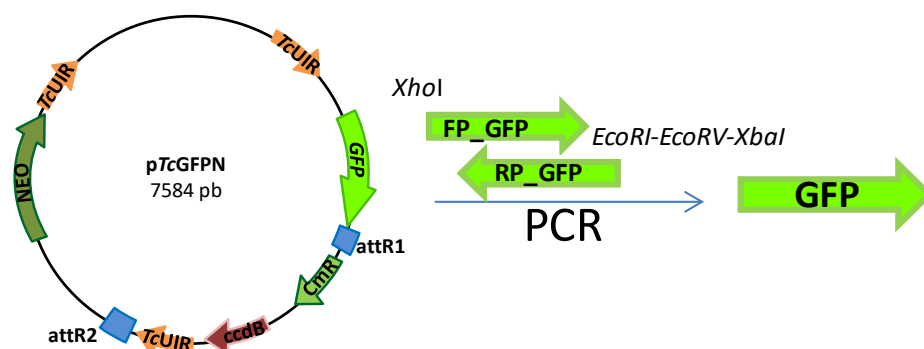
De forma similar al caso anterior, el producto de PCR purificado y el vector pENTR3c fueron tratados con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I y los productos de digestión, se purificaron y se sometieron a reacción de ligación dando como resultado el vector pENTR3c.*TcHTE*-HIS.noStop, que posee la secuencia *TcHTE*-HIS sin el codón de stop entre los sitios mencionados (Figura 25).



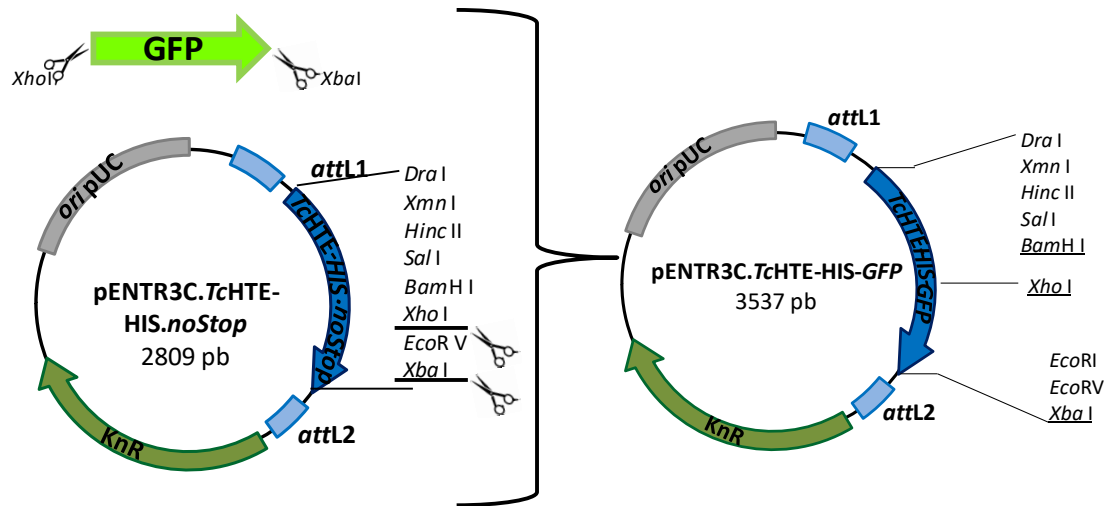
**Figura 25.** Esquema del clonado de la secuencia *TcHTE*-HIS.noStop en el vector pENTR3C. La secuencia *TcHTE*-HIS.noStop amplificada mediante PCR y el vector pENTR3C se trataron con las

enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I, y los productos de digestión se sometieron a la reacción de ligación dando como resultado el vector pENTR3C. *Tc*HTE-HIS.*noStop*.

Posteriormente se transformaron células de *E. coli* Dh5 $\alpha$  con dicho vector, y se seleccionaron las células transformadas por sembrado en placas de cultivo conteniendo LB-Agar con el antibiótico de selección kanamicina. El plásmido fue posteriormente recuperado de las células transformadas, y se verificó la construcción mediante digestión con enzimas de restricción y posterior análisis del tamaño de los fragmentos generados mediante la separación por electroforesis horizontal en geles de agarosa. Por otro lado, utilizando los cebadores FP\_GFP y RP\_GFP (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de materiales y métodos), se amplificó la secuencia codificante de la proteína GFP a partir del vector pTcGFPN disponible en el laboratorio (Figura 26). Posteriormente, tanto el producto de PCR como el vector pENTR3c. *Tc*HTE.HIS.*noStop*, fueron tratados con las enzimas *Xho*I y *Xba*I, y los productos de digestión purificados, se sometieron a reacción de ligación dando como resultado el vector pENTR3c. *Tc*HTE-HIS-GFP (Figura 27). Luego se transformaron células de *E. coli* Dh5 $\alpha$  con el vector, y se seleccionaron las células transformadas por sembrado en placas de cultivo conteniendo LB-Agar con el antibiótico de selección kanamicina. El plásmido fue recuperado de las células transformadas, y la construcción fue verificada mediante digestión con enzimas de restricción y posterior análisis del tamaño de los fragmentos generados mediante la separación por electroforesis horizontal en geles de agarosa.



**Figura 26. Esquema de la amplificación de la secuencia codificante para GFP a partir del vector pTcGFPN.** La secuencia codificante para GFP se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores FP\_GFP y RP\_GFP.



**Figura 27. Esquema del clonado de la secuencia GFP en el vector pENTR3C.TcHTE-HIS.noStop.** La secuencia codificante para GFP amplificada mediante PCR y el vector pENTR3C.TcHTE-HIS.noStop se trataron con las enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI*, y los productos de digestión se sometieron a la reacción de ligación dando como resultado el vector pENTR3C.TcHTE-HIS-GFP.

Las secuencias codificantes para *TcHTE-HIS* y *TcHTE-HIS-GFP* fueron amplificadas por PCR utilizando los cebadores FP\_*TcHTE*, RP\_*TcHTE-HIS* y RP\_*GFP* (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de materiales y métodos) y los productos de amplificación purificados fueron tratados con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* o *BamHI* y *XbaI*, respectivamente, al igual que el vector pRS426M25 según el esquema mostrado en la Figura 28. Los productos de digestión, se sometieron a reacción de ligación dando como resultado los vectores pRS426M25.*TcHTE-HIS* y pRS426M25.*TcHTE-HIS-GFP* (Figura 29). Posteriormente se transformaron células de *E. coli* Dh5 $\alpha$  con dichos vectores, y se seleccionaron las células transformadas mediante el sembrado en placas de cultivo conteniendo LB-Agar con el antibiótico de selección ampicilina. Los plásmidos fueron recuperados de las células transformadas, y las construcciones se verificaron mediante digestión con enzimas de restricción y posterior análisis del tamaño de los fragmentos generados mediante la separación por electroforesis horizontal en geles de agarosa. Estos vectores fueron empleados para el estudio de la proteína *TcHTE* en levaduras.

Además, las secuencias de *TcHTE-HIS* y *TcHTE-HIS-GFP* fueron clonadas en el vector p*TcINDEX-GW* [Alonso, *et al.*, 2014] empleando el sistema Gateway, para su expresión en *T. cruzi*. Dicho sistema realiza recombinación homóloga entre los sitios *attL* y *attR* de los vectores de origen y destino respectivamente, utilizando la enzima Clonasa<sup>R</sup>

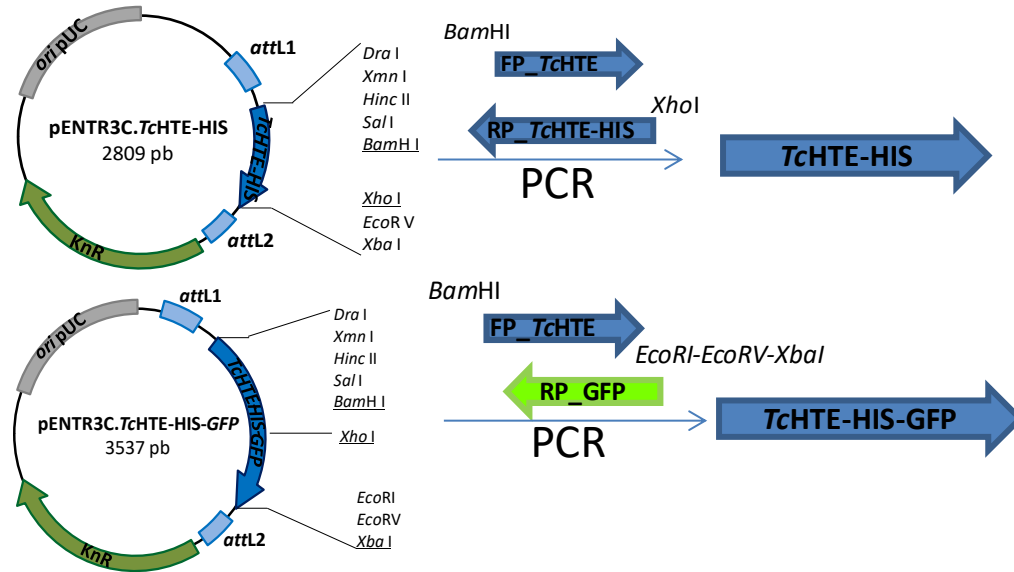


Figura 28. Esquema del la amplificación de la secuencia TcHTE.HIS y TcHTE-HIS-GFP a partir de los vectores pENTR3C.TcHTE-HIS y pENTR3C.TcHTE-HIS-GFP. La secuencia TcHT-HIS se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores FP\_TcHTE y RP\_TcHTE-HIS. La secuencia TcHT-HIS-GFP se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores FP\_TcHTE y RP\_GFP.

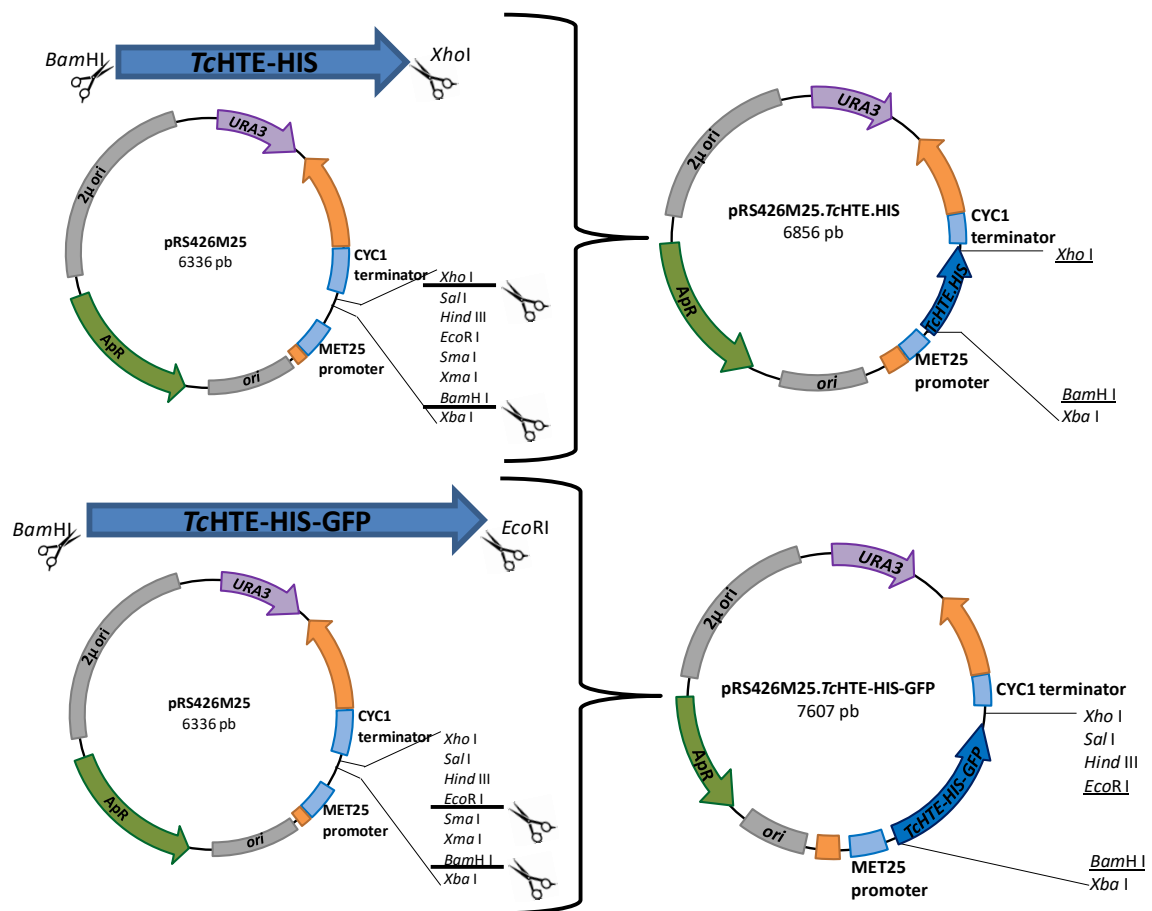
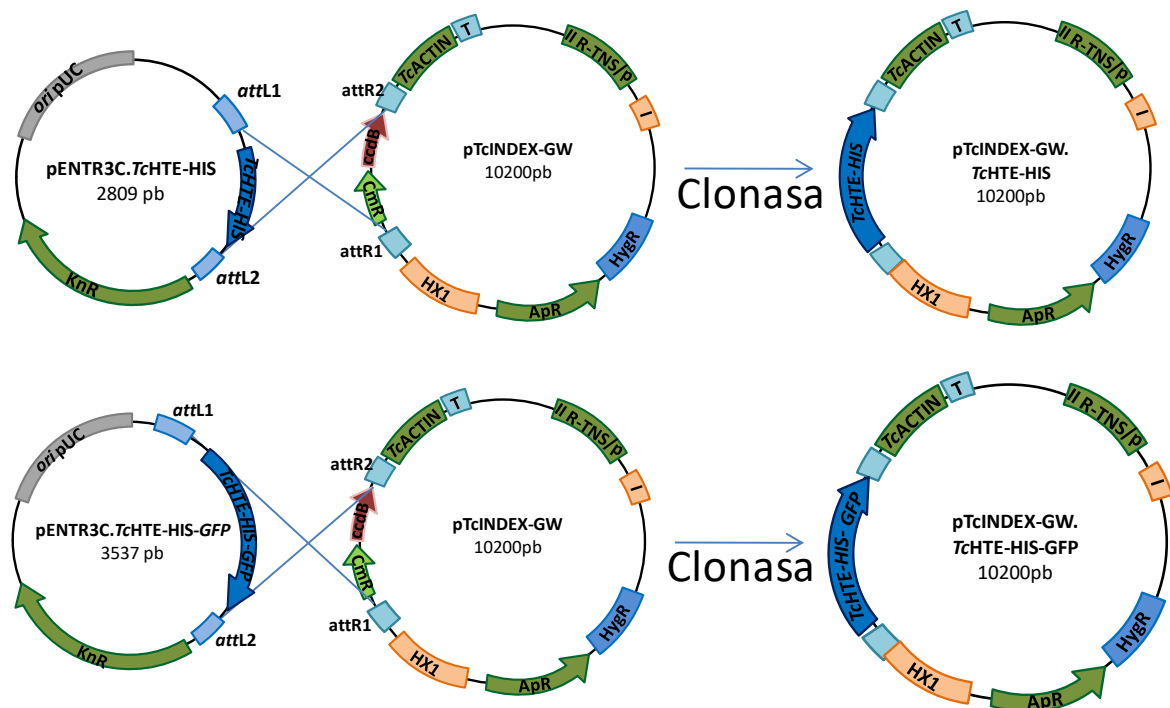


Figura 29. Esquema del clonado de las secuencias TcHTE-HIS y TcHTE-HIS-GFP en el vector pRS426M25. La secuencia TcHTE-HIS y TcHTE-HIS-GFP amplificadas mediante PCR y el vector

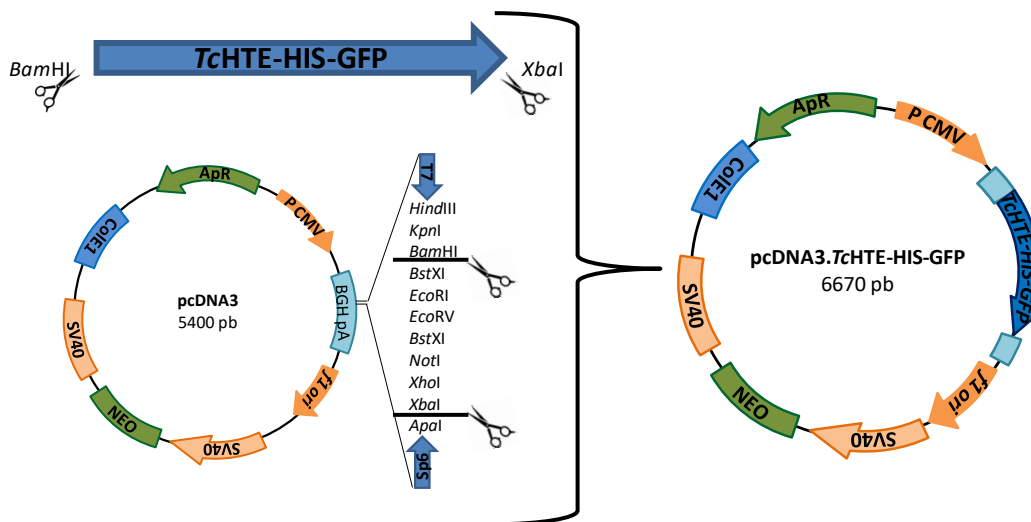
pRS426M25 se trataron con las enzimas de restricción indicadas y los productos de digestión se sometieron a la reacción de ligación dando como resultado los vectores pRS426M25.*TcHTE-HIS* y pRS426M25.*TcHTE-HIS-GFP*.

de Invitrogen (como se detalla en la sección IV.5.4 de Materiales y Métodos). Como vectores de origen se utilizaron los vectores pENTR3c.*TcHTE-HIS* y pENTR3c.*TcHTE-HIS-GFP*, y el vector p*TcINDEX-GW* fue utilizado como vector destino, dando como resultado los vectores p*TcINDEX-GW.TcHTE-HIS* y p*TcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP* (Figura 30). Dichos plásmidos se utilizaron para transformar células de *E. coli* Dh5 $\alpha$ , y se seleccionaron las células transformadas por sembrado en placas de cultivo conteniendo LB-Agar con el antibiótico de selección ampicilina. Los plásmidos fueron recuperados de las células transformadas, y se verificaron las construcciones mediante digestión con enzimas de restricción y posterior análisis del tamaño de los fragmentos generados mediante la separación por electroforesis horizontal en geles de agarosa. Además se corroboró las secuencias codificantes para las proteínas *TcHTE-HIS* y *TcHTE-HIS-GFP* mediante secuenciación (sección IV.5.10 de Materiales y Métodos).



**Figura 30.** Esquema del clonado de las secuencias *TcHTE-HIS* y *TcHTE-HIS-GFP* en el vector p*TcINDEX-GW*. La secuencia *TcHTE-HIS* y *TcHTE-HIS-GFP* se clonan por recombinación homóloga por medio de la enzima Clonasa<sup>R</sup> (Invitrogen) entre los sitios attL de los vectores pENTR3C.*TcHTE-HIS* y pENTR3C.*TcHTE-HIS-GFP* y los sitios attR del vector p*TcINDEX-GW*, dando como resultado los vectores p*TcINDEX-GW.TcHTE-HIS* y p*TcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP*.

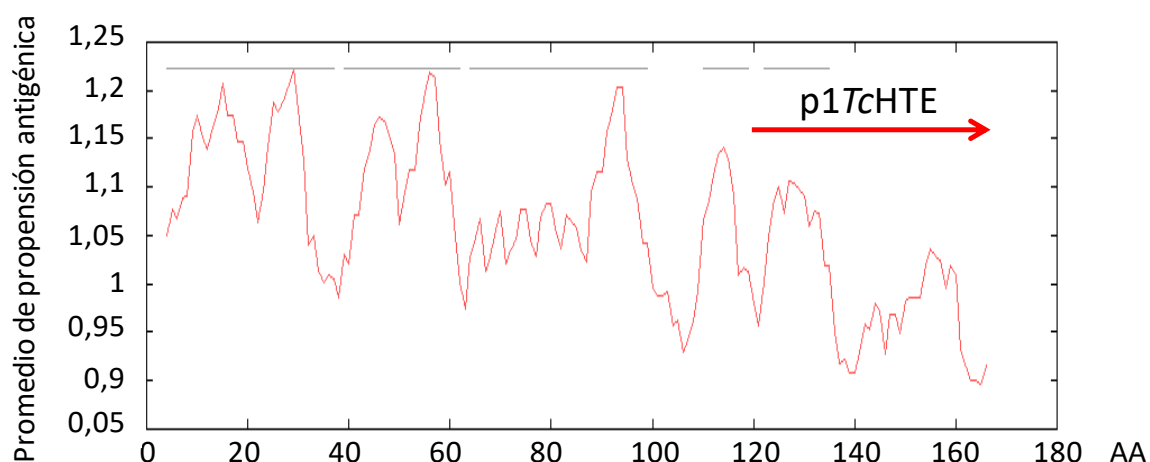
Posteriormente, la secuencia *TcHTE-HIS-GFP* fue clonada en el vector pcDNA3 para su expresión en células HEK293-T entre los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I. La secuencia codificante de *TcHTE-HIS-GFP* fue amplificada por PCR utilizando los cebadores FP\_*TcHTE* y RP\_*GFP* (Tabla 2 de la sección IV.5.2 de Materiales y Métodos), dando como resultado la secuencia codificante de *TcHTE-HIS-GFP* entre los sitios *Bam*HI y *Eco*RI, *Eco*RV y *Xba*I, tal como se muestra en la Figura 28. El producto de PCR purificado y el vector pcDNA3 fueron tratados con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I y una vez purificados los productos de digestión, se sometieron a reacción de ligación dando como resultado el vector pcDNA3.*TcHTE-HIS-GFP*, que posee la secuencia *TcHTE-HIS-GFP* entre los sitios mencionados (Figura 31). Posteriormente se transformaron células de *E. coli* Dh5 $\alpha$  con el vector, y se seleccionaron las células transformadas por sembrado en placas de cultivo conteniendo LB-Agar con el antibiótico de selección ampicilina. El plásmido fue recuperado de las células transformadas, y se verificó la construcción mediante digestión con enzimas de restricción y posterior análisis del tamaño de los fragmentos generados mediante la separación por electroforesis horizontal en geles de agarosa. Este vector fue empleado para el estudio de la proteína *TcHTE* en células HEK-293T.



**Figura 31. Esquema del clonado de las secuencias *TcHTE-HIS-GFP* en el vector pcDNA3.** La secuencia *TcHTE-HIS-GFP* amplificada mediante PCR y el vector pcDNA3 se trataron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I y los productos de digestión se sometieron a la reacción de ligación dando como resultado el vector pcDNA3.*TcHTE-HIS-GFP*.

## V.2.4. Diseño y obtención de anticuerpos policlonales de conejo específicos para el reconocimiento de TcHTE

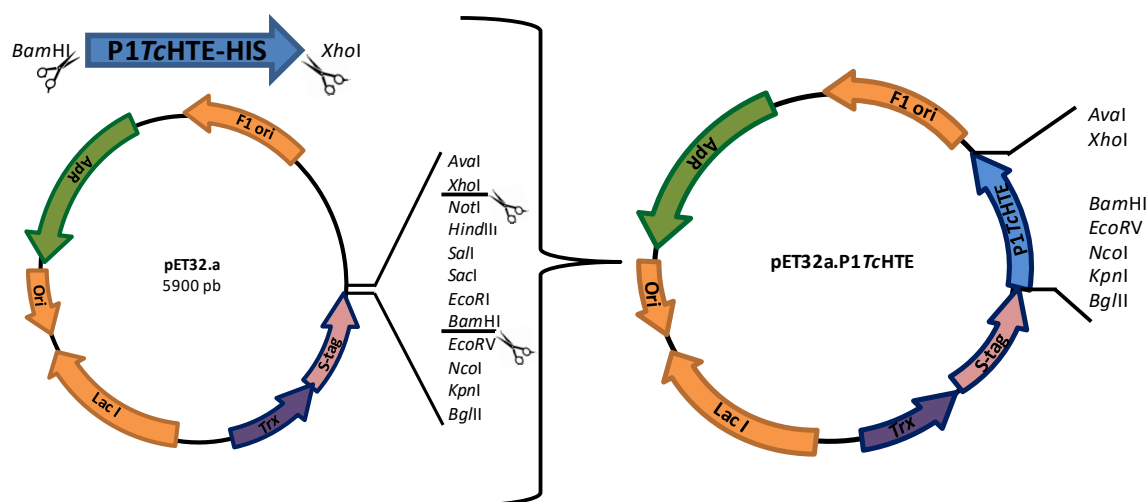
Hasta la fecha, se han publicado los resultados de estudios realizados sobre las proteínas de la familia HRG de *C. elegans*, *Leishmania spp.* y *T. brucei*, donde los ensayos de detección y localización celular de estas proteínas se realizaron utilizando proteínas recombinantes con una marca en el extremo C-terminal para su reconocimiento [Cabello-Donayre, *et al.*, 2016 - Huynh, *et al.*, 2012 - Rajagopal, *et al.*, 2008 - Renberg, *et al.*, 2015 - Yuan, *et al.*, 2012]. Con el fin de estudiar la proteína TcHTE endógena en *T. cruzi* y considerando sus características como posible proteína integral de membrana, se siguió la estrategia ya utilizada en el laboratorio para obtener los anticuerpos policlonales específicos [Menendez Bravo, 2011 - Merli, 2016b]. Para ello, la secuencia proteica de TcHTE se analizó utilizando los programas TMHMM (ExpASY) y predicted antigenic peptides (de la Universidad Complutense de Madrid, <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.html>) para determinar las regiones de mayor antigenicidad y verificar si estas corresponden o no a las regiones que se predicen como hélices transmembrana. En la Figura 32 se muestran los resultados obtenidos. En función de estos análisis, se seleccionó la región C-terminal de TcHTE (los últimos 51 aminoácidos) que denominamos P1TcHTE para ser utilizada como determinante antigénico que, si bien no corresponde a las regiones de mayor antigenicidad de la proteína, cumple con los requisitos de ser una secuencia antigénica y de no pertenecer a la región transmembrana.



**Figura 32. Predicción bioinformática de regiones antigénicas de la proteína TcHTE.** Análisis de regiones antigénicas realizada con el programa Preditop [Kolaskar y Tongaonkar, 1990]. Se señala

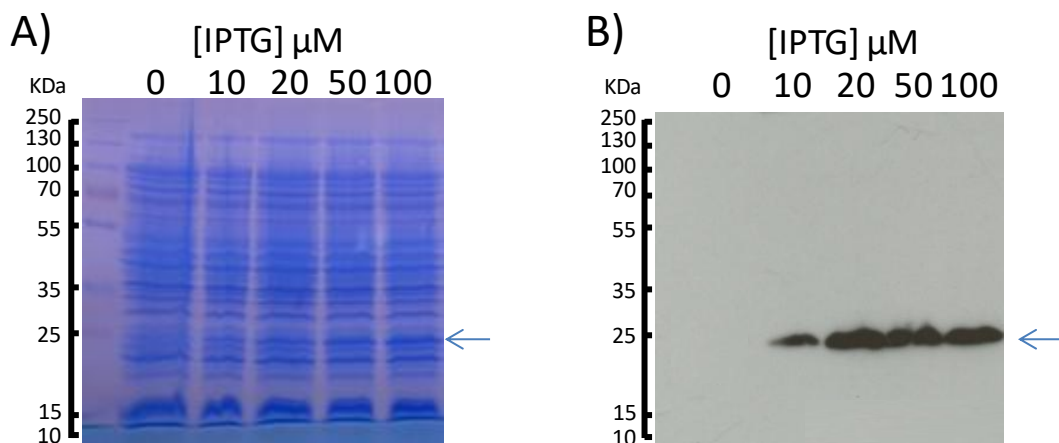
el fragmento de TcHTE (desde el AA 120 hasta el extremo C-terminal) designado P1TcHTE que fue utilizado para la producción de anticuerpos específicos.

La secuencia codificante para P1TcHTE-HIS fue amplificada mediante PCR como se detalla en la sección IV.5.3.5 de Materiales y Métodos utilizando como molde la secuencia el plásmido pENTR3c.TcHTE. El fragmento amplificado fue clonado en el vector de expresión pET32a que permite su expresión como fusión a TRX-6HIS-Stag (tioredoxina, seguido de 6 hisitinas y la secuencia S) en *E. coli*, generando el plásmido pET32a.P1TcHTE-HIS (Figura 33).



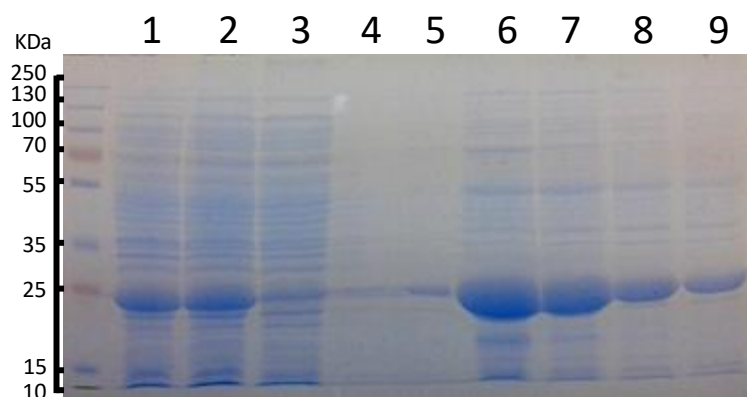
**Figura 33. Esquema del clonaje de las secuencias P1TcHTE en el vector pET32a.** La secuencia P1TcHTE-HIS amplificada mediante PCR y el vector pET32a se trataron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I y los productos de digestión se sometieron a la reacción de ligación dando como resultado el vector pET32a.P1TcHTE-HIS.

Las condiciones para la expresión y posterior purificación de la proteína de fusión TRX-6HIS-Stag-P1TcHTE-HIS se optimizaron a partir de cultivos de cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con el plásmido pET32a.P1TcHTE-HIS como se detalla en las secciones IV.6.4 y IV.6.5 de Materiales y Métodos. La expresión de TRX-6HIS-Stag-P1TcHTE-HIS se verificó a partir de extractos celulares totales resueltos por electroforesis vertical en geles de acrilamida desnaturizantes y posterior tinción con azul de Coomassie o mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos anti-His (Figura 34). La proteína de fusión TRX-6HIS-Stag-P1TcHTE-HIS se purificó por cromatografía de afinidad utilizando resina de Ni-NTA (sección IV.6.4 de Materiales y Métodos). Las diferentes fracciones de la purificación se resolvieron por electroforesis vertical en geles de acrilamida desnaturizantes y posterior tinción con azul de Coomassie como se muestran



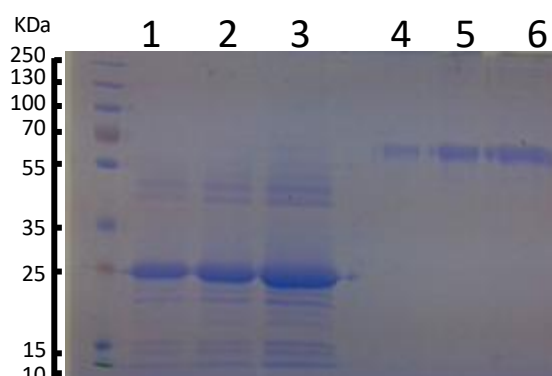
**Figura 34. Inducción de la expresión de la proteína de fusión TRX-6HIS-STag-P17cHTE-HIS.** (A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las muestras de cultivo de *E. coli* transformadas con el plásmido pET32a.P17cHTE donde la expresión de la proteína de fusión fue inducida con 0, 10, 20, 50 o 100 mM de IPTG. (B) Western blot utilizando anticuerpos anti-HIS para el reconocimiento de la proteína de fusión.

en la Figura 35. Debido a la presencia de proteínas de tamaños distintos al esperado para la proteína de fusión, procedimos a la su recuperación por electroelución a partir del gel de acrilamida. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 36, no se logró eliminar por completo las bandas de distintos pesos moleculares aún después del proceso de electroelución y decidimos, de igual manera, utilizar a esta muestra purificada de TRX-6HIS-STag-P17cHTE para la obtención de anticuerpos policlonales específicos de conejo, siguiendo el protocolo descrito en la sección IV.6.6 de Materiales y Métodos. Es importante mencionar que la manipulación de animales y la obtención de sueros fueron realizadas por el personal del servicio del Bioterio de la FCByF UNR.



**Figura 35. Purificación de la proteína de fusión TRX-6HIS-STag-P17cHTE-HIS mediante cromatografía de afinidad con resina Ni-NTA.** SDS-PAGE de las muestras de los pasos de purificación con resina de Ni-NTA de TRX-6HIS-STag-P17cHTE-HIS, teñido con azul de Coomassie.

Calle 1: Extracto total de *E. coli* BL21(DE3)pLysS' que sobreexpresa la proteína de fusión. Calle 2: Fracción celular soluble. Calle 3: Fracción soluble luego de la purificación por resina de Ni-NTA. Calle 4: Fracción del sexto lavado. Calle 5 a 9: Fracciones de elución 1 a 5, donde se recupera la proteína de interés.



**Figura 36. SDS-PAGE de la proteína de fusión TRX-6HIS-STag-P1TcHTE-HIS recuperada luego del proceso de electroelución.** SDS-PAGE, teñido con Coomassie, donde pueden observarse bandas de diversos pesos moleculares en las muestras recuperadas luego de la electroelución. Calle 1: 2  $\mu$ l del electroeluido. Calle 2: 5  $\mu$ l del electroeluido. Calle 3: 10  $\mu$ l del electroeluido. Calle 4: 1  $\mu$ g de BSA. Calle 5: 2  $\mu$ g de BSA. Calle 6: 4  $\mu$ g de BSA.

La especificidad del suero inmune obtenido fue validada mediante ensayos de Western blot optimizando las condiciones para la detección tanto de P1TcHTE como de TcHTE como se muestra en la Figura 44 de la sección V.4.1.2 de Resultados.

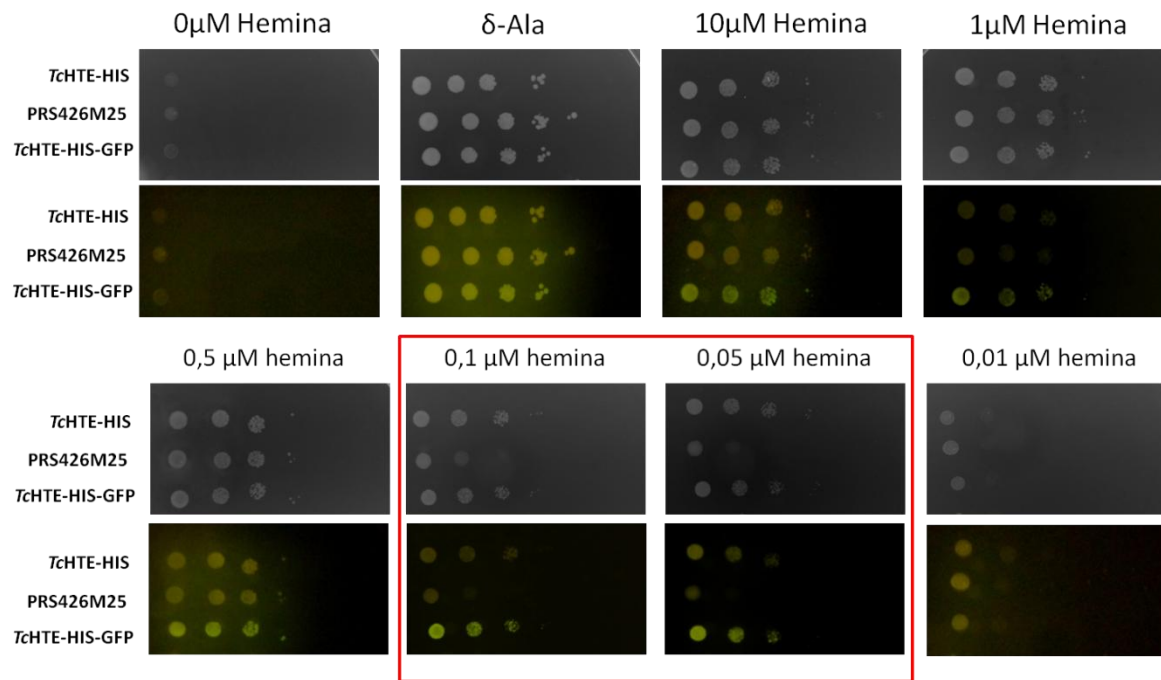
### **V.3. Utilización de *Saccharomyces cerevisiae* como herramienta para el estudio de TcHTE**

Las células de *S. cerevisiae hem1Δ* carecen de la enzima ácido  $\delta$ -aminolevulínico sintasa, que cataliza la formación del primer intermediario de la ruta de síntesis de hemo (el ácido  $\delta$ -aminolevulínico,  $\delta$ -ALA) en la mitocondria [Crisp, *et al.*, 2003] (Figura 2). Para compensar esta deficiencia las levaduras deben incorporar hemo del entorno, o bien, alguno de los intermediarios de la vía de síntesis. Debido a que *S. cerevisiae* es altamente deficiente en la utilización de hemo exógeno, incluidas las mutantes *hem1Δ*, la expresión de un transportador de hemo recombinante le brindaría una ventaja de crecimiento en medios en los que la fuente de hemo sea limitante, comparado con aquellas que no expresen el transportador.

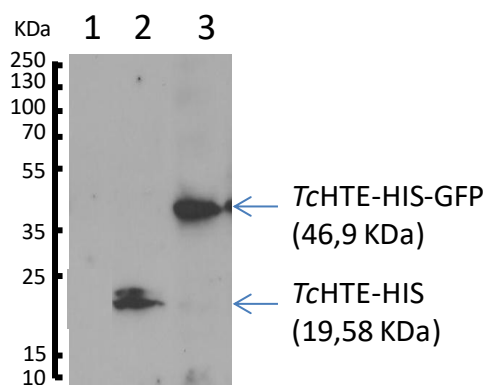
### **V.3.1. La expresión de la proteína *TcHTE* en *Saccharomyces cerevisiae hem1Δ*, le permite crecer en medios con concentraciones restrictivas de hemo**

Para corroborar la participación de *TcHTE* en el transporte de hemo nos propusimos realizar ensayos de complementación heteróloga utilizando las levaduras *S. cerevisiae hem1Δ* similares a los reportados para el estudio de las proteínas *CeHRG-4* [Yuan, *et al.*, 2012] y *LaHR1* [Huynh, *et al.*, 2012].

Para ello, las células *hem1Δ* se transformaron con los plásmidos pRS426M25.*TcHTE*-HIS o pRS426M25.*TcHTE*-HIS-GFP, y con el vector pRS426M25 sin inserto como vector control (sección IV.3.2.2 de Materiales y Métodos). Luego, las células transformantes se seleccionaron en el medio sintético selectivo SCDO Glu-Ura-Leu suplementado con  $\delta$ -ALA (el primer intermediario de la vía de síntesis). Posteriormente, se procedió a realizar ensayos de complementación en placa sembrado diluciones seriadas de un cultivo de estas células crecido a saturación durante la noche (ON), sobre el mismo medio selectivo pero suplementado con diferentes concentraciones de hemina (0,01 a 1  $\mu$ M), y otra suplementada con  $\delta$ -ALA como control positivo. Como puede observarse en la Figura 37 las levaduras *hem1Δ* transformadas con el vector pRS426M25 (vector control) no crecieron en las placas que contenían bajas concentraciones de hemina (menores a 0,1  $\mu$ M hemina), mientras que las levaduras transformadas con los vectores pRS426M25.*TcHTE*-HIS y pRS426M25.*TcHTE*-HIS-GFP fueron capaces de crecer en el medio selectivo suplementado con concentraciones de hemina menores a 0,1  $\mu$ M. La presencia de la proteína *TcHTE* en las levaduras utilizadas para estos ensayos se verificó mediante ensayos de Western blot, a partir de extractos proteicos totales, cuyos resultados se muestran en la Figura 38. También se realizaron ensayos de complementación en placa sembrado diluciones seriadas de un cultivo ON de estas células sobre el medio selectivo SCD-Ura-Leu, suplementado con diferentes concentraciones de hemina (5 a 20  $\mu$ M), donde la fuente de carbono utilizada fue glicerol-etanol en vez de glucosa. Con este ensayo pudo determinarse que la expresión tanto de *TcHTE*-HIS como de *TcHTE*-HIS-GFP permitió la recuperación de la función respiratoria cuando las células fueron desafiadas a crecer utilizando una fuente de carbono no

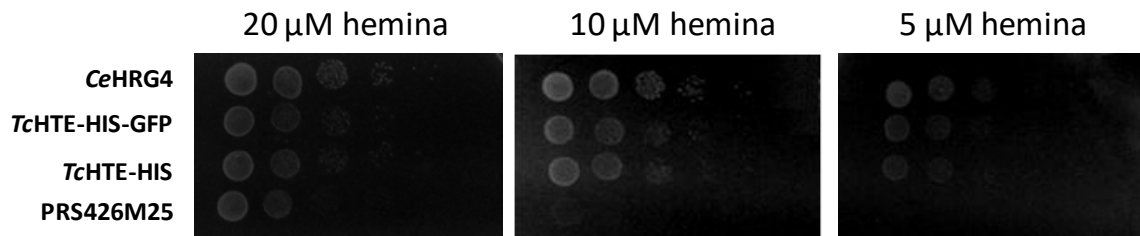


**Figura 37.** La proteína *TcHTE* permite el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae hem1Δ* en medio selectivo restrictivo para hemo. Ensayo de complementación en placa utilizando *S. cerevisiae hem1Δ* transformadas con los vectores pRS426M25.*TcHTE*-HIS (*TcHTE*-HIS), pRS426M25 (Control) o pRS426M25.*TcHTE*-HIS-GFP (*TcHTE*-HIS-GFP). 7  $\mu$ l de diluciones seriadas 1/10 desde una dilución inicial de  $DO^{600} = 1$  fueron sembrados en medio sólido SCDO-Ura-Leu con 20 mg/ml metionina, con glucosa como fuente de carbono (Glu) y diferentes cantidades de hemina. En el panel superior se muestran las imágenes obtenidas bajo iluminación con luz visible. En el panel inferior se muestran las imágenes obtenidas bajo iluminación ultravioleta, donde se aprecia la fluorescencia de la proteína *TcHTE*-HIS-GFP.



**Figura 38.** Verificación de la expresión de la proteína *TcHTE* en *Saccharomyces cerevisiae hem1Δ*. Western blot utilizando anticuerpos anti-HIS para el reconocimiento de la proteína de fusión *TcHTE*-HIS y *TcHTE*-HIS-GFP en extractos proteicos totales de *S. cerevisiae* transformadas con diferentes vectores. Calle1: pRS426M25 (vector control). Calle2: pRS426M25.*TcHTE*-HIS. Calle 3: pRS426M25.*TcHTE*-HIS-GFP

fermentable como glicerol-etanol suplementada con hemina como se muestra en la (Figura 39), indicando que el hemo es incorporado por las células y transportado hasta la mitocondria, para cumplir su función en la cadena respiratoria.



**Figura 39. La proteína TcHTE permite la recuperación de la capacidad respiratoria de las células *Saccharomyces cerevisiae hem1Δ* en medio selectivo restrictivo para hemo.** Ensayo de complementación en placa utilizando *S. cerevisiae hem1Δ* transformadas con los vectores pRS426M25.CeHRG4 (*CeHRG4*), pRS426M25.*TcHTE-HIS* (*TcHTE-HIS*), pRS426M25.*TcHTE-HIS-GFP* (*TcHTE-HIS-GFP*) y pRS426M25 (Control). 7  $\mu$ l de diluciones seriadas 1/10 desde una dilución inicial de  $DO^{600} = 1$  fue sembrada en medio sólido SCDO-Ura-Leu con 20 mg/ml metionina, con glicerol-etanol como fuente de carbono no fermentable y diferentes cantidades de hemina.

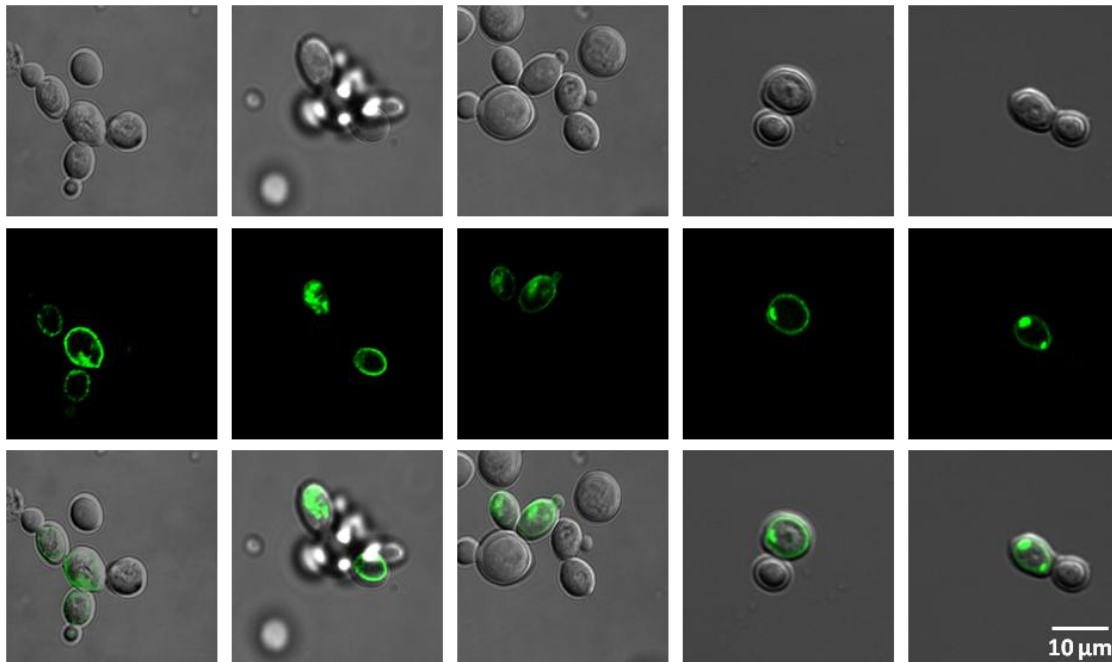
Estos resultados mostraron que las levaduras que contienen las proteínas recombinantes de *T. cruzi*, *TcHTE-HIS* o *TcHTE-HIS-GFP* necesitaron 10 veces menos cantidad de hemina en el medio de cultivo para poder desarrollarse en comparación con las levaduras control. Además, ambas construcciones resultaron funcionales, lo cual indicaría que las proteínas recombinantes adoptaron un plegamiento adecuado y que la fusión C-terminal a GFP no afectó la actividad de *TcHTE*. Resultados similares fueron reportados para las proteínas recombinantes *TbHRG*, *LHR1* y *CeHRG-4* [Cabello-Donayre, *et al.*, 2016 - Huynh, *et al.*, 2012 - Renberg, *et al.*, 2015]. En resumen, estos resultados nos permiten inferir que la proteína *TcHTE* es capaz de facilitar el transporte de hemo en levaduras *hem1Δ*, permitiendo su crecimiento en medios restrictivos de hemo, de ahí su denominación como proteína de *T. cruzi* facilitadora del transporte de hemo (*TcHTE Trypanosoma cruzi Heme Transport Enhancer*).

### V.3.2. La proteína *TcHTE* se localiza en la membrana plasmática de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Una vez establecido que la proteína *TcHTE-HIS-GFP* recombinante fue funcional en *S. cerevisiae* y en virtud de sus propiedades fluorescentes, decidimos utilizarla para estudiar su localización en este organismo. Para ello, las mismas células transformantes

que se describieron en el apartado anterior fueron crecidas en medio sintético selectivo restrictivo para hemo (SCDO Glu-Ura-Leu, 0,1  $\mu$ M hemo), colectadas, lavadas, fijadas y montadas para su análisis por microscopía confocal de fluorescencia (como se describe en la sección IV.7.3 de Materiales y Métodos). Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes se muestran en la Figura 40 donde, en primer lugar, puede señalarse que la señal fluorescente correspondiente a GFP no se aprecia en todas las células, lo que indicaría que no todas las células transformadas expresarían la proteína de fusión recombinante. Sin embargo, en aquellas donde se manifiesta la señal fluorescente verde, ésta se localizó en la membrana plasmática de las células de levadura. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas para las proteínas *CeHRG-4* y *LaHR1* [Huynh, *et al.*, 2012 - Yuan, *et al.*, 2012]. En algunas células también se observó la señal perteneciente a GFP en algunos compartimentos intracelulares, pudiendo tratarse de endosomas, así como fue reportado para *TbHRG* y *LmHR1* [Cabello-Donayre, *et al.*, 2016]. Se ha descrito que esta doble localización de las proteínas en levaduras, podría deberse a la utilización de diferentes fuentes de porfirinas. Mientras que la localización en la membrana plasmática cumpliría su rol en la incorporación de hemo desde el entorno, su localización en endosomas respondería a la utilización del hemo proveniente de la degradación de la hemoglobina. Sin embargo, en nuestro caso se deberían realizar experimentos complementarios para verificar la localización intracelular y cuál podría ser su función.

En resumen, los resultados de este ensayo muestran claramente que *TcHTE* recombinante se localiza en la membrana plasmática de las levaduras, así como ha sido reportado para sus proteínas homólogas, y esta localización concuerda con la esperada para proteínas cuya función se encuentre involucrada en el transporte de metabolitos hacia el interior celular.



**Figura 40.** *TcHTE-HIS-GFP* se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática en *Saccharomyces cerevisiae*. Imágenes de microscopía confocal de células de *S. cerevisiae hem1Δ* transformadas con el vector p4RS26M25.*TcHTE-HIS-GFP* crecidas durante la noche (ON) en medio SCDO-Ura-Leu, 20 mg/l metionina, 2% p/v glucosa y 0,1 μM hemina. Las imágenes son representativas de diferentes campos de tres experimentos independientes.

#### **V.4. Estudio de *TcHTE* en *Trypanosoma cruzi***

Con el objetivo de comprender la función que desarrolla la proteína *TcHTE* en el proceso de incorporación de hemo por *T. cruzi*, nos propusimos diferentes aproximaciones experimentales que se desarrollan a continuación.

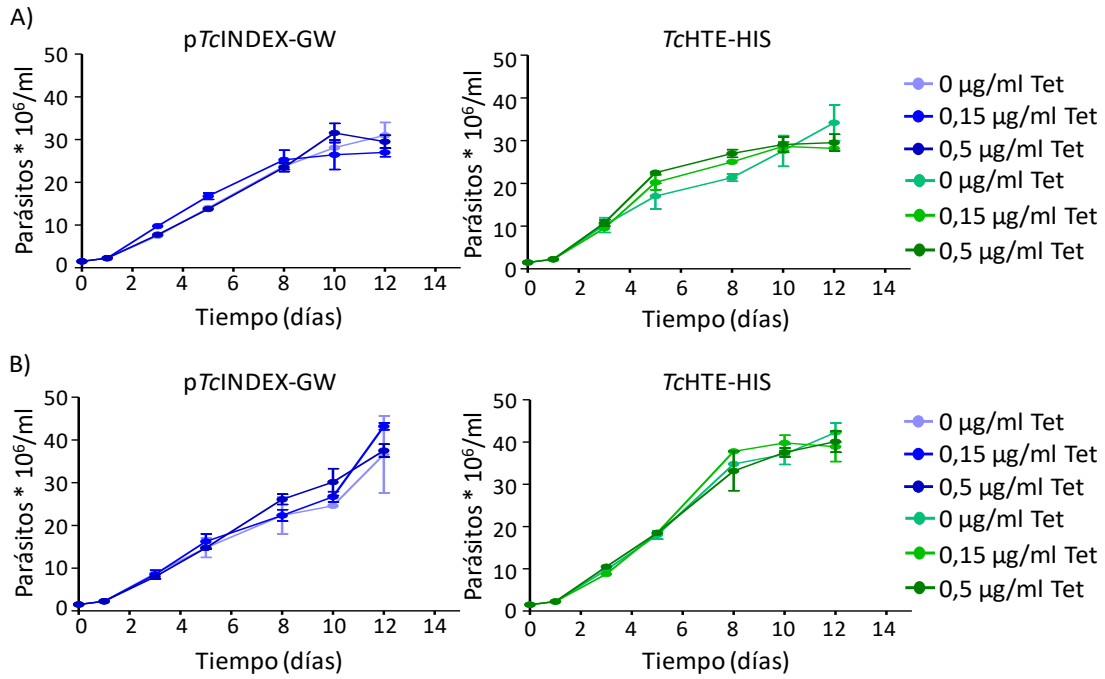
##### **V.4.1 Estudio de la proteína *TcHTE* recombinante en *Trypanosoma cruzi***

Una de las estrategias empleadas para el estudio de *TcHTE* en *T. cruzi*, fue la expresión de las proteínas recombinantes *TcHTE-HIS* y *TcHTE-HIS-GFP*, con el fin de evaluar los efectos en el crecimiento y analizar la localización de la proteína en el parásito.

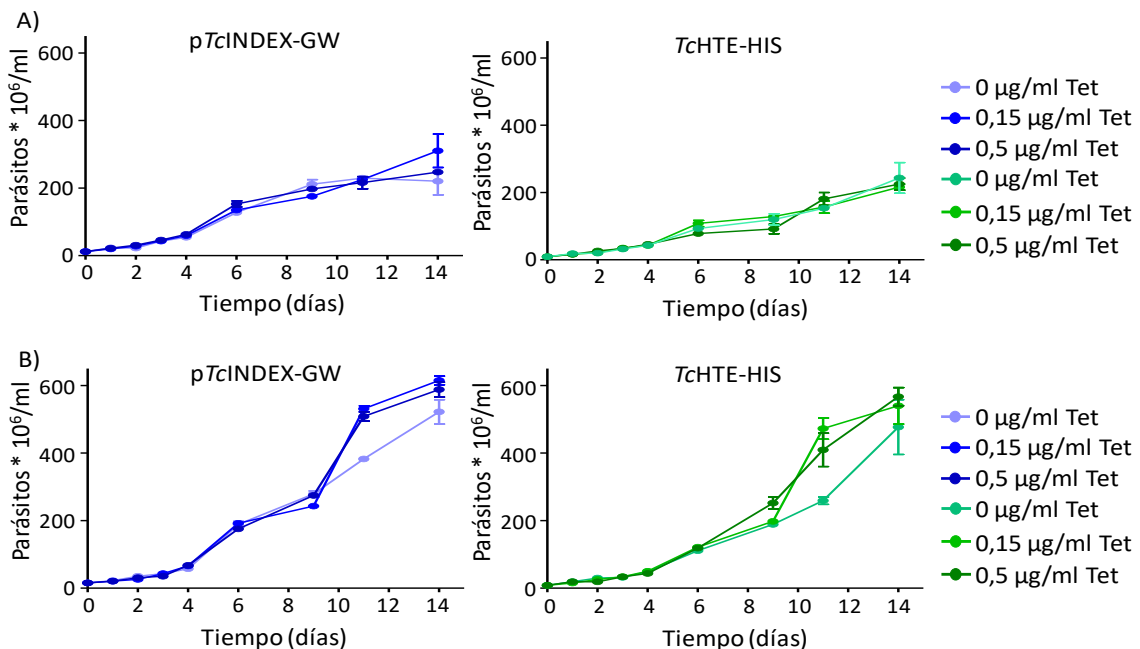
##### **V.4.1.2 Obtención de parásitos transfectantes**

Para estudiar el rol de *TcHTE* en *T. cruzi* y en virtud de la dificultad experimental para obtener cepas mutantes con deleciones del gen correspondiente en este organismo,

nos propusimos analizar el efecto de la sobreexpresión de la proteína TcHTE recombinante en el parásito. Para ello se procedió a transfectar epimastigotes de la cepa DM28c portadores del plásmido pLEW13, con los plásmidos pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS y pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP (como se detalla en la sección IV.3.4.3 de Materiales y Métodos). El protocolo de transfección utilizado rutinariamente en el laboratorio indica la selección de los epimastigotes transfectantes en medio LIT-10% SFB suplementado con 20  $\mu\text{M}$  hemina además del antibiótico correspondiente (en este caso G-418 para la selección del vector pLEW13 y Higromicina B, para la selección de los vectores derivados de pTcINDEX-GW). Luego de varios intentos sin obtener resultados positivos, se evaluó reducir a 5  $\mu\text{M}$  la concentración de hemina en el medio de cultivo utilizado para realizar la selección post electroporación y, de esta manera, se logró obtener parásitos transfectantes estables portadores de los plásmidos pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS y pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP. En los plásmidos pTcINDEX-GW el control de la transcripción de los genes recombinantes se encuentra bajo el promotor de la polimerasa T7 que se activa con el agregado de tetraciclina al medio de cultivo [Alonso, *et al.*, 2014 - Taylor y Kelly, 2006]. Para confirmar la correcta regulación del sistema de expresión se realizaron curvas de crecimiento de los epimastigotes portadores del vector pTcINDEX-GW (vector control) y del vector pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS con el agregado de diferentes cantidades de tetraciclina (0 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) en medio LIT-10% SFB sin hemina o suplementado con 5  $\mu\text{M}$  hemina, en dos esquemas de cultivo diferentes. En uno de ellos (curva de crecimiento continua), el medio de cultivo se inoculó con  $2 \times 10^6$  parásitos por ml y se monitoreó el crecimiento de los epimastigotes hasta alcanzar la fase estacionaria (Figura 41). En el otro, se inocularon  $2 \times 10^6$  parásitos por ml de medio de cultivo y se los mantuvo en fase exponencial de crecimiento mediante dilución periódica en medio fresco cada 2 días. En ambos casos el crecimiento de los epimastigotes se evaluó periódicamente mediante el recuento de los mismos en cámara de Neubauer (Figura 42). Como se observa claramente en las Figuras 41 y 42, el agregado de tetraciclina no afectó el crecimiento de los epimastigotes transfectantes. La presencia de la proteína recombinante se evaluó por ensayos de Western blot (utilizando anticuerpos anti-HIS, que permite visualizar solo la proteína recombinante) sobre extractos celulares totales de epimastigotes crecidos en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu\text{M}$  hemina, utilizando solución de lisis 8 M Urea descrita en la sección IV.6.1 de Materiales y Métodos.



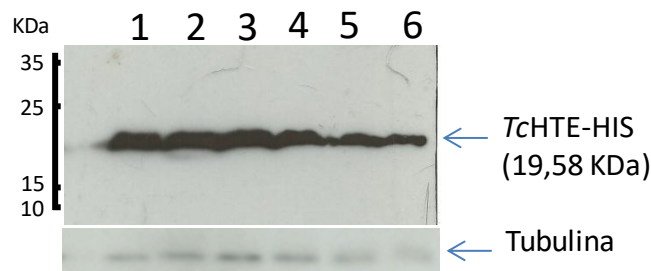
**Figura 41.** La inducción de la expresión de la proteína *TcHTE-HIS* recombinante no afecta el crecimiento de epimastigotes mantenidos a baja concentración de hemina. Curva de crecimiento de epimastigotes Dm28c transfectados con el vector p*TcINDEX-GW* (p*TcINDEX-GW*) y p*TcINDEX-GW.TcHTE-HIS* (*TcHTE-HIS*) luego del agregado de 0, 0,15 o 0,5 µg/ml tetraciclina (Tet) al día 0 para inducir la expresión de la proteína recombinante. Los parásitos fueron mantenidos en LIT-10% SFB suplementado con 0 (A) y 5 (B) µM hemina durante 12 días. Los datos son expresados como el promedio ± DS de dos replicas independientes de cada condición.



**Figura 42.** La inducción de la expresión de la proteína *TcHTE-HIS* recombinante no afecta el crecimiento de epimastigotes mantenidos a baja concentración de hemina. Curva de crecimiento de epimastigotes Dm28c transfectados con el vector p*TcINDEX-GW* (p*TcINDEX-GW*) y p*TcINDEX-GW.TcHTE-HIS* (*TcHTE-HIS*) inducidos con 0, 0,15 o 0,5 µg/ml tetraciclina (Tet) al día 0.

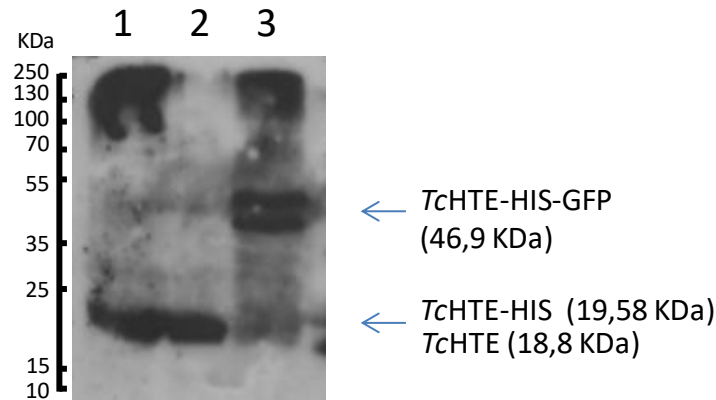
Los parásitos fueron mantenidos en fase exponencial de crecimiento por dilución periódica al medio cada dos días en medio LIT-10% SFB suplementado con 0 (A) y 5 (B)  $\mu$ M hemina durante 14 días. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  DS de dos replicas independientes de cada condición.

Dichos ensayos no mostraron diferencia en la intensidad de las bandas correspondientes a *TcHTE*-HIS frente al agregado de tetraciclina (Figura 43).



**Figura 43.** La expresión de la proteína recombinante *TcHTE* no responde al sistema de regulación exógeno en epimastigotes transfectados con el vector *pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS*. Ensayo de Western blot utilizando anticuerpos anti-HIS para el reconocimiento de la proteína de fusión *TcHTE*-HIS en extractos proteicos totales de epimastigotes Dm28c transfectantes con el vector *pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS*, tratados con diferentes cantidades de tetraciclina (Tet). Calle1: 0  $\mu$ g/ml Tet. Calle2: 0,1  $\mu$ g/ml Tet. Calle 3: 0,15  $\mu$ g/ml Tet. Calle 4: 0,25  $\mu$ g/ml Tet. Calle 5: 0,4  $\mu$ g/ml Tet. Calle 6: 0,5  $\mu$ g/ml Tet. Se utilizó anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (don TAT-1) como control de carga de los extractos totales.

Por otro lado, la expresión de la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP puede ser detectada mediante observación bajo microscopía de fluorescencia. En una primera inspección pudimos detectar la señal de fluorescencia verde correspondiente a la GFP en los epimastigotes que no fueron tratados con tetraciclina. La presencia *TcHTE* (tanto endógena como recombinante) fue evaluada mediante ensayos de Western blot utilizando los anticuerpos específicos anti-P1*TcHTE* desarrollados durante este trabajo de Tesis (sección IV.6.6 de Materiales y Métodos). En la Figura 44 se muestra la detección de las proteínas *TcHTE* endógena y las proteínas recombinantes *TcHTE*-HIS y *TcHTE*-HIS-GFP en extractos totales de epimastigotes crecidos en medio LIT-10% SFB 5  $\mu$ M hemina. Resulta interesante remarcar que la señal correspondiente a la proteína *TcHTE* endógena en los parásitos que expresan la proteína *TcHTE*-HIS-GFP es de menor intensidad a la señal observada en los parásitos salvajes, indicando que su expresión podría encontrarse disminuída, debido a la presencia de la proteína recombinante.



**Figura 44. La proteína TcHTE es reconocida por el suero inmune anti-TcHTE.** Ensayo de Western blot utilizando el suero inmune anti-P1TcHTE para el reconocimiento de las proteínas endógena o recombinantes TcHTE-HIS y TcHTE-HIS-GFP en extractos proteicos totales. Calle1: epimastigotes salvajes. Calle2: epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS. Calle 3: epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP.

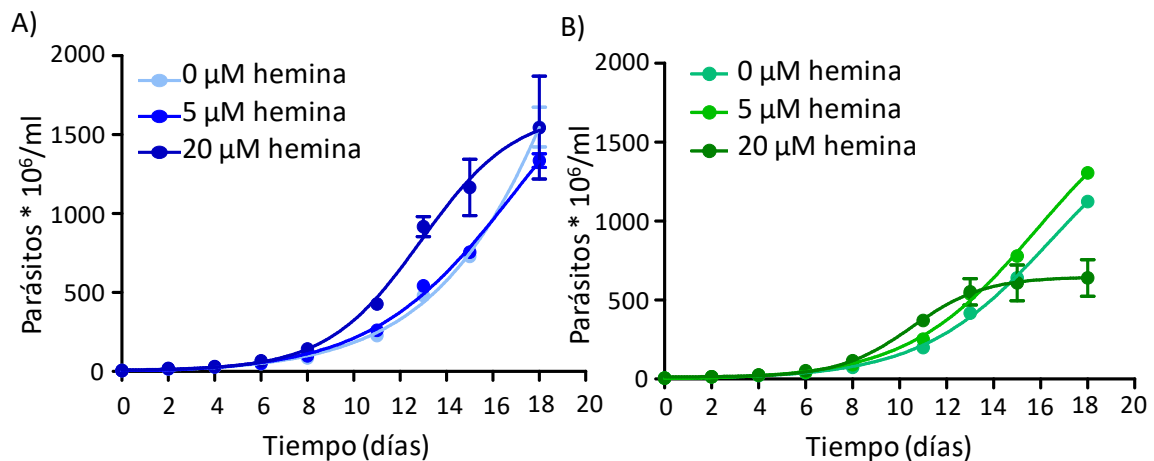
Estos resultados indicarían que la expresión de las proteínas recombinantes TcHTE-HIS y TcHTE-HIS-GFP no se encontraría bajo la regulación del promotor T7 del vector, sino que dichas proteínas se expresarían de forma constitutiva. Esta falta de control de la transcripción del gen recombinante, contrariamente a lo reportado [Alonso, *et al.*, 2014 - Taylor y Kelly, 2006], se ha observado anteriormente en algunos casos en nuestro laboratorio.

La toxicidad del exceso de hemo en conjunto con la expresión constitutiva de las proteínas recombinantes, avala la hipótesis de que la proteína TcHTE participaría en el proceso de transporte de hemo en *T. cruzi*, ya que su sobreexpresión podría producir un desbalance en la concentración intracelular de hemo resultando perjudicial para el parásito. Ésto también nos permitiría explicar por qué solo se lograron obtener parásitos transfectantes estables al reducir la concentración de hemina en el medio de cultivo.

#### **V.4.1.2.1 Efecto de la sobreexpresión de TcHTE en el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

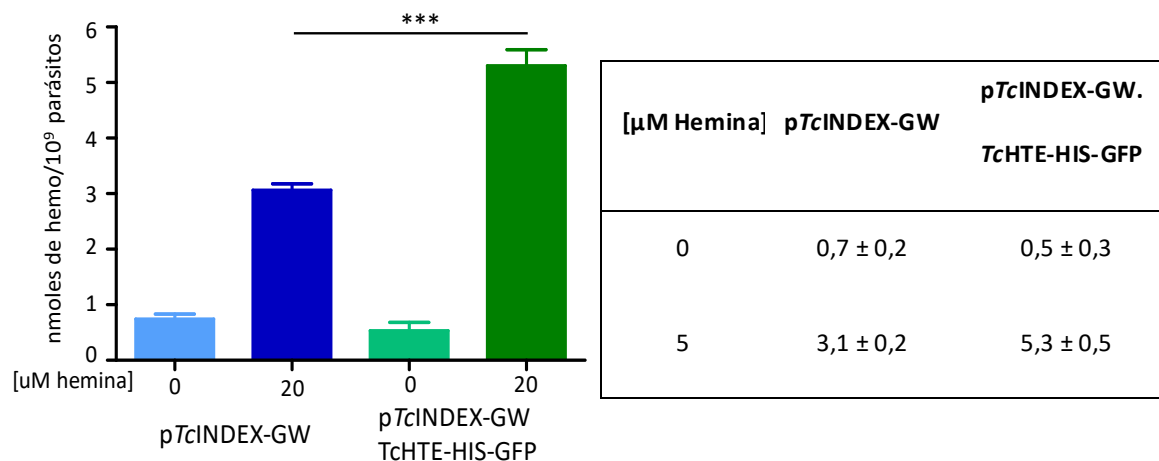
Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de TcHTE recombinante en epimastigotes, en primer lugar analizamos el perfil de crecimiento de los parásitos que expresan la proteína recombinante TcHTE-HIS-GFP en función de la concentración de hemina en el medio de cultivo. Para ello, como en todos los ensayos anteriores,

utilizamos medio LIT-10 % SFB que fue suplementado con 0, 5 y 20  $\mu\text{M}$  hemina, como control se ensayaron en iguales condiciones, epimastigotes conteniendo el plásmido p*Tc*INDEX-GW. Las curvas se iniciaron con una inoculación de  $5 \times 10^6$  parásitos por ml y se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento mediante dilución en medio fresco cada 2 días. El crecimiento se evaluó periódicamente durante 18 días por recuento de los epimastigotes en cámara de Neubauer. Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 45, donde puede observarse que el perfil de crecimiento de los parásitos control no se vio afectado por la disponibilidad de hemina en el medio de cultivo. Tampoco se observaron alteraciones en los perfiles de crecimiento de los parásitos que expresan la proteína recombinante *Tc*HTE-HIS-GFP cuando se incubaron en 0 o 5  $\mu\text{M}$  hemina. Pero, cuando la concentración de hemina agregada fue 20  $\mu\text{M}$ , los parásitos que expresaban la proteína recombinante *Tc*HTE-HIS-GFP entraron en la fase estacionaria de crecimiento durante la segunda semana de cultivo.



**Figura 45. La expresión de la proteína recombinante *Tc*HTE provoca un efecto deletéreo para los epimastigotes en el medio de cultivo suplementado con 20  $\mu\text{M}$  de hemina.** Curva de crecimiento de epimastigotes Dm28c transfectados con el vector p*Tc*INDEX-GW (A) y p*Tc*INDEX-GW.*Tc*HTE-HIS-GFP (B), en medio LIT-10% SFB suplementado con 0, 5 o 20  $\mu\text{M}$  hemina durante 18 días. Los parásitos fueron mantenidos en fase exponencial de crecimiento por dilución periódica en medio fresco cada dos días. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  DS de dos replicas independientes de cada condición.

Para completar estos ensayos, se determinó el contenido intracelular de hemo por el método de la piridina básica (sección IV.4.2.2 de Materiales y Métodos) de los parásitos control y de aquellos que expresaban la proteína recombinante *Tc*HTE-HIS-GFP desafiados a crecer por 48 h en medio LIT-10% SFB suplementado con 0 o 20  $\mu\text{M}$  hemina. Como puede verse en la Figura 46 y en la Tabla anexa (Tabla 3) el contenido intracelular de



**Figura 46 y Tabla 3.** La expresión de la proteína recombinante *TcHTE-HIS-GFP* provoca un incremento en la incorporación de hemo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El contenido de hemo total fue determinado por el método de la piridina básica en las muestras de parásitos transfectados con el plásmido pTcINDEX-GW y pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP incubados por 48 h en medio LIT-10% SFB suplementado con 0 o 20 μM hemina. Los datos están expresados como el promedio ± DS de tres réplicas independientes de cada una de las condiciones ensayadas. \*\*\*p < 0,01 (análisis de varianza ANOVA de un factor seguido por post-test de comparaciones múltiples de Tukey).

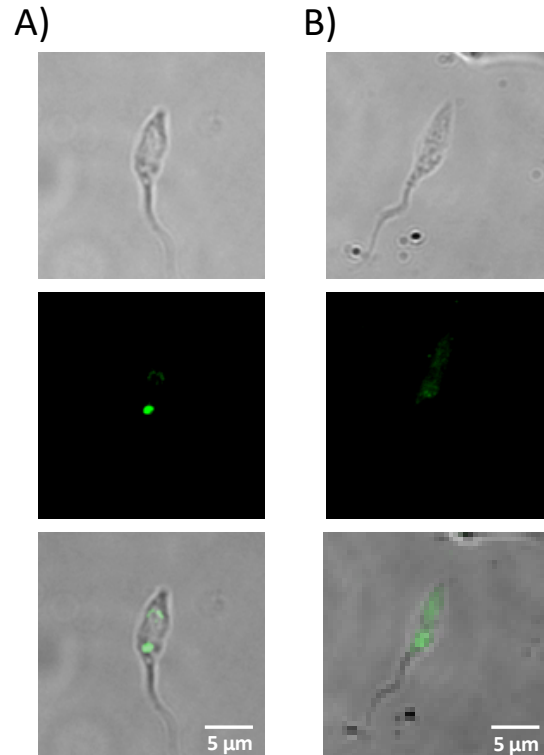
hemo determinado para los epimastigotes que fueron mantenidos en medio sin hemina (0 μM) fue inferior a 1 nmol de hemo cada 10<sup>9</sup> parásitos, sin observarse diferencias significativas entre los parásitos control y los expresan la proteína recombinante *TcHTE-HIS-GFP*. Por otro lado, cuando los parásitos fueron desafiados en un medio suplementado con 20 μM hemina, se observó un incremento en el contenido intracelular de hemo. Mientras que en los parásitos control se detectaron 3,1 ± 0,2 nmoles cada 10<sup>9</sup> parásitos, en aquellos que expresan la proteína recombinante *TcHTE-HIS-GFP* los valores detectados fueron significativamente mayores, alcanzando los 5,3 ± 0,5 nmoles cada 10<sup>9</sup> parásitos. Estos valores fueron incluso mayores a los observados cuando los epimastigotes salvajes fueron desafiados con 50 μM hemina (Figura 15). Esta observación refuerza la idea de que la proteína *TcHTE* cumpliría una función relevante en el transporte de hemo en *T. cruzi*, facilitando la incorporación del cofactor. Además, el aumento en el contenido de hemo intracelular observado en los epimastigotes que expresan *TcHTE* recombinante, indicaría que la presencia de dicha proteína produciría un desbalance en la regulación del transporte de hemo, incorporando mas hemo del que tienen capacidad de almacenar y/o procesar, produciendo el efecto negativo observado en el perfil de crecimiento.

En resumen, estos resultados apoyan la hipótesis de que *TcHTE* posee un rol relevante promoviendo la incorporación de hemo en epimastigotes de *T. cruzi*.

#### **V.4.1.2.2 La proteína *TcHTE* se localiza en la región del bolsillo flagelar en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

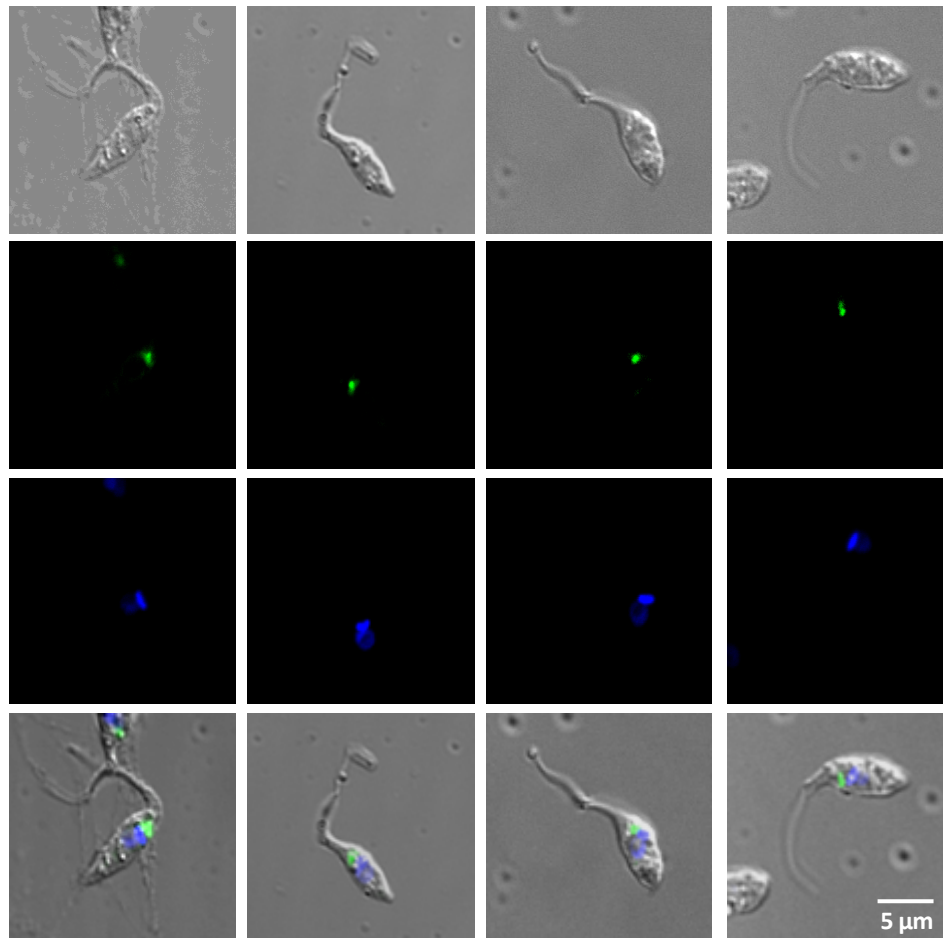
Para evaluar la localización de *TcHTE* en *T. cruzi*, realizamos ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) sobre epimastigotes salvajes y sobre los transfectantes que expresan la proteína recombinante *TcHTE*-HIS. Los epimastigotes fueron crecidos en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu$ M hemina y procesados como se indica en la sección IV.7.5 de Materiales y Métodos. Para la detección de *TcHTE*, así como de *TcHTE*-HIS se utilizaron anticuerpos específicos anti-P1*TcHTE* (sección IV.6.6 de Materiales y Métodos). En la Figura 47 se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de dichos ensayos donde se observó una señal fluorescente intensa y puntual en los parásitos que expresan la proteína recombinante *TcHTE*-HIS, localizada en las proximidades de la región que correspondería al bolsillo flagelar. Por el contrario, en los parásitos salvajes no se detectó una señal fluorescente definida, sino que se observó un puntillado a lo largo de todo el parásito pero más intensas si en la región próxima al bolsillo flagelar. Las características de las imágenes obtenidas a partir de los ensayos con epimastigotes salvajes sugieren que las señales observadas distribuidas a lo largo del cuerpo del parásito corresponderían a inespecificidades y no al reconocimiento específico de la proteína *TcHTE*.

Otra estrategia utilizada para estudiar la localización de *TcHTE* en el parásito, fue mediante el análisis por microscopía confocal de fluorescencia de epimastigotes que expresan la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP. Los parásitos transfectantes fueron crecidos en medio LIT-10% SFB suplementado con 5  $\mu$ M hemina, y procesados como se detalla en la sección IV.7.4 de Materiales y Métodos. Como se observa en la Figura 48, las imágenes obtenidas mostraron una señal verde fluorescente intensa correspondiente a GFP, que se localizaría en la región del bolsillo flagelar, coincidentemente con la localización observada para la proteína *TcHTE*-HIS mediante los ensayos de Inmunofluorescencia. Como puede apreciarse, la señal verde fluorescente se encuentra



**Figura 47. Detección de la proteína TcHTE (recombinante o endógena) en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia deconvolucionadas, obtenidas por Inmunofluorescencia Indirecta sobre epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS (A) o parásitos salvajes (B), tratados con anticuerpos policlonales de conejo anti-P1TcHTE y anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con FITC. Las imágenes son representativas de múltiples campos tomados de dos experimentos independientes.

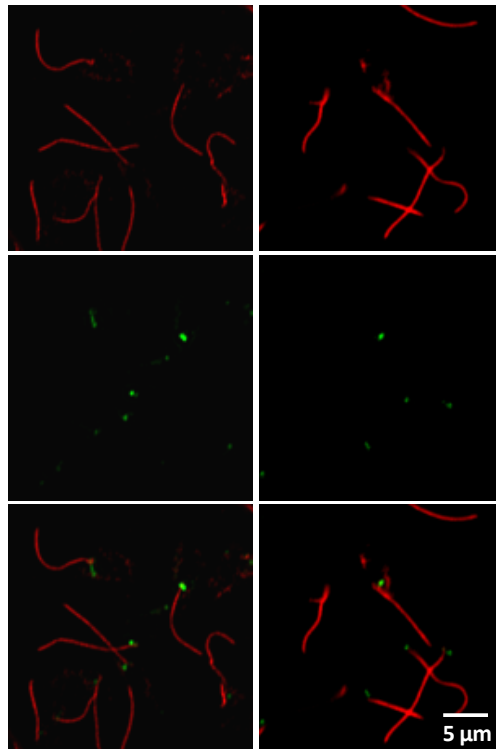
posicionada en la parte anterior del parásito con respecto al kinetoplasto, lo que correspondería a una localización en el bolsillo flagelar y no en el complejo citostoma-citofaringe, que posee una localización posterior con respecto al kinetoplasto y núcleo [Alcantara, *et al.*, 2014 - Eger y Soares, 2012 - Ramos, *et al.*, 2011]. Para corroborar esta localización de TcHTE-HIS-GFP, seguimos el protocolo utilizando por Sasse y Gull [Sasse y Gull, 1988] con el fin de purificar el flagelo conjuntamente con la estructura del bolsillo flagelar de los parásitos, mediante la disgregación de los epimastigotes con soluciones que contienen detergentes y distinta fuerza iónica (sección IV.7.6 de Materiales y Métodos). Luego los flagelos purificados fueron detectados mediante ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta utilizando anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (clon TAT-1) que reconocen la tubulina de la bara paraflagelar.



**Figura 48.** La proteína recombinante *Tc*THTe-HIS-GFP se localiza en las proximidades del bolsillo flagelar en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia deconvolucionadas, de epimastigotes transfectados con el vector p*Tc*INDEX-GW.*Tc*THTe-HIS-GFP. Verde: GFP; Azul: DAPI. Las imágenes son representativas de múltiples campos tomados de experimentos independientes.

En la Figura 49 se muestran imágenes de microscopía confocal de fluorescencia representativas de 2 repeticiones experimentales independientes, donde puede observarse que la señal fluorescente verde correspondiente a la proteína de fusión *Tc*THTe-HIS-GFP se encontró en el extremo de la señal de fluorescencia roja (tubulina) correspondiente al flagelo. Estos resultados apoyan la idea de que *Tc*THTe se localizaría en el complejo del bolsillo flagelar.

Si bien muchos transportadores de tripanosomátidos han sido caracterizados bioquímicamente, la localización específica de la mayoría de ellos aún se desconoce [Burchmore y Hart, 1995 - Krishnamurthy, *et al.*, 2005 - Landfear y Ignatushchenko, 2001 - Tetaud, *et al.*, 1994]. Los resultados aquí expuestos indican que la proteína *Tc*THTe se encontraría localizada en el bolsillo flagelar de los epimastigotes de *T. cruzi*, y que la



**Figura 49. La proteína recombinante TcHTE-HIS-GFP permanece asociada al complejo flagelar en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia deconvolucionadas, obtenida por Inmunofluorescencia Indirecta sobre estructuras del flagelo y complejo flagelar obtenidos de epimastigotes transformados con el vector pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP, tratados con anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (clon TAT-1) y anti-IgG de ratón Alexa Fluor 555. La imagen es representativa de múltiples campos tomados de dos experimentos independientes.

expresión endógena de la proteína no sería suficiente para ser detectada de forma fehaciente por Inmunofluorescencia Indirecta, al menos en las condiciones experimentales desarrolladas en nuestros ensayos.

Ensayos similares de localización subcelular de las proteínas de la familia HRG recombinantes fueron realizados y reportados para LaHR1 (*L. amazonensis*, [Huynh, *et al.*, 2012 - Renberg, *et al.*, 2015], LmHR1 (de *L. major*, [Cabello-Donayre, *et al.*, 2016], TbHRG (*T. brucei*, [Horakova, *et al.*, 2017])), además de los resultados descritos en este trabajo de Tesis para TcHTE [Merli, *et al.*, 2016]. Es importante destacar que en todos estos ensayos, la detección de las proteínas recombinantes no fue homogénea. La localización de TcHTE-HIS y TcHTE-HIS-GFP, determinadas en nuestro laboratorio, difieren en general con la reportada para las demás proteínas de la familia. LaHR1, fue localizada principalmente sobre la membrana plasmática y en forma minoritaria en algunos compartimentos intracelulares en promastigotes de *L. amazonensis* [Huynh, *et al.*, 2012]. LmHR1, fue detectada en compartimentos intracelulares cuando fue expresada como

proteína recombinante en *T. brucei*, pudiendo además, reemplazar la función de *TbHRG* [Cabello-Donayre, *et al.*, 2016]. A su vez, la proteína *TbHRG* fue localizada principalmente sobre la membrana del flagelo y en el bolsillo flagelar tanto en el estadio procíclico como en el estadio sanguíneo [Horakova, *et al.*, 2017]. También se ha reportado la localización de *TbHRG* en endo-lisosomas cuando se utilizó hemoglobina como fuente de hemo en el medio de cultivo. En este caso, los autores postularon que *LmHR1* y *TbHRG* se encontrarían asociadas a la liberación del hemo hacia el citosol a partir de la degradación de la hemoglobina, la cual sería incorporada por el parásito por una vía distinta [Cabello-Donayre, *et al.*, 2016]. Si bien la localización de *TcHTE* solo en el bolsillo flagelar, no coincide con lo observado para las proteínas homólogas de los otros tripanosomátidos, su localización concuerda con el lugar propuesto para el transporte de metabolitos en estos tripanosomátidos [Krishnamurthy, *et al.*, 2005 - Landfear y Ignatushchenko, 2001].

Los resultados expuestos en esta sección nos permitieron concluir que en el estadio de epimastigote, la proteína *TcHTE* se localiza en la región correspondiente al bolsillo flagelar, pudiendo ser purificada conjuntamente con la estructura complejo flagelar. Además podemos decir que los niveles de expresión endógena de la proteína no serían suficientes para su detección por ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta utilizando los anticuerpos específicos anti-P1*TcHTE* desarrollados durante este trabajo de Tesis. A su vez, la localización en el bolsillo flagelar refuerza la idea de que *TcHTE* participa en la incorporación de hemo, por encontrarse en una de las regiones del parásito especializadas en los procesos de transporte.

#### **V.4.1.2.3 El extremo C-terminal de la proteína *TcHTE* se encuentra expuesta hacia el lado citoplasmático de la membrana del bolsillo flagelar en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

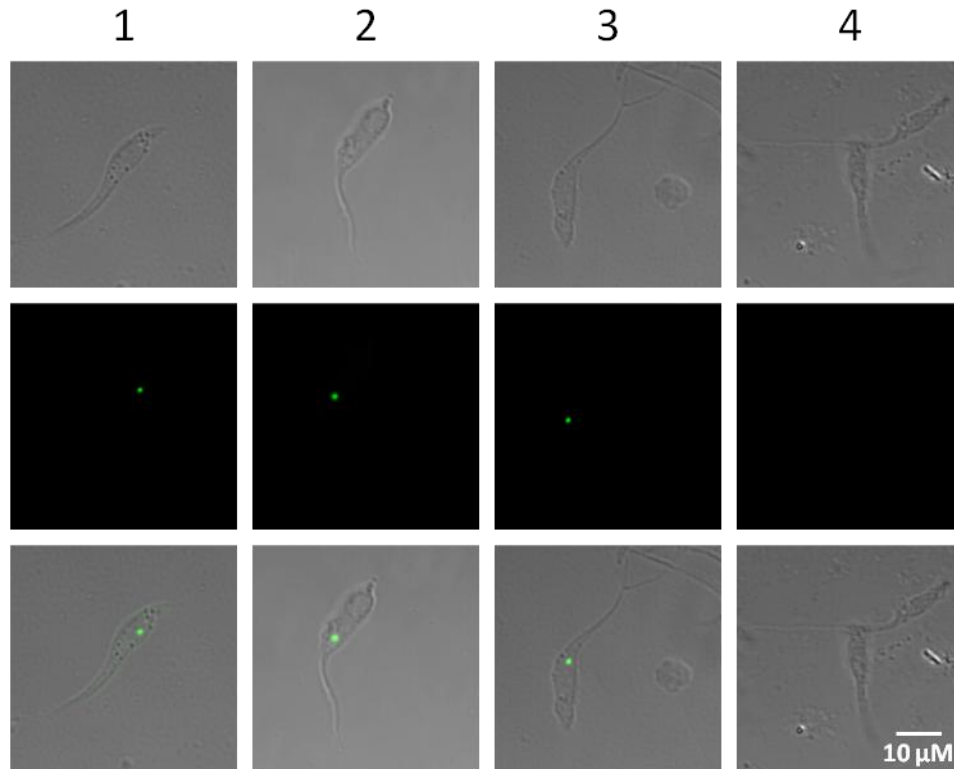
Si bien la localización de diversas proteínas de la familia HRG han sido descriptas, y las predicciones bioinformáticas establecen que los extremos N y C-terminales se encontrarían orientados hacia el citoplasma, ésto no se ha comprobado experimentalmente para ninguna de las proteínas estudiadas. La disponibilidad de epimastigote transfectantes que expresan la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP, constituye una herramienta muy útil para corroborar o descartar experimentalmente esta

hipótesis. Utilizando una adaptación del protocolo descrito por Chirstian Wunder [Wunder, *et al.*, 2010], realizamos ensayos de protección a degradación por proteasas para verificar la orientación del extremo C-terminal de *TcHTE*. Para ello se analizó la degradación de la GFP por acción de la Tripsina, siguiendo la desaparición de la señal fluorescente verde de GFP por microscopía confocal de fluorescencia. Brevemente, los epimastigotes que expresan la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP fueron tratados con PBS, Tripsina durante 5 min, Tritón X-100 o Tritón X-100 y Tripsina durante 5 min a temperatura ambiente. La acción de la Tripsina fue detenida por el agregado de SFB y luego, las muestras fueron procesadas para su observación por microscopía confocal de fluorescencia (sección IV.7.7.1 de Materiales y Métodos). En la Figura 50 se muestran imágenes representativas de 4 ensayos similares donde claramente puede observarse que: la incubación con Tripsina de los epimastigotes no generó ningún efecto sobre la fluorescencia comparada con aquellos epimastigotes incubados con PBS (control), indicando que la porción fluorescente de la proteína recombinante se encontraría protegida a la acción de la proteasa. Por otro lado, la permeabilización de los epimastigotes con Tritón X-100 en ausencia de Tripsina tampoco afectó la fluorescencia de la GFP, indicando que la la misma es estable frente a la presencia del detergente. Solo el tratamiento con Tripsina luego de la permeabilización de los epimastigotes con Tritón X-100 ocasionó un notorio efecto en la pérdida de fluorescencia de la proteína GFP indicando que el proceso de permeabilización expuso a la proteína a la acción de la proteasa.

Este experimento nos permitió verificar que el extremo C-terminal de la proteína de fusión *TcHTE*-HIS-GFP se encuentra orientado hacia el interior celular de los epimastigotes, siendo la primera vez que se comprueba experimentalmente la predicción realizada por métodos bioinformáticos sobre la orientación del extremo C-terminal para una proteína de la familia HRG.

### **V.3.1.3 Estudio de la localización de *TcHTE* en tripomastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi***

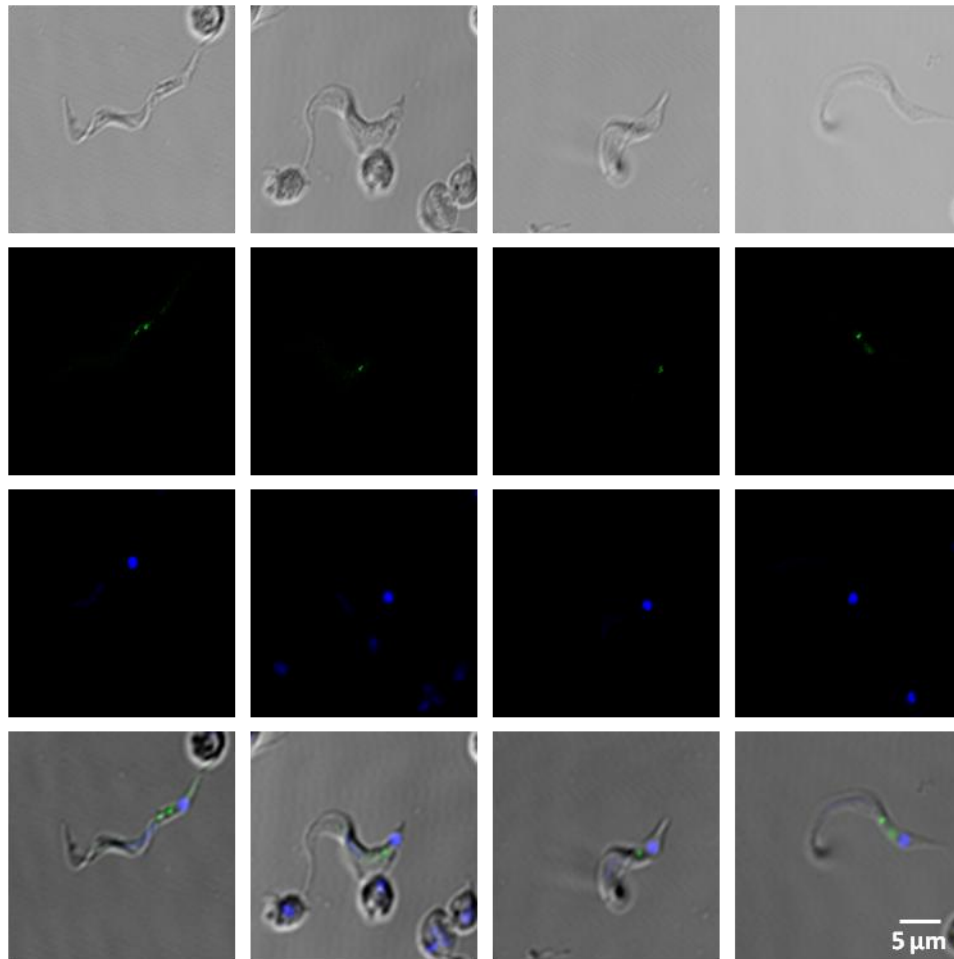
Una vez establecida la localización de *TcHTE* en epimastigotes de *T. cruzi*, nos propusimos investigar su localización en los otros estadios del ciclo de vida del parásito.



**Figura 50. La proteína recombinante *TcHTE-HIS-GFP* expone su extremo C-terminal en el interior celular.** Imagen deconvolucionada de microscopía confocal de fluorescencia de epimastigotes transfectados con el vector *pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP*. Los epimastigotes recibieron diferentes tratamientos 1: PBS; 2: 8 mM Tripsina; 3: 0,1% Tritón X-100; 4: 0,1% Tritón X-100, 8mM Tripsina. Las imágenes son representativas de múltiples campos tomados de cuatro experimentos independientes.

Como se ha mencionado, en el laboratorio contamos con la capacidad de obtener tripomastigotes derivados de célula y amastigotes intracelulares lo cual nos permitió realizar ensayos de localización de proteínas fluorescentes recombinantes por microscopía confocal de fluorescencia.

Para estudiar de la localización de *TcHTE-HIS-GFP* en tripomastigotes derivados de célula, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal a partir de tripomastigotes liberados de cultivo células Vero previamente infectadas con tripomastigotes metacíclicos transfectantes (sección IV.7.4 de Materiales y Métodos), que luego fueron colectados, lavados con PBS, fijados y montados adecuadamente para su análisis. La Figura 51 muestra claramente que la señal de fluorescencia correspondiente a *TcHTE-HIS-GFP*, proviene de un punto discreto y bien definido, que posiblemente se superponga con la región del bolsillo flagelar. Estas imágenes, sumadas al resultado obtenido en epimastigotes, nos permiten proponer que la localización de la proteína en ambos

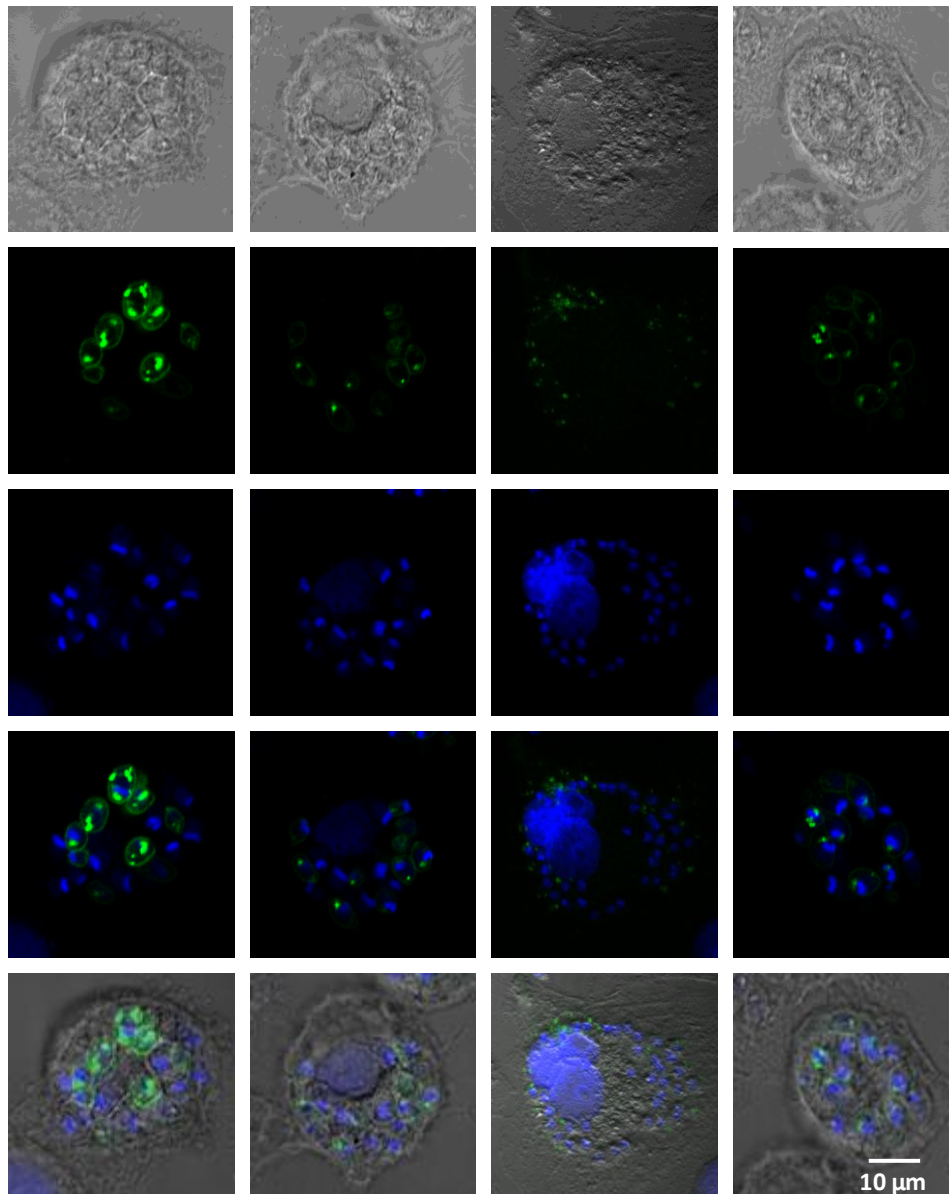


**Figura 51. La proteína recombinante TcTTE-HIS-GFP se localiza en las proximidades del bolsillo flagelar en tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia deconvolucionadas, de tripomastigotes transfectados con el vector pTcINDEX-GW.TcTTE-HIS-GFP. Verde: GFP; Azul: DAPI. Las imágenes son representativas de múltiples campos tomados de experimentos independientes.

estadios correspondería al bolsillo flagelar. Para corroborar esta hipótesis, nos propusimos realizar la purificación de los flagelos juntamente con la estructura del bolsillo flagelar en el estadio de tripomastigote siguiendo un protocolo similar a desarrollado por Sasse y Gull [Sasse y Gull, 1988], pero al momento de escritura de este trabajo de Tesis no logramos optimizar las condiciones experimentales.

Posteriormente procedimos a analizar la localización de la proteína recombinante TcTTE-HIS-GFP en amastigotes de *T. cruzi*. Para ello las células Vero se crecieron en monocapa a 50% de confluencia sobre cubreobjetos en medio DMEM-2% SFB y posteriormente fueron incubadas con tripomastigotes transfectantes de *T. cruzi* respetando una MOI de 40 durante 4 h para permitir el establecimiento de la infección. Luego se procedió al lavado de los parásitos que no fueron internalizados y, entre 48 y 72

h post-infección, cuando los amastigotes fueron visibles bajo el microscopio óptico, se procedió a procesar las muestras para su observación mediante microscopía confocal de fluorescencia como se detalla en la sección IV.7.4 de Materiales y Métodos. En la Figura 52 se muestran imágenes representativas de 6 experimentos independientes realizados en las mismas condiciones. En ellas puede observarse que la señal fluorescente verde proveniente de GFP no es homogénea. En primer lugar, la proteína de fusión recombinante no se detectó en todos los amastigotes intracelulares pero además, aquellos parásitos que presentaron señal fluorescente verde no mostraron el mismo patrón de fluorescencia. Mientras que en todos amastigotes se observó una señal discreta puntualmente localizada, lo que podría corresponder a la región del bolsillo flagelar, algunos muestran además una señal fluorescente verde sobre la membrana plasmática de los parásitos. Esta diferencia en la localización de TcHTE-HIS-GFP podría deberse a un efecto de la sobreexpresión de la proteína, o a una diferente localización debido al estadio del ciclo de vida del parásito. Es posible que debido a la escasa disponibilidad de hemo labil en el citosol de la célula huésped, los amastigotes requieran incrementar la expresión de la proteína responsable del transporte, para incorporar el cofactor. Además, por tratarse de un estadio intracelular, podrían exponer diversas proteínas involucradas en el transporte de metabolitos en toda la superficie celular, y no solo en la región del bolsillo, ya que no requeriría la expresión de proteínas de superficie necesarias para los procesos de infección o que le ayuden a evadir el sistema inmune como mucinas, trans-cialidasas, calreticulina y GP160, entre otras [Cardoso, *et al.*, 2015], Resultados similares, en cuanto al cambio de localización se han reportado para la proteína LaHR1 de *L. amazonensis* donde la misma varía dependiendo del estadio en el que se encuentre el parásito. Mientras que en el estadio de promastigote la proteína LaHR1 recombinante se localizó principalmente en la membrana plasmática [Huynh, *et al.*, 2012], en el estadio replicativo intracelular fue detectada tanto en la membrana plasmática como ocasionalmente en compartimentos intracelulares [Huynh, *et al.*, 2012 - Renberg, *et al.*, 2015]. Este cambio de localización se atribuye a la fuente de hemo que el parásito utilizaría en cada caso. Mientras que los promastigotes podrían utilizar hemo libre producto de la degradación de la ingesta del hospedador, los amastigotes intracelulares podrían adquirir el hemo a partir de la degradación de la hemoglobina en los endosomas-lisosomas. Un proceso similar podría estar ocurriendo en *T. cruzi*, mientras



**Figura 52.** La proteína recombinante *Tc*THTe-HIS-GFP se localiza mayoritariamente en las proximidades del bolsillo flagelar en amastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia deconvolucionadas, de amastigotes transfectados con el vector p*Tc*INDEX-GW.*Tc*THTe-HIS-GFP. Verde: GFP; Azul: DAPI. Las imágenes son representativas de múltiples campos tomados de experimentos independientes.

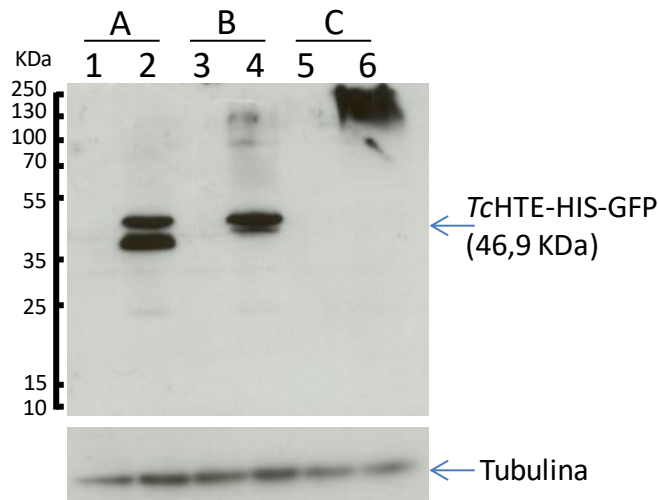
que el epimastigote adquiriría el hemo a partir de la degradación de la hemoglobina producida por la digestión de la sangre por parte del insecto hematófago, el amastigote intracelular debería rescatar el hemo del citosol de la célula huésped donde la disponibilidad de hemo (cuota de hemo lábil disponible para ser utilizado) es muy baja [Hanna, *et al.*, 2016].

## V.4.2 Estudio de la proteína *TcHTE* (endógena) en parásitos salvajes

Como se ha mencionado anteriormente, *T. cruzi* depende de la incorporación de hemo desde su entorno para su supervivencia y proliferación. Así mismo, los resultados hasta aquí expuestos indican que la proteína *TcHTE* desarrollaría una función relevante en el proceso de transporte de hemo. En esta sección nos centraremos en el estudio de la proteína *TcHTE* endógena del parásito y su relación con los diferentes estadios del ciclo de vida y la disponibilidad de hemo en el medio de cultivo.

### V.4.2.1 Optimización de las condiciones para la detección de *TcHTE*

Una de las herramientas desarrolladas durante este trabajo de tesis, fueron los anticuerpos policlonales de conejo capaces de reconocer específicamente a *TcHTE* (anti-P1*TcHTE*, (sección IV.6.6 de Materiales y Métodos). Un hecho interesante de destacar son los resultados obtenidos en los primeros ensayos de Western blot realizados a partir de extractos proteicos totales de epimastigotes que expresaban las proteínas recombinantes *TcHTE*-HIS y *TcHTE*-HIS-GFP, utilizando tanto anticuerpos anti-HIS como anti-GFP, en los que no se logró obtener las señales correspondientes a la detección de las proteínas de interés. En estos casos, se siguió el protocolo estándar para la desnaturalización de las muestras previo al SDS-PAGE (agregado de buffer de siembra (SB) 5X y posterior incubación a 100 °C por 5 min). Ante la reiterada ausencia de señal y considerando la experiencia adquirida en el laboratorio para la detección de proteínas de membrana por Western blot, se decidió ensayar diferentes tratamientos de las muestras que contenían *TcHTE* previo al SDS-PAGE y posterior Western blot. Para ello, extractos celulares totales de epimastigotes que expresaban la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP fueron incubados por diferentes tiempos y a diferentes temperaturas utilizando la misma solución de SB 5X. En la Figura 53 se muestra un ensayo de Western blot representativo de al menos 4 repeticiones experimentales donde las muestras fueron incubadas a 42 °C por 30 min, 60 °C por 20 min o 100 °C por 5 min, y la detección de la proteína se realizó utilizando anticuerpos anti-GFP. Claramente se observa que la incubación de las muestras a 100 °C por 5 min no permitió la detección de la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP, mientras que incubaciones a menores temperaturas, tales como a 42 °C por 30 min o 60 °C por 20 min, permitieron la obtención de la señal correspondiente a *TcHTE*-



**Figura 53. El tratamiento convencional de las muestras para SDS-PAGE afecta la detección de la proteína TcHTE.** Ensayo de Western blot utilizando anticuerpos anti-GFP para el reconocimiento de la proteína recombinante TcHTE-HIS-GFP en extractos proteicos totales de epimastigotes Dm28c transfectados con el vector pTcINDEX-GW.TcHTE-HIS-GFP o salvajes, tratados a diferentes tiempos y temperaturas. Calles 1, 3 y 5: epimastigotes D28c salvajes. Calle 2, 4 y 6: epimastigotes transfectantes. Se utilizó anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (clon TAT-1) para el reconocimiento de tubulina como control de carga de los extractos totales. Tratamientos A: 42 °C por 30 min, B: 60 °C por 20 min, C: 100 °C por 5 min.

HIS-GFP por ensayos de Western blot. Con estas evidencias, en todos los ensayos que involucraron el análisis de TcHTE (endógeno o recombinante, y utilizando anticuerpos anti-HIS, anti-GFP o anti-P1TcHTE) las muestras fueron siempre tratadas a 42 °C por 30 min, a menos que se indique otro tratamiento.

#### V.4.2.2 TcHTE y el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Los organismos que dependen de la incorporación de hemo desde su entorno, deben regular los mecanismos de transporte para evitar los efectos tóxicos del exceso de hemo. Considerando los resultados obtenidos en la sección V.1.2 de Resultados, donde solo pudimos observar transporte de los diferentes AHs en los estadios replicativos del parásito (epimastigotes y amastigotes), nos planteamos la posibilidad de que la maquinaria responsable del transporte no se encuentre disponible en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Frente a este escenario, la regulación del transporte podría darse a nivel proteico, regulando la acumulación o actividad de las proteínas involucradas, o a nivel de ARN, regulando la transcripción de los genes que codifican para dichas proteínas, o el procesamiento y estabilidad del ARNm. Se ha comprobado que tanto en *C. elegans* como en *Leishmania spp.* son capaces de regular la cantidad de transcripto de

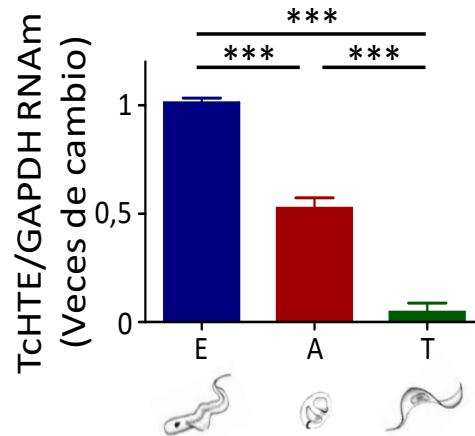
los genes codificantes de las proteínas de la familia HRG, en función de la disponibilidad de hemo en los medios de cultivo [Huynh, *et al.*, 2012 - Yuan, *et al.*, 2012].

En esta sección se describen los resultados y la discusión de la evaluación de los niveles de transcripción y la acumulación de la proteína TcHTE a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi*, donde los niveles de transcritos y la acumulación de la proteína TcHTE fueron analizados en tripomastigotes recuperados del sobrenadante del cultivo de células infectadas, en amastigotes intracelulares y en epimastigotes crecidos en medio LIT-10% SFB suplementado con diferentes cantidades de hemina.

#### **V.4.2.2.1 En los estadios replicativos de *Trypanosoma cruzi* se detecta mayor cantidad de transcritos de TcHTE**

Para evaluar si existe una relación entre la transcripción de TcHTE en *T. cruzi*, y el ciclo de vida del parásito, se determinaron los niveles de acumulación del ARNm de TcHTE en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* por RT-qPCR (como se detalla en la sección IV.5.12 de Materiales y Métodos). Los mismos fueron normalizados respecto a los valores de GAPDH y relativizados a la condición de epimastigotes mantenidos en LIT-10% SFB 5  $\mu$ M hemina, que es la condición de mantenimiento estándar de este estadio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 54 donde puede observarse que la acumulación de transcritos de TcHTE fue significativamente mayor en el estadio de epimastigote, mostrando un valor intermedio en amastigotes y siendo prácticamente indetectables en tripomastigotes. Resultados similares fueron reportados en *T. brucei*, donde los niveles de transcritos para TbHRG fueron prácticamente indetectables en el estadio sanguíneo, contrario a lo observado en el estadio procíclico donde su detección fue significativa [Horakova, *et al.*, 2017].

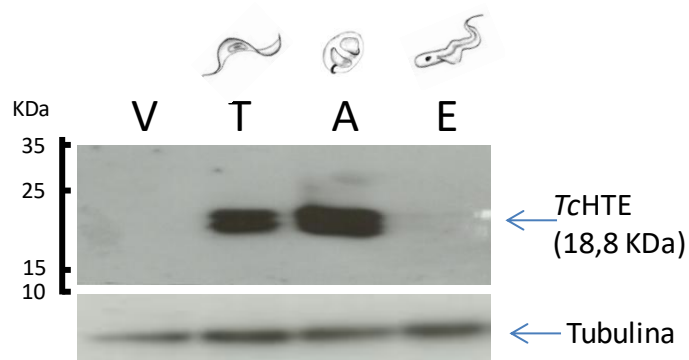
Estos resultados muestran que, en *T. cruzi*, la transcripción de TcHTE sería significativamente mayor en los estadios replicativos (epimastigotes y amastigotes) respecto a los no replicativos. Es importante destacar que, precisamente, fue en los estadios replicativos donde se detectó la incorporación de AHs tal como se expuso en los resultados de la sección V.1.2 de Resultados. De este modo puede señalarse que existiría una relación entre la transcripción del gen que codifica para TcHTE y el transporte de hemo, determinada a través de la internalización de AHs.



**Figura 54.** La acumulación de transcritos de *TcHTE* varían según el estadio celular de *Trypanosoma cruzi*. Concentración relativa de transcritos entre los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Los valores obtenidos por RT-qPCR de *TcHTE*, fueron normalizados en función de la concentración de GAPDH, y posteriormente relativizados la condición de epimastigotes crecidos en LIT-10% SFB con 5  $\mu$ M hemina. E: epimastigotes Dm28c crecidos en LIT-10% SFB con 5  $\mu$ M hemina. A: amastigotes intracelulares. T: Tripomastigotes obtenidos del sobrenadante de células infectadas.

#### V.4.2.2.2 La proteína *TcHTE* se detecta mayoritariamente en los estadios replicativos de *Trypanosoma cruzi*

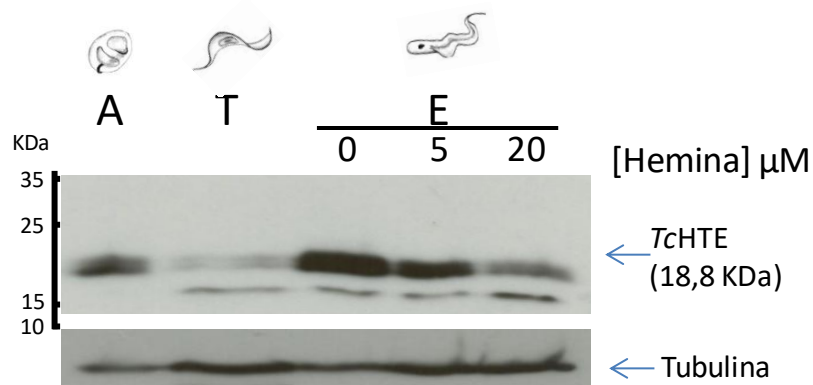
En general, es ampliamente aceptado que diferencias en la acumulación de ARNm está directamente asociado a una diferencia en la concentración de proteína y de su actividad, sin embargo, esta relación puede no ser lineal. Es por ello que, contando con la posibilidad de poder estimar la cantidad relativa de *TcHTE* mediante ensayos de Western blot, nos propusimos evaluar si la diferencia observada a nivel de transcritos también se reflejaba directamente en la cantidad de proteína detectada. Para ello realizamos ensayos de Western blot utilizando los anticuerpos anti-P1*TcHTE*, sobre extractos proteicos totales de los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Además, se evaluó la presencia de tubulina con anticuerpos específicos (anti- $\alpha$  tubulina clon TAT-1) como control de carga. Se procesó de igual manera una muestra de células Vero, la cual fue utilizada como control de que las señales obtenidas provinieron de los parásitos y no de las células Vero utilizadas para la obtención de los tripomastigotes y amastigotes. En la Figura 55, se muestran los resultados de un ensayo de Western blot, donde puede observarse que fue posible detectar la presencia de *TcHTE* en el estadio de amastigote.



**Figura 55. La acumulación de la proteína TcHTE varía entre los diferentes estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** Ensayo de Western blot utilizando suero inmune anti-P1TcHTE para el reconocimiento de la proteína de endógena TcHTE en extractos proteicos totales de células Vero (V), tripomastigotes (T), amastigotes (A) y epimastigotes (E). Se utilizó anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (clon TAT-1) para el reconocimiento de tubulina como control de carga de los extractos totales.

Así mismo no se observó la señal correspondiente a TcHTE en la calle control que contenía extractos proteicos totales de células Vero, indicando que la señal observada efectivamente proviene de la forma intracelular del parásito. También se observó una señal de menor intensidad en la calle que contiene extracto total de tripomastigotes. Por otro lado, no pudimos detectar la presencia de la proteína TcHTE en los extractos totales de epimastigotes. Estos resultados llamaron nuestra atención, ya que en el estadio de tripomastigote se detectó la menor concentración del transcripto, sin embargo, el estadio donde no pudo detectarse la incorporación de los diferentes AHs. Asimismo en el estadio de epimastigotes se detectó la mayor concentración de transcripto y, además, es uno de los estadios donde previamente se detectó el transporte de los diferentes AHs. Una posible causa que explicaría la no detección de TcHTE en epimastigotes radicó en que esa muestra correspondía a epimastigotes que habían sido crecidos en medio LIT-10% SFB suplementado con 20  $\mu$ M hemina, cantidad de hemina que podría ser suficiente para reducir los niveles de expresión del gen, o los niveles de acumulación de la proteína. En cuanto a la señal detectada en la muestra de tripomastigotes, la misma podría atribuirse a la presencia de amastigotes contaminantes en el sobrenadante celular al momento de la toma de la muestra de tripomastigotes. Para corroborar esta hipótesis, decidimos repetir los ensayos de Western blot, utilizando extractos proteicos totales de epimastigotes crecidos en LIT-10% SFB 5  $\mu$ M hemina, que luego fueron incubados por 72 h en medios LIT-10% SFB suplementado con 0, 5 y 20  $\mu$ M hemina. Además, para descartar una posible contaminación con amastigotes en la muestra de tripomastigotes, los extractos celulares

totales se obtuvieron a partir de tripomastigotes puros verificando la ausencia de amastigotes en la muestra mediante microscopía óptica al momento de la toma de muestra. En la Figura 56 se muestran los resultados de este ensayo, donde pudo detectarse la señal correspondiente a *TcHTE* en los extractos proteicos totales de amastigotes. También se detectó la señal correspondiente a *TcHTE* en la muestra de tripomastigotes, aunque en este caso la banda fue de menor intensidad. Además, se observó un cambio importante en la intensidad de la señal de la proteína *TcHTE* en los extractos provenientes de epimastigotes incubados 72 h en los medios con diferente disponibilidad de hemina. La señal más intensa correspondió a la muestra de los epimastigotes mantenidos en ausencia de hemina (0  $\mu\text{M}$ ). La señal obtenida de los epimastigotes incubados con 5  $\mu\text{M}$  hemina fue de menor intensidad, y la detectada en la muestra proveniente de epimastigotes incubados con 20  $\mu\text{M}$  hemina fue más débil aún. Estos resultados indican claramente que la acumulación de la proteína *TcHTE* disminuye considerablemente con el aumento de la concentración de hemina en el medio de cultivo. La diferencia observada en los niveles de acumulación de *TcHTE* en las distintas muestras de epimastigotes incubados con 20  $\mu\text{M}$  hemina que se muestra en la figura 55 (sin detección) y en la figura 56 (señal definida) podría atribuirse al tiempo de incubación de los epimastigotes en esas condiciones, ya que en el primer caso, la incubación fue de siete días, y en el segundo de sólo dos días.



**Figura 56. La acumulación de la proteína *TcHTE* en epimastigotes es afectada por la concentración de hemina disponible en el medio de cultivo.** Ensayo de Western blot utilizando suero inmune anti-P1*TcHTE* para el reconocimiento de la proteína de endógena *TcHTE* en extractos proteicos totales de amastigotes (A), tripomastigotes (T), y epimastigotes (E), incubados en medio LIT-10% SFB suplementado con 0, 5 y 20  $\mu\text{M}$  hemina por 48 horas. Se utilizó anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (clon TAT-1) para el reconocimiento de tubulina como control de carga de los extractos totales.

Los resultados expuestos en esta sección indican que la acumulación de la proteína TcHTE depende del estadio del ciclo de vida del parásito siendo mayor en los estadios replicativos (epimastigotes y amastigotes) donde se verificó el transporte de hemo en el paráito. Además, en epimastigotes, la acumulación de TcHTE respondió a la disponibilidad de hemina en el medio de cultivo.

### **V.4.2.3 Efectos de la disponibilidad de hemo (AHs) sobre la transcripción y acumulación de TcHTE en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

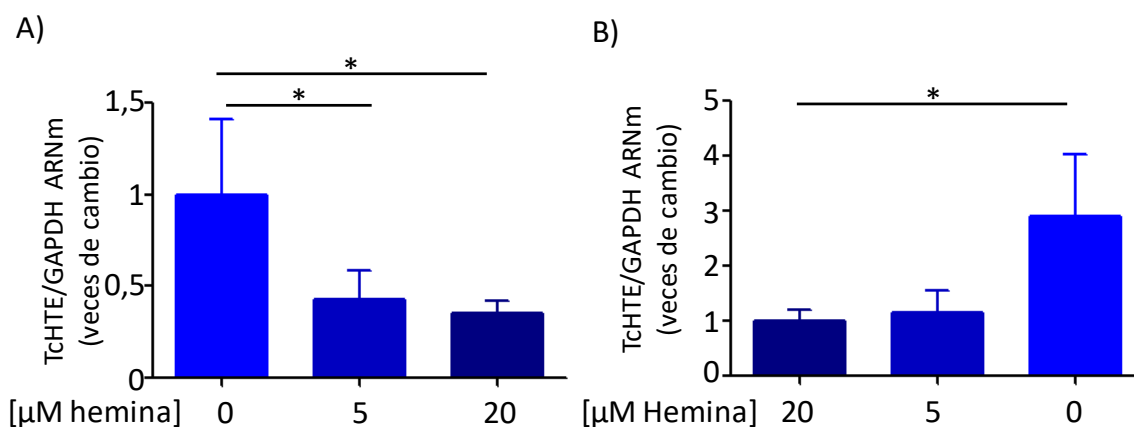
Con el fin de profundizar los conocimientos sobre la relación entre la proteína TcHTE y el hemo en *T. cruzi*, nos propusimos evaluar como las variaciones en la disponibilidad de hemina en el medio de cultivo afectan tanto los niveles de transcripto como de acumulación de la proteína TcHTE en epimastigotes. Los resultados obtenidos se muestran y discuten en los siguientes apartados .

#### **V.4.2.3.1 La concentración de hemina en el medio de cultivo modifica los niveles del transcripto de TcHTE en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Los resultados presentados en el apartado anterior nos llevaron a revisar si la disponibilidad de hemina en el medio de cultivo afectaba también la transcripción del gen que codifica para TcHTE como fue reportado para las proteínas HRG de otros organismos [Huynh, *et al.*, 2012 - Rajagopal, *et al.*, 2008]. Para estudiar este posible efecto se determinaron los niveles de transcripto de TcHTE por RT-qPCR en epimastigotes sometidos a un aumento (de 0 a 5 y 20  $\mu\text{M}$ ) y a una disminución (de 20 a 5 y 0  $\mu\text{M}$ ) de la concentración de hemina del medio de cultivo.

En un primer ensayo, los epimastigotes mantenidos de rutina en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu\text{M}$  hemina, fueron sometidos a un período de ayuno de hemo de 72 h en medio LIT-10% SFB sin hemina, y posteriormente se incubaron en medio fresco suplementado con 0, 5 o 20  $\mu\text{M}$  hemina por 18 h. Luego se procedió a la extracción del ARN total, y su posterior retrotranscripción utilizando cebadores hexaméricos inespecíficos. Posteriormente se cuantificaron los ARNm de TcHTE y GAPDH como como

se detalla en la sección IV.5.12 de Materiales y Métodos. Los niveles de ARNm de *TcHTE* se normalizó respecto a la de GAPDH y luego los valores obtenidos se relativizaron con respecto a la condición de cultivo de 0  $\mu\text{M}$  hemina. En la Figura 57A se presentan los resultados obtenidos, donde puede observarse que el aumento de la concentración de hemina de 0 a 5 o 20  $\mu\text{M}$  provocó una disminución significativa de los niveles de transcripto de *TcHTE*.



**Figura 57. La acumulación de transcritos de *TcHTE* en epimastigotes varían según la disponibilidad de hemina en el medio de cultivo.** Concentración relativa de transcripto entre epimastigotes mantenidos por 18 horas en medio LIT-10% SFB suplementado con diferentes cantidades de hemina. A) Epimastigotes mantenidos en 0  $\mu\text{M}$  hemina fueron incubados en medio conteniendo 0, 5 o 20  $\mu\text{M}$  hemina. B) Epimastigotes mantenidos en 20  $\mu\text{M}$  hemina fueron incubados en medio conteniendo 20, 5 o 0  $\mu\text{M}$  hemina. Luego de 18 horas en cada condición los epimastigotes fueron procesados para medir la concentración de ARNm de *TcHTE* y GAPDH. Los valores obtenidos por RT-qPCR de *TcHTE*, fueron normalizados en función de GAPDH, y posteriormente relativizados la condición de epimastigotes crecidos en LIT-10% SFB 0  $\mu\text{M}$  hemina (A) o 20  $\mu\text{M}$  hemina (B).

En el segundo ensayo, se analizaron las variaciones en los niveles de transcripción de *TcHTE* frente al cambio en sentido opuesto, es decir frente a la disminución en la concentración de hemina. En este caso, los epimastigotes fueron incubados por 72 h en medio LIT-10% SFB con 20  $\mu\text{M}$  hemina (condición de abundancia de hemo), y posteriormente se incubaron en el mismo medio pero suplementado con 0, 5 o 20  $\mu\text{M}$  hemina por 18 h. Como en el ensayo anterior, se realizó la extracción del ARN total, seguido de su retrotranscripción y posterior determinación de la concentración de ARNm de *TcHTE* y GAPDH. En este caso, los valores de concentración de transcripto obtenidos para *TcHTE* se relativizaron con respecto a la condición de cultivo de 20  $\mu\text{M}$  hemina y los resultados se muestran en la (Figura 57B). No se observó una diferencia significativa entre la concentración relativa de transcripto de los epimastigotes mantenidos en 20  $\mu\text{M}$

hemina y aquellos que posteriormente se incubaron en 5  $\mu$ M hemina. En este caso el cambio en la concentración de hemo disponible entre estas dos condiciones no sería suficientes para modificar los niveles de transcripto. Por el contrario, al incubar los parásitos en medio sin hemina, se observó un incremento significativo en la concentración del transcripto de *TcHTE*. Este resultado indica que el parásito reaccionaría ante la ausencia de hemo disponible aumentando la transcripción de *TcHTE*, posiblemente para incrementar la incorporación del cofactor. Resultados similares fueron reportados para las proteínas *CeHRG-4* y *LaHR1* [Huynh, *et al.*, 2012 - Yuan, *et al.*, 2012], aunque en estos casos, los cambios relativos fueron mayores.

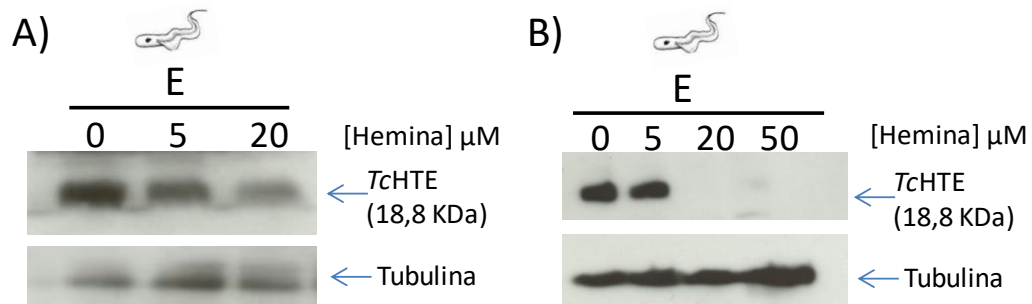
Estos resultados podrían dar lugar al siguiente modelo: durante el período de ayuno de hemo los parásitos continúan dividiéndose, diluyendo las reservas de hemo intracelular. En esta condición y con el fin de subsanar la situación de ayuno, se incrementaría la transcripción de los genes responsables de la incorporación del cofactor, aumentando la capacidad de transporte de hemo (encendido del sistema). En el caso de un incremento repentino en la concentración de hemina, el sistema de transporte de hemo encendido, provocaría una incorporación excesiva del cofactor. Esto llevaría a la necesidad de frenar la actividad del sistema mediante una disminución en los niveles de transcripto de *TcHTE* (apagado de la transcripción del gen), para evitar una acumulación excesiva de hemo intracelular. Aunque los mecanismos de regulación génica de este proceso permanecen desconocidos, es posible que el mismo hemo actúe como molécula señalizadora activando o reprimiendo la transcripción génica de *TcHTE* y/o la estabilidad de su ARNm. Se ha reportado que el hemo libre puede regular negativamente la expresión génica mediante la unión reversible a factores de transcripción como HAP1 en levaduras [Zitomer y Lowry, 1992] o Bach1 en mamíferos [Shan, *et al.*, 2004]. Sin embargo, el modo de acción en *T. cruzi* debería ser distinto debido a la ausencia de factores de transcripción canónicos y a que la transcripción génica en este organismo ocurre en forma policistrónica. En este caso, el hemo podría actuar durante los eventos de splicing o en el procesamiento del ARNm.

En conjunto, los resultados expuestos indicarían que los epimastigotes de *T. cruzi*, son capaces de modificar los niveles de transcripción de *TcHTE* con el fin de adaptarse a las variaciones en la disponibilidad de hemo. Esta forma de regular la transcripción dando

respuesta a las características del entorno, le permitiría al parásito adaptarse con facilidad a los cambios que podría encontrar en el tracto digestivo del insecto, donde la disponibilidad del cofactor dependen del régimen alimenticio del mismo.

#### **V.4.2.3.2 La acumulación de la proteína TcHTE en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* responde a la concentración de hemina en el medio de cultivo**

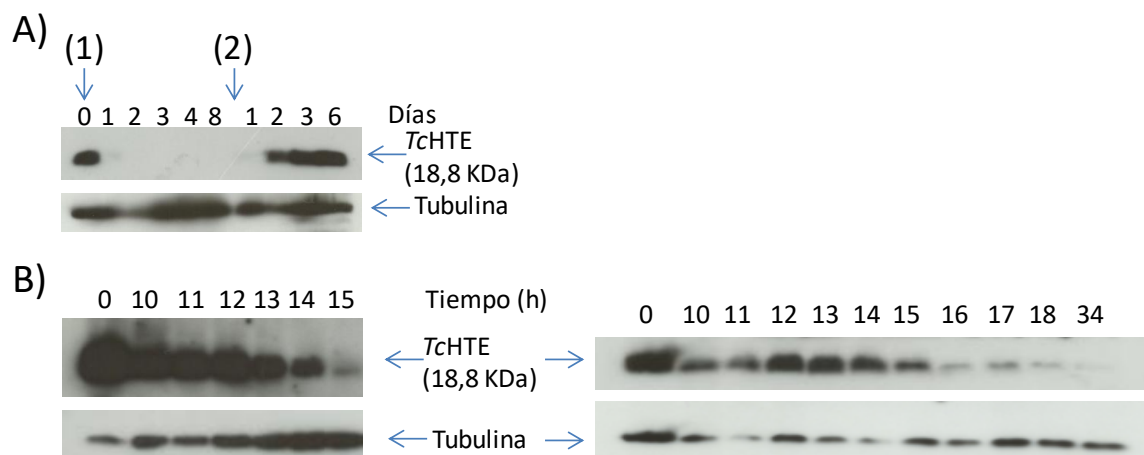
En función de los resultados obtenidos que muestran que la acumulación de la proteína TcHTE (Figura 56) así como del transcripto del gen (Figura 57) en epimastigotes de *T. cruzi* responde a la concentración de hemina en el medio de cultivo nos propusimos profundizar el estudio sobre la relación entre el hemo y TcHTE. Para ello se obtuvieron muestras de extractos celulares totales de epimastigotes incubados en medio LIT-10% SFB suplementados con diferentes concentraciones de hemina (entre 0 y 50  $\mu\text{M}$ ) y la presencia de TcHTE se detectó por ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo anti-P1TcHTE. Además, se evaluó la presencia de tubulina con anticuerpos específicos (anti- $\alpha$  tubulina clon TAT-1) como control de carga. En la Figura 58 se muestran 2 ensayos de Western blot representativos de al menos 5 repeticiones experimentales, en los cuales se observó una señal intensa correspondiente al tamaño esperado para TcHTE en la muestra perteneciente a los epimastigotes incubados en ausencia de hemina (0  $\mu\text{M}$ ). Dicha señal también estuvo presente en las muestras de epimastigotes que fueron incubados en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu\text{M}$  hemina, confirmando la presencia de la proteína TcHTE en estas condiciones. Por otro lado, cuando los epimastigotes se incubaron con 20  $\mu\text{M}$  hemina, la señal correspondiente a TcHTE disminuyó significativamente o no pudo ser detectada. A concentraciones mayores, por ejemplo 50  $\mu\text{M}$ , no se detectó la señal correspondiente a TcHTE, indicando que la proteína no se encontraría presente o que su concentración estaría por debajo de los límites de detección de la técnica. Estos resultados concuerdan con lo observado en los ensayos de transcripción del gen de TcHTE. Las diferencias observadas en la detección de TcHTE en la condición de 20  $\mu\text{M}$  hemina entre las diferentes réplicas experimentales (Figuras 58A y 58B), nos llevó a proponer que ésta sería una concentración de hemina límite donde la expresión de TcHTE no solo dependería de la concentración de hemina presente, sino también del tiempo de



**Figura 58. La acumulación de TcHTE en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* disminuye inversamente proporcional a la concentración de hemina agregada al medio de cultivo.** Ensayos de Western blot utilizando suero inmune anti-P1TcHTE para el reconocimiento de la proteína endógena TcHTE en extractos proteicos totales de epimastigotes (E), incubados por 48 h en 0, 5 y 20  $\mu\text{M}$  hemina (A), o 0, 5, 20 y 50  $\mu\text{M}$  hemina (B). Se utilizó anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (clon TAT-1) para el reconocimiento de tubulina como control de carga de los extractos totales.

incubación, y las condiciones previas en las que se encontraban los epimastigotes (es decir cuan satisfecha se encontraba su cuota de hemo intracelular).

Posteriormente decidimos evaluar la variación en la acumulación de la proteína TcHTE en función del tiempo cuando los epimastigotes eran sometidos a un cambio significativo de concentración de hemina. En primer lugar, los epimastigotes previamente crecidos en LIT-10% SFB con 5  $\mu\text{M}$  hemina, fueron transferidos a medio fresco con 30  $\mu\text{M}$  hemina y se tomaron muestras periódicamente cada día durante una semana. Luego los parásitos del mismo cultivo, fueron transferidos a un medio fresco sin hemina y se continuó tomando muestras periódicamente por otros 6 días. Las muestras fueron procesadas para la obtención de extractos proteicos totales como se describe en la sección IV.6 de Materiales y Métodos y luego la presencia de TcHTE se determinó por ensayos de Western blot utilizando los anticuerpos anti-P1TcHTE (como se describe en la sección IV.6.8 de Materiales y Métodos). Además, como en los ensayos anteriores, se ensayó la presencia de tubulina (anti- $\alpha$  tubulina clon TAT-1) como control de carga. Como se muestra en la Figura 59A, en las muestras de epimastigotes mantenidos en 5  $\mu\text{M}$  hemina, se detectó una señal intensa correspondiente a la proteína TcHTE. Pero esta señal resultó prácticamente indetectable luego de las primeras 24 h posteriores al agregado de hemina hasta 30  $\mu\text{M}$ . En las muestras tomadas los días posteriores no se detectó la proteína TcHTE. Luego de una semana en esta condición, cuando los epimastigotes fueron transferidos al medio de cultivo sin hemina, la señal



**Figura 59. La proteína *TcHTE* responde a cambios en la concentración de hemina producidos en el medio de cultivo.** Ensayos de Western blot utilizando suero inmune anti-P1*TcHTE* para el reconocimiento de la proteína de endógena *TcHTE* en extractos proteicos totales de epimastigotes de *T. cruzi*. A) Epimastigotes crecidos en 5  $\mu$ M fueron incubados en medio LIT-10% SFB 30  $\mu$ M hemina y se tomaron muestras diariamente durante una semana. Los epimastigotes remanentes fueron lavados e incubados en medio LIT-10% SFB sin hemina, tomando muestras diariamente por una semana. (1): Agregado de hemina hasta 30  $\mu$ M. (2) Lavado de los parásitos. B) Los epimastigotes crecidos en 5  $\mu$ M fueron incubados en medio LIT-10% SFB 30  $\mu$ M hemina y se tomaron muestras cada 1 hora. Se utilizó anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (don TAT-1) para el reconocimiento de tubulina como control de carga de los extractos totales.

correspondiente a *TcHTE* recuperó intensidad a partir de las 24 h del cambio de condición.

Debido a que el mayor cambio en la intensidad de la señal de *TcHTE* se observó en las primeras 24 h luego de someter a los epimastigotes a un aumento en la concentración de hemina, nos propusimos registrar los cambios en la acumulación de la proteína durante este período de tiempo. Para ello realizamos un ensayo similar al anterior, donde epimastigotes crecidos en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu$ M hemina fueron sometidos a un incremento en la concentración de hemina hasta 30  $\mu$ M, pero en este caso las muestras se tomaron cada 1 h luego del agregado de hemina. La presencia de *TcHTE* se analizó mediante ensayos de Western blot en las mismas condiciones que en los ensayos anteriores y se evaluó la presencia de tubulina (anti- $\alpha$  tubulina clon TAT-1) como control de carga. En la Figura 59B se muestran los resultados correspondientes a 2 repeticiones experimentales del mismo ensayo, donde se observó que la señal correspondiente a *TcHTE* comenzó a disminuir luego de 10 h de incrementar la concentración de hemina en el medio de cultivo, observándose un cambio considerable entre las muestras tomadas entre las 14 y 15 h de cultivo en el primer ensayo y entre las 15 y 16 h en el segundo.

Estos resultados muestran que ante un incremento repentino en la concentración hemina disponible, el parásito responde disminuyendo la cantidad de proteína TcHTE, en menos de 24 h. En este contexto es interesante destacar que la disminución de los niveles de TcHTE frente a un aumento repentino en la concentración de hemina fue más rápida (14-16 h) comparado con el cambio observado cuando se retira la hemina del medio de cultivo donde los parásitos responden aumentando la cantidad de TcHTE en 24 a 48 h.

En esta sección de resultados hemos demostrado que la acumulación de la proteína TcHTE, en epimastigotes de *T. cruzi*, varía acompañando cambios en la concentración de hemina en el medio de cultivo. Cuando los epimastigotes se encuentran en una situación de escasez o ausencia del cofactor, aumenta la cantidad de la proteína. A su vez, cuando se dispone de hemina en exceso, la acumulación de la proteína disminuye considerablemente hasta volverse indetectable por los ensayos de Western blot. De este modo, el parásito regularía la cantidad de TcHTE con el fin de adaptarse a los cambios en el entorno, coincidentemente con los cambios observados en las cantidades relativas de transcripto de TcHTE. Este hecho refuerza la hipótesis de que TcHTE participa directamente en el transporte de hemo en *T. cruzi*.

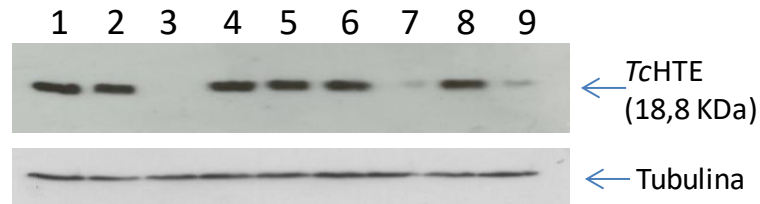
#### **V.4.2.3.3 La acumulación de la proteína TcHTE responde a los niveles intracelulares de hemo (HAs)**

En las secciones anteriores se estableció que los epimastigotes de *T. cruzi* son capaces regular tanto los niveles de transcripto como la acumulación de TcHTE para adaptarse a los cambios en la disponibilidad de hemo. Nos preguntamos entonces cual es la señal que desencadena la respuesta. ¿Los epimastigotes son capaces de detectar la concentración de hemo disponible en el medio de cultivo, o responden a los niveles de hemo intracelular? Para tratar de dar respuesta a este interrogante decidimos utilizar los AHs, con el fin de poder relacionar la incorporación de hemo (en este caso, los diferentes AHs) con los cambios en la cantidad de la proteína TcHTE. Como se estableció en la sección V.1.2 de Resultados, el ZnMP y el ZnPP pueden ser internalizados por los epimastigotes y amastigotes, mientras que el SnMP, no pudo ser detectado dentro del parásito en ninguno de los estadios del ciclo de vida. Valiéndonos de esta diferencia en cuanto a su incorporación, analizamos el efecto de la presencia de los diferentes AHs en

el medio de cultivo sobre la acumulación de la proteína *TcHTE*. Decidimos entonces, evaluar el efecto de un total de 5 o 20  $\mu\text{M}$  de hemina y HAs (5  $\mu\text{M}$  AHs o 5  $\mu\text{M}$  hemina + 15  $\mu\text{M}$  AHs), sabiendo que 5  $\mu\text{M}$  hemina es suficiente y necesario para el crecimiento de los epimastigotes y que 20  $\mu\text{M}$  no causa efectos tóxicos pero produce una disminución en la acumulación de *TcHTE*. Además, se utilizaron las condiciones de 0, 5 o 20  $\mu\text{M}$  hemina como control y referencia para evaluar la acumulación de *TcHTE*.

Para ello, epimastigotes crecidos en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu\text{M}$  hemina, fueron incubados en medio el mismo medio pero suplementado con 0, 5 o 20  $\mu\text{M}$  hemina, 5  $\mu\text{M}$  AHs, o 5  $\mu\text{M}$  hemina + 15  $\mu\text{M}$  AHs (dando un total 0, 5 o 20  $\mu\text{M}$  porfirina (hemo+HAs)) durante 72 h, y la presencia de *TcHTE* se evaluó mediante ensayos de Western blot en extractos proteicos totales utilizando los anticuerpos anti-P1*TcHTE* (sección IV.6.8 de Materiales y Métodos), y como control de carga se detectó la presencia de tubulina (anti- $\alpha$  tubulina clon TAT-1). En la Figura 60 se muestra un resultado representativo de 4 repeticiones experimentales, donde se observó una señal correspondiente a *TcHTE* en las muestras de epimastigotes incubados en medio LIT-10% SFB suplementado con 0 o 5  $\mu\text{M}$  hemina, mientras que esta señal no logró detectarse en las muestras de epimastigotes incubados en 20  $\mu\text{M}$  hemina, de forma coincidente con resultados anteriores (Figuras 56 y 58). Además se observó que los epimastigotes incubados en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu\text{M}$  AHs presentan una señal correspondiente a *TcHTE* de intensidad equivalente a la condiciones de 5  $\mu\text{M}$  hemina. También, una señal de similar intensidad se observó en las muestras provenientes de epimastigotes incubados con 5  $\mu\text{M}$  hemina + 15  $\mu\text{M}$  SnMP (20  $\mu\text{M}$  porfirina total), indicando que un incremento de la concentración de SnMP, que no es incorporado por el parásito, no produce ningún efecto en la acumulación de *TcHTE*. Por otro lado, cuando los epimastigotes fueron incubados en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu\text{M}$  hemina + 15  $\mu\text{M}$  ZnMP o ZnPP (20  $\mu\text{M}$  porfirina total) la señal correspondiente a *TcHTE* disminuyó considerablemente, similar a lo observado cuando los epimastigotes fueron incubados en la condición de 20  $\mu\text{M}$  hemina. Es decir, que un incremento en la concentración de hemina más los HAs que pueden ser internalizados por el parásito provocaron una disminución en la acumulación de *TcHTE*.

En conjunto, estos resultados indican que los cambios observados en la acumulación de *TcHTE* responderían a las concentraciones intracelulares de hemo (o AHs)



**Figura 60. La proteína TcHTE responde a la concentración intracelulares de hemo (o AHs).** Ensayo de Western blot utilizando suero inmune anti-P1TcHTE para el reconocimiento de la proteína de endógena TcHTE en extractos proteicos totales de epimastigotes de *T. cruzi*. Los epimastigotes crecidos en 5  $\mu\text{M}$  fueron incubados en medio LIT-10% SFB con diferentes cantidades de hemina, AHs o combinación de ambos. Calle 1: 0  $\mu\text{M}$  hemina. Calle 2: 5  $\mu\text{M}$  hemina. Calle 3: 20  $\mu\text{M}$  hemina. Calle 4: 5  $\mu\text{M}$  SnMP. Calle 5: 5  $\mu\text{M}$  hemina + 15  $\mu\text{M}$  SnMP. Calle 6: 5  $\mu\text{M}$  ZnMP. Calle 7: 5  $\mu\text{M}$  hemina + 15  $\mu\text{M}$  ZnMP. Calle 8: 5  $\mu\text{M}$  ZnPP. Calle 9: 5  $\mu\text{M}$  hemina + 15  $\mu\text{M}$  ZnPP. Se utilizó anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (clon TAT-1) para el reconocimiento de tubulina como control de carga de los extractos totales.

y es por ello que solo los análogos que son incorporados por el parásito podrían modular los niveles de acumulación de TcHTE detectada. Además, el hecho de que los AHs internalizados produzcan el mismo efecto que el hemo, indicaría que los mecanismos de reconocimiento de hemo intracelular no serían capaces de diferenciar entre estos compuestos de estructura similar. Estos resultados sugieren que el transporte de hemo estaría regulado por en función de la concentración intracelular disponible de este cofactor, apoyando la hipótesis que los epimastigotes de *T. cruzi* controlarían su cuota de hemo regulando su incorporación desde el medio extracelular.

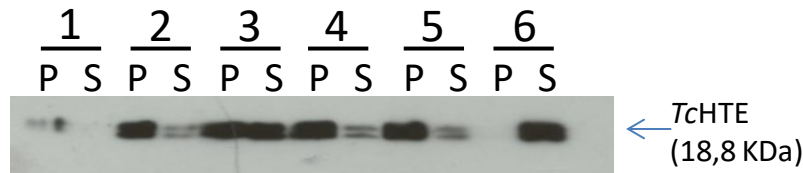
## **V.5 Estudio de la proteína TcHTE como posible transportador de hemo**

En este trabajo de Tesis hemos identificado una proteína a la que denominamos TcHTE, homóloga a aquellas que fueron descritas en *C. elegans*, *Leishmania spp.* y *T. brucei*, como las proteínas transportadoras de hemo en dichos organismos [Horakova, et al., 2017 - Huynh, et al., 2012 - Rajagopal, et al., 2008 - Renberg, et al., 2015 - Yuan, et al., 2012]. Hemos comprobado que TcHTE es capaz de facilitar el transporte de hemo tanto en levaduras *hem1 $\Delta$* , como en *T. cruzi*. También hemos comprobado que tanto la acumulación del transcrito y de la proteína responden a la presencia de hemo intracelular. Por otro lado, la expresión de TcHTE varía dependiendo del estadio del ciclo de vida del parásito. Sin embargo, los resultados hasta aquí presentados no demuestran que TcHTE sea el transportador de hemo en *T. cruzi*. Entre los motivos que permiten

cuestionar este hecho encontramos su tamaño reducido (171 AA) y que solo presentaría 4 regiones alfa hélice transmembrana. Frente a esto, y con el objetivo de discernir si *TcHTE* es un transportador de hemo nos propusimos resolver los siguientes interrogantes: ¿La proteína *TcHTE* es capaz de unir hemo? ¿Puede *TcHTE* actuar sola, o debe unirse a otras proteínas para cumplir su función? ¿*TcHTE* puede formar multímeros? Para tratar de obtener alguna respuesta, nos propusimos desarrollar diversas estrategias que se detallan a continuación.

### **V.5.1 Ensayos de unión a hemo por la proteína *TcHTE***

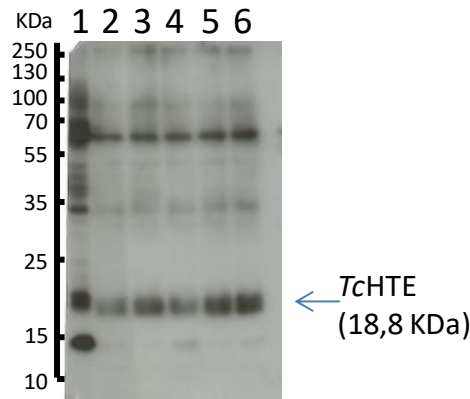
Para comprobar si *TcHTE* es capaz de unir hemo, se realizaron ensayos de cromatografía de afinidad utilizando resina de hemina-agarosa (hemina conjugada a agarosa, SIGMA-ALDRICH<sup>R</sup>) similares a los realizados para estudiar la unión a hemo por la proteína LABCG5 [Campos-Salinas, *et al.*, 2011]. Se diseñaron ensayos de competencia donde las muestras fueron tratadas con concentraciones crecientes de hemina (de 0 a 100  $\mu$ M) previo a su incubación con la resina de hemina-agarosa. De este modo, se esperaba recuperar mayor cantidad de proteína *TcHTE* en los eluidos de las muestras tratadas con la menor cantidad de hemina y se recuperaría menor cantidad de *TcHTE* en los eluidos de las incubadas con mayor cantidad de hemina. Para ello, primero fue necesario establecer las condiciones para la obtención de la proteína *TcHTE* en la fracción soluble, manteniendo su estructura nativa, a partir de extractos celulares totales de epimastigotes crecidos en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu$ M hemina. Ensayamos diferentes condiciones de lisis suave con una solución (50mM Tris pH 7,5, 500mM NaCl, 10% (v/v) Glicerol) que contuviera una concentración adecuada de los detergentes Tritón X-100, duodecil maltócido (DDM) o digitonina, disponibles en el laboratorio y como se describe en la sección IV.6.9 de Materiales y Métodos. También se utilizaron como control la misma solución con el agregado de SDS y la solución de lisis que contiene 8 M urea, que fuera empleada para la obtención de extractos en los demás ensayos similares (sección IV.6 de Materiales y Métodos). La presencia de *TcHTE* fue analizada por ensayos de Western blot, utilizando los anticuerpos anti-P1*TcHTE*, tanto en la fracción insoluble (pellet) como en la soluble (sobrenadante). En la Figura 61 se muestran los resultados obtenidos donde puede observarse la presencia de *TcHTE* en todos los pellets, excepto en



**Figura 61. Solubilidad de la proteína TcHTE utilizando diversos detergentes.** Ensayo de Western blot utilizando suero inmune anti-P1TcHTE para el reconocimiento de la proteína TcHTE en extractos proteicos totales de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con diferentes detergentes. P: pellet S: sobrenadante. 1: 0,1% Tritón X-100. 2: 1% Duodecil maltócido 3: 2% Digitonina. 4: 5% SDS. 5: 5% SDS + 9 M Urea. 6: 8 M Urea.

el control utilizando la solución que contiene 8 M de Urea y con diferente intensidad en las fracciones solubles. La señal má intensa correspondiente a TcHTE en las fracciones solubles correspondió a la muestra tratada con digitonina, por lo que fue el detergente elegido para la preparación de los extractos para evaluar la unión de TcHTE a la resina de hemin-agarosa.

Una vez establecidas estas condiciones, se prepararon extractos proteicos totales de epimastigotes crecidos en medio LIT-10% SFB con 5  $\mu$ M hemina en la solución de lisis (50mM Tris pH 7,5, 500mM NaCl, 10% Glicerol) con 2% p/v digitonina. Posteriormente, se recuperó la fracción soluble, se la incubó con concentraciones crecientes de hemina (0, 5, 20, 50, 100  $\mu$ M) por 30 min, y luego se realizó la incubación con la resina de hemin-agarosa ON en agitación suave a 4 °C. Seguidamente las muestras fueron tratadas para su análisis por ensayos de Western blot (sección IV.6.8 de Materiales y Métodos) que se muestran en la Figura 62. Sorprendentemente, los resultados obtenidos fueron opuestos a lo esperado. Las señales correspondientes a TcHTE fueron más intensas en aquellas muestras que fueron previamente incubadas con mayor concentración de hemina y además se observaron bandas de mayor tamaño al esperado. Considerando que la proteína TcHTE tiene un tamaño teórico de 18,8 KDa, las bandas de mayor tamaño podrían corresponder a la formación de dímeros o trímeros de la proteína, así como a su asociación a otras proteínas que formen parte del complejo responsable del transporte de hemo. También se analizó mediante ensayos de Western blot la presencia de tubulina en los eluidos de la resina con anticuerpos anti- $\alpha$  tubulina (clon TAT-1) como se detalló en todos los casos anteriores. Contrariamente a lo esperado, se observó una señal intensa correspondiente a la detección de tubulina en todos los eluidos (no mostrado). Estos resultados nos llevaron a pensar que la unión de las proteínas a la resina hemin-agarosa



**Figura 62. Ensayos de unión de la proteína TcHTE mediante cromatografía de afinidad utilizando resina de hemina-agarosa.** Ensayo de Western blot utilizando suero inmune anti-P1TcHTE para el reconocimiento de la proteína TcHTE en los eluidos de la purificación mediante columna de afinidad con resina de hemina-agarosa de extractos proteicos de epimastigotes de *T. cruzi*. Los extractos fueron previamente incubados con diferentes cantidades de hemina por 30 min. Calle 1: extracto total sin purificar. Calle 2: 0  $\mu\text{M}$  hemina. Calle3: 5  $\mu\text{M}$  hemina. Calle 4: 20  $\mu\text{M}$  hemina. Calle 5: 50  $\mu\text{M}$  hemina. Calle 6: 100  $\mu\text{M}$  hemina.

podría no ser una unión específica debido al reconocimiento del hemo por los sitios de unión de TcHTE, sino a una unión inespecífica. Para corroborar esta posibilidad, se planteó realizar otros controles como el tratamiento de las muestras con una resina de agarosa, previo a la incubación con la resina de hemina-agarosa con el fin de eliminar inespecificidades de unión. Sin embargo, por razones de tiempo, dichos controles no pudieron ser realizados al momento de escritura de esta Tesis. No obstante, los resultados obtenidos mediante estos ensayos sugieren la posibilidad de que TcHTE se encuentre formando multímeros, que podrían ser estabilizados por la presencia de hemina.

### V.5.2 Utilización de células HEK293-T para el estudio de TcHTE

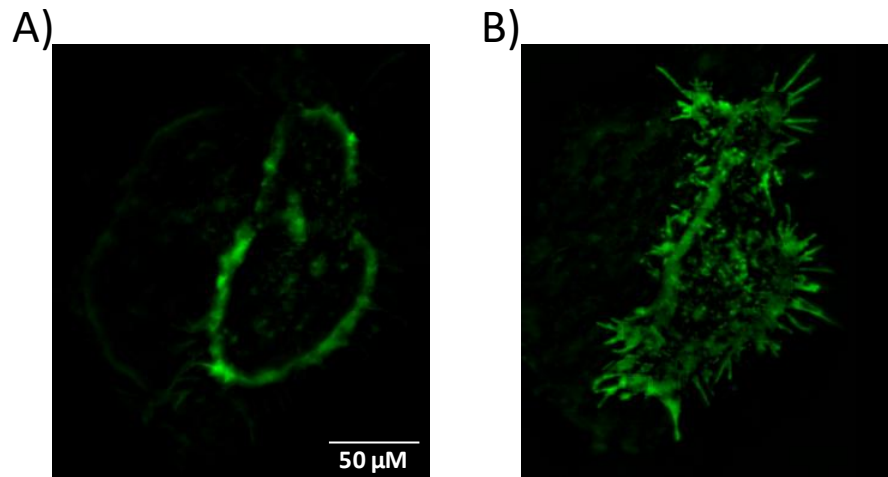
En los ensayos de Western blot de los experimentos de unión a hemo por TcHTE se observaron señales que corresponderían a proteínas de mayor peso molecular. Estas podrían interpretarse como dímeros o trímeros de TcHTE. Actualmente, la determinación del número de subunidades y la estequiometría de proteínas de membrana sin alterar su entorno es un desafío. En esta sección se muestran los resultados obtenidos durante una estadía en el laboratorio del Dr. Sebastián Brauchi en el Instituto de Fisiología de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Durante la misma, se realizaron diversos

ensayos de microscopía con el fin de estudiar la formación de multímero de TcHTE en un sistema de expresión en células HEK293-T.

Para la realización de estos ensayos, primero fue necesario la obtención de células HEK293-T que expresaran la proteína recombinante TcHTE-HIS-GFP. Se procedió entonces a clonar la secuencia codificante de la proteína de fusión en el vector de expresión para células eucariotas pcDNA3 entre los sitios de reconocimiento para las enzimas *Bam*HI y *Xba*I, dando como resultado el vector pcDNA3-TcHTE-HIS-GFP, tal como se introdujo en la sección V.2.3 de Resultados. Posteriormente se transfectaron células HEK293-T utilizando lipofectamina con el vector pcDNA3-TcHTE-HIS-GFP (sección IV.3.3.3.2 de Materiales y Métodos) y se analizó la localización de la proteína recombinante TcHTE-HIS-GFP tanto por microscopía de epifluorescencia como por TIRF-M (*Total Internal Reflected Fluorescence Microscopy*). Como puede verse en la Figura 63, la señal fluorescente verde correspondiente a la porción GFP de la proteína TcHTE-HIS-GFP se detectó en la membrana plasmática de las células HEK293-T transfectadas, siendo la resolución obtenida utilizando la tecnología TIRF-M muy superior a la obtenida por microscopía de epifluorescencia. Esto se debe a las características de la microscopía TIRF, en la cual el laser se hace incidir sobre la muestra de forma oblicua, de forma que es reflejado totalmente en la interface vidrio-muestra. De este modo la excitación de la muestra no es provocada directamente por el laser, sino por una onda electromagnética evanescente producida por fenómeno de reflexión. Esta onda evanescente posee la misma longitud de onda que la luz incidente, pero su poder de penetración es inferior a los 100 nm [Fish, 2009]. Esto tiene como resultado que solo las moléculas que se encuentran muy próximas a la interface vidrio-muestra sean excitadas y emitan señal fluorescente, reduciendo así el ruido de fondo.

### **V.5.2.1 TcHTE se expresa en la membrana celular de las células HEK293-T formando trímeros**

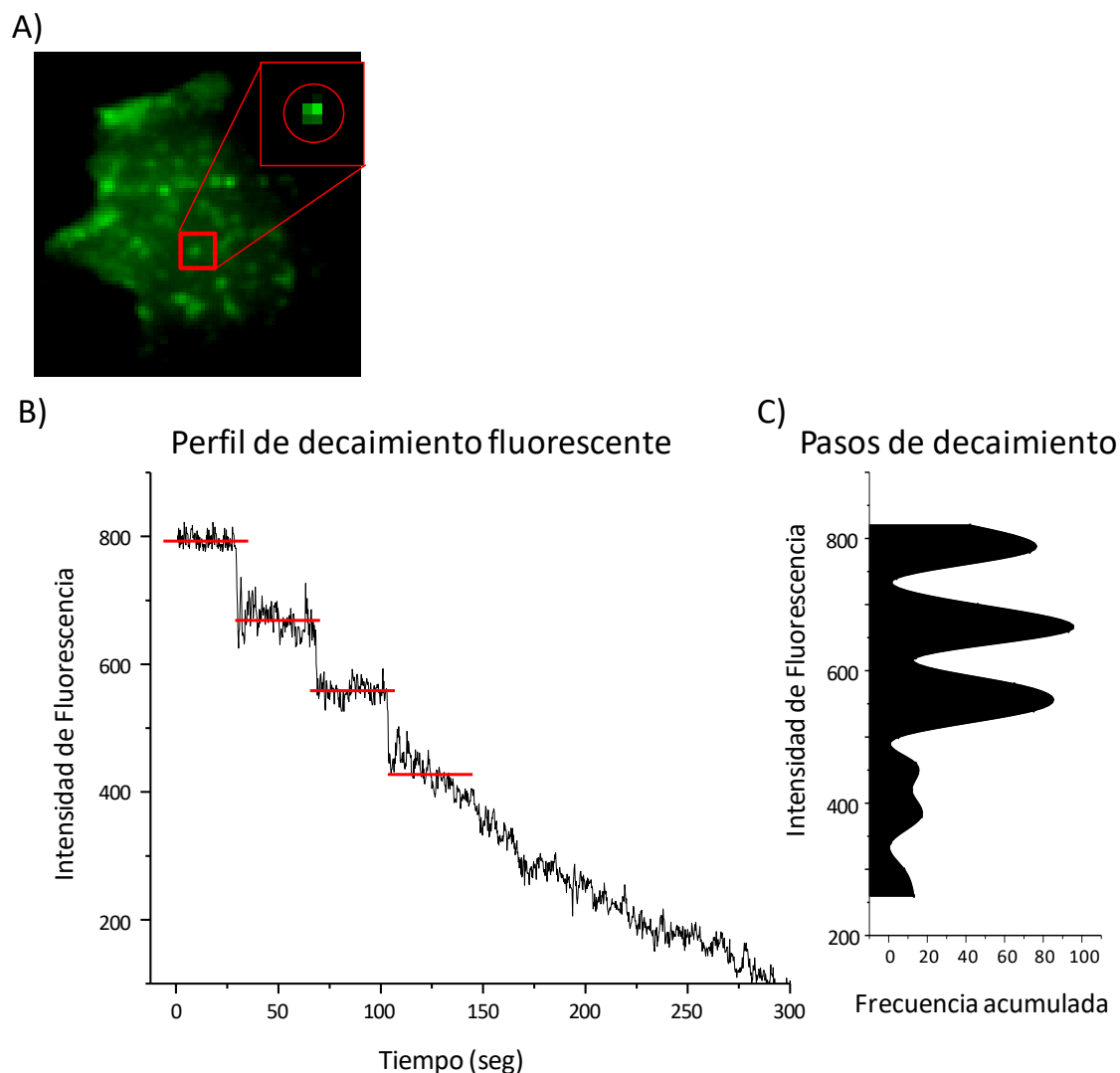
Una vez establecido que la proteína recombinante TcHTE-HIS-GFP se localiza en la membrana plasmática de las células HEK293-T, procedimos al estudio sobre la formación de multímeros por TcHTE utilizando la tecnología TIRF-M, tal como se describe en la sección IV.7.7 de Materiales y Métodos. El diseño experimental permitió hacer un análisis



**Figura 63.** La proteína recombinante *TcHTE-HIS-GFP* se localiza en la membrana plasmática de las células **HEK293-T**. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HEK293-T transformadas con el vector pcDNA3.*TcHTE-HIS-GFP*. A) Microscopía de epifluorescencia. B) Microscopía TIRF (Total Internal Reflected Fluorescence). Las imágenes son representativas de diferentes campos de experimentos independientes.

de molécula única sobre la membrana plasmática de células vivas, así como fue reportado para el estudio de otras proteínas [Trigo, *et al.*, 2013 - Ulbrich y Isacoff, 2007 - Veliz, *et al.*, 2010]. Dichos ensayos se valieron el apagado de la fluorescencia de la proteína GFP fusionada a la proteína de interés al ser incidida por un láser de alta intensidad (*photobleaching*) [Ulbrich y Isacoff, 2007], sumado a la alta resolución de la tecnología TIRF-M [Fish, 2009].

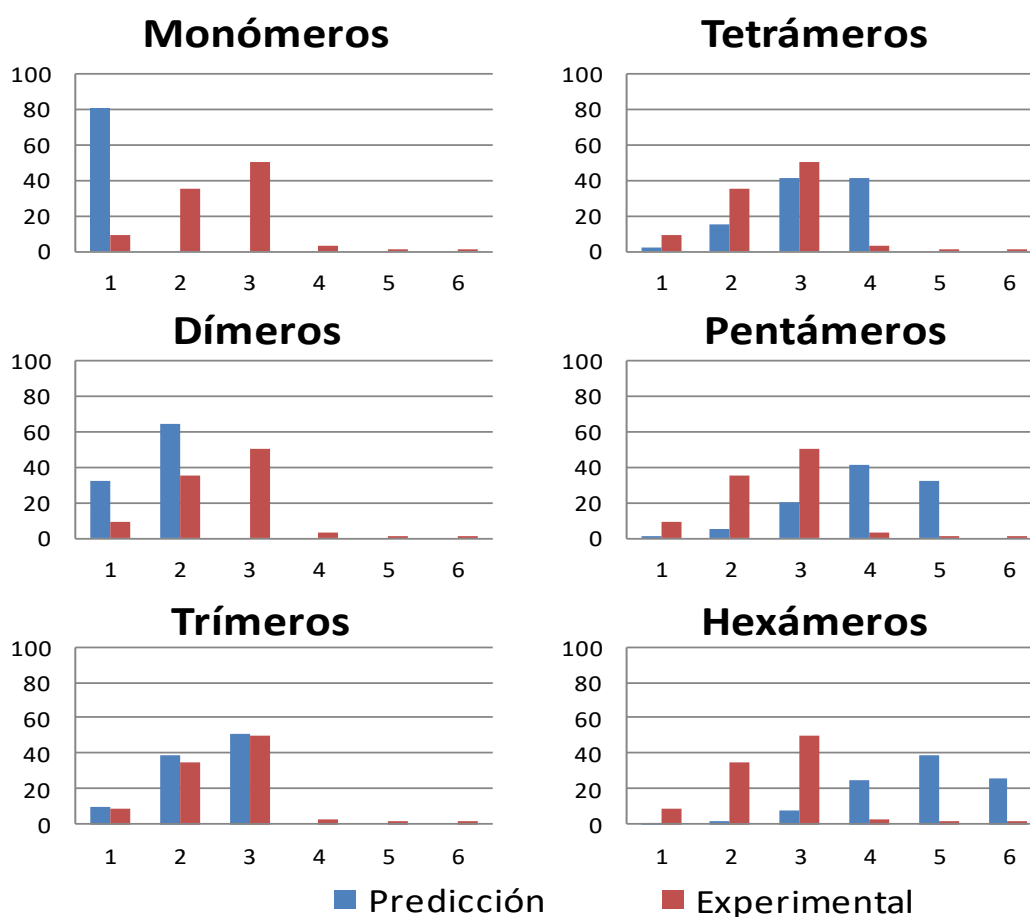
Los ensayos realizados consistieron en registrar la señal de fluorescencia correspondiente a GFP de células HEK293-T que expresaran la proteína recombinante *TcHTE-HIS-GFP* mientras se incidía un láser de alta intensidad de forma oblicua sobre la muestra, provocando el apagado de la misma. Posteriormente se analizó la intensidad de fluorescencia en función del tiempo, para cada punto emisor y se determinaron los pasos discretos de decaimiento fluorescente. Se analizaron los pasos de decaimiento de un total de 135 puntos emisores, provenientes de células HEK293-T transfectadas con el vector pcDNA3.*TcHTE-HIS-GFP* en no menos de 30 eventos de transfección independientes. En la Figura 64A se muestra de modo de ejemplo uno de los puntos emisores elegidos de un total de 135 puntos analizados. En la Figura 64B se muestra el perfil de decaimiento fluorescente que corresponde al apagado de las subunidades de GFP. En la Figura 64C se grafican las frecuencias relativas de los valores de intensidad de fluorescencia, donde se distinguen tres pasos discretos de decaimiento de la fluorescencia correspondientes al



**Figura 64.** La fluorescencia de la proteína recombinante TcHTE-HIS-GFP decae en pasos discretos. A) Imagen de microscopía TIRF de células HEK293-T que expresan la proteína de fusión TcHTE-HIS-GFP. B) Perfil de decaimiento fluorescente, obtenido a partir del análisis de la intensidad de fluorescencia de un punto emisor típico. C) Análisis de las frecuencias acumuladas donde se distinguen tres pasos de decaimiento discretos. Los datos mostrados son representativos de un total 135 puntos emisores analizados.

apagado de las subunidades de GFP. Si bien algunos de los puntos emisores decayeron su fluorescencia en uno y dos pasos, la mayoría de ellos mostraron un decaimiento en tres pasos. También se observó que algunos puntos fluorescentes decayeron en cuatro, cinco o seis pasos, pero fueron los casos minoritarios (menos del 6%). El conjunto de datos obtenidos se ajustó a una ecuación de distribución binomial que tiene en cuenta la cantidad de subunidades GFP presentes en el complejo, la probabilidad de que cada GFP emita fluorescencia y el número esperado de fuentes emisoras de fluorescencia en cada caso [Trigo, *et al.*, 2013] como se describe en la sección IV.7.7 de Materiales y Métodos.

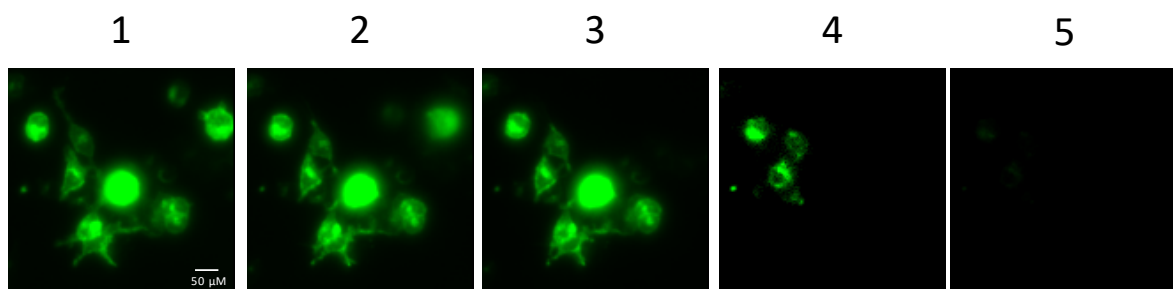
En la Figura 65 se muestra la comparación entre los datos obtenidos y los esperados en el caso de la formación de monómeros, dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros y exámeros, lo que nos permitió establecer que la estequiometría del complejo integrado por *TcHTE*-HIS-GFP correspondería a la formación de trímeros. Los puntos minoritarios que mostraron mayor número pasos de decaimiento podrían atribuirse a agregados de dos trímeros en la membrana, mientras que aquellos puntos emisores que mostraron menor cantidad de pasos de decaimiento fluorescente podrían atribuirse a la formación de trímeros donde alguna de las subunidades de GFP no emite fluorescencia por un plegamiento erróneo de la proteína, o no logra apagarse por la incidencia del láser.



**Figura 65. La proteína *TcHTE* se asocia formando trímeros.** Comparación entre los datos obtenidos experimentalmente y la predicción de cantidad de pasos de decaimiento calculadas según el ajuste binomial para la formación de monómeros, dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros y hexámeros. Los datos mostrados son representativos de un total 135 puntos emisores analizados.

### V.5.2.2 El extremo C-terminal de la proteína *TcHTE* se localiza hacia el interior celular

Posteriormente realizamos ensayos de protección a la degradación con proteasas similares a los efectuados en epimastigotes de *T. cruzi* (sección V.4.1.2.3 de Resultados), tal como se describe en la sección IV.7.7.2 de Materiales y Métodos. En este caso, las células HEK293-T que expresaban la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP, fueron lavadas con solución KHM (110 mM KAc, 20 mM HEPES pH 7,4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), tratadas con 8 mM Tripsina por 5 min, seguido de la inactivación de la Tripsina por el agregado de SFB. Luego las células fueron lavadas con solución KHM, permeabilizadas con 20 μM digitonina por 5 min y posteriormente tratadas nuevamente con 8 mM Tripsina, mientras se registraron imágenes de fluorescencia cada 20 ms durante todo el proceso. En la Figura 66, puede observarse que la señal de fluorescencia correspondiente a la GFP no se modificó frente al primer tratamiento con Tripsina, o por efecto de la permeabilización de la membrana con digitonina. La fluorescencia de la GFP solo se vio afectada cuando las células fueron tratadas con Tripsina luego de su permeabilización con digitonina. Este resultado indica que el extremo C-terminal de la proteína recombinante se encontró protegida de la acción de la Tripsina, es decir orientada hacia el interior de la célula. De este modo comprobamos que la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP presentó la misma topología al ser expresada en células HEK293-T como en *T. cruzi*, con su dominio C-terminal orientado del lado citoplasmático reforzando la posibilidad de que *TcHTE* conforme el mismo tipo de complejos en ambos organismos.



**Figura 66. La proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP posee su extremo C-terminal en el interior celular.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de célula HEK293-T transfectadas con el vector pcDNA.*TcHTE*-HIS-GFP. Los células recibieron los siguientes tratamientos consecutivos 1: PBS; 2: 8 mM Tripsina; 3: 20 μM Digitonina ; 4: 8 mM Tripsina (30 seg) 5: 8 mM Tripsina (1,5 min). Las imágenes son representativas de múltiples repeticiones experimentales.

Los resultados aquí expuestos brindan, por primera vez, datos estructurales de una de las proteínas de la familia HRG. Hemos confirmado que el extremo C-terminal de la proteína se encuentra hacia el lado citoplasmático de la célula, tal como se había predicho en los estudios bioinformáticos. Además, los ensayos de microscopía TIRF han permitido determinar que la proteína *TcHTE* se encontraría formando trímeros en la membrana plasmática de las células HEK293-T que expresan la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP. Esto nos permite proponer la formación de un homo-trímero de *TcHTE* que adoptaría una conformación de canal con 12 hélices transmembrana a través del cual el hemo podría ser transportado. Asimismo, estos resultados no descartan la posibilidad de que *TcHTE* se asocie a otras proteínas que puedan brindar la energía necesaria para el transporte [Cupello, *et al.*, 2011 - Lara, *et al.*, 2007], debiendo realizarse otros experimentos para corroborar o descartar esta hipótesis.

## **VI- Conclusiones**

Como objetivo general de este trabajo se propuso avanzar en la comprensión y caracterización del transporte de hemo en *T. cruzi*, sus requerimientos, regulación, así como procurar la identificación de proteínas que intervienen en este proceso.

Los resultados aquí expuestos nos permiten concluir que los epimastigotes de *T. cruzi* incorporan hemo del medio de cultivo de una forma controlada hasta suplir su cuota de hemo intracelular, reflejado en la ausencia de un incremento significativo en la concentración intracelular ante un aumento en la concentración de hemo disponible en el medio. Además, debido a que la adición de una concentración excesiva de hemina en el medio de cultivo, provocó alteraciones tanto en la motilidad como morfología de los epimastigotes, consideramos que la adición de hemina a una concentración de 5  $\mu$ M al medio LIT-10% SFB conforman la condición óptima para el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.

Hemos identificado a una proteína de *T. cruzi* a la cual denominamos *TcHTE*, homóloga a proteínas de la familia HRG. Los ensayos de protección frente a degradación por proteasas permitió, por primera vez para una proteína de la familia HRG, corroborar experimentalmente que el extremo C-terminal se encuentra localizado en el interior celular. Por otro lado, no todos los aminoácidos reportados como esenciales para las proteínas HRG de diferentes organismos se encuentran conservados en *TcHTE*, siendo necesarios otros estudios para determinar cuales son los aminoácidos esenciales para el funcionamiento de la proteína de *T. cruzi*.

Los ensayos de complementación heteróloga en *S. cerevisiae hem1 $\Delta$*  mostraron que *TcHTE* facilita el transporte de hemo, y su localización en la membrana plasmática de las levaduras concuerda la localización de una proteína cuya función esté relacionada al transporte de metabolitos hacia el interior celular.

La obtención de parásitos transfectantes que expresen las proteínas recombinantes *TcHTE-HIS* y *TcHTE-HIS-GFP* permitieron establecer una relación directa entre esta proteína y la incorporación de hemo por epimastigotes. El análisis de la proteína recombinante *TcHTE-HIS-GFP*, mostró que se localizaría en el bolsillo flagelar de epimastigotes, y en tripomastigotes. Por otro lado, la localización en amastigotes no resultó inequívoca encontrándose mayoritariamente en la región del bolsillo flagelar,

pero también sobre la membrana plasmática donde podría contribuir a la incorporación de hemo.

La utilización de los AHs como herramienta para el estudio del transporte de hemo, nos permitió determinar que *T. cruzi* sería capaz de incorporar hemo solo en los estadios replicativos de su ciclo de vida. Además, es en estos estadios donde se detectaron mayores cantidades de proteína y transcripto de *TcHTE*. En epimastigotes demostramos que los niveles de transcripto y de acumulación de la proteína *TcHTE* se ven modulados por las variaciones de concentración de hemina (fuente de hemo) en el medio de cultivo, así como ocurre para las otras proteínas de la familia HRG. Sumado a esto, los cambios observados en la acumulación de *TcHTE* en epimastigotes frente a las variaciones en la concentración de hemina o AHs y su relación con las variaciones en la concentración intracelular de hemo, nos permiten proponer que *T. cruzi* presentaría un mecanismo capaz de censar los niveles intracelulares de hemo y de esta forma adaptar los niveles de expresión de la proteína *TcHTE* para poder regular la actividad de transporte de este cofactor.

Si bien los ensayos de unión a hemo mediante cromatografía de afinidad con resina de hemina-agarosa no son concluyentes, la observación de señales de mayor peso molecular nos permitió hipotetizar que la proteína *TcHTE* podría formar multímeros para cumplir su función. Los ensayos de microscopía TIRF realizados en células HEK293-T permitieron determinar la proteína recombinante *TcHTE*-HIS-GFP formaría trímeros y esto posibilitaría la formación de un canal por el cual podría ingresar el hemo.

En función de los resultados obtenidos, podemos proponer el siguiente modelo para la incorporación de hemo. *T. cruzi* solo incorpora hemo en los estadios replicativos, mediante la expresión de un complejo proteico que involucraría la participación de trímeros de *TcHTE*. Si bien la regulación de la expresión del complejo es incierta, ésta respondería a los niveles intracelulares de hemo. Es así que cuando los niveles de hemo son bajos, la transcripción del gen que codifica para *TcHTE* se incrementa, y en consecuencia, lo hacen los niveles de proteína. Una vez que el parásito incorpora suficiente hemo para cubrir sus requerimientos, se gatillaría una señal (aún desconocida) que produce la disminución de los niveles de transcripto para *TcHTE*, y en consecuencia

también disminuyen los niveles de proteína y el transporte de hemo, evitando así los efectos tóxicos que podría provocar un exceso del cofactor.

En síntesis, los resultados presentados en este trabajo de Tesis de doctorado han permitido profundizar el conocimiento general sobre los requerimientos de hemo por *T. cruzi*. Especialmente hemos estudiado la proteína TcHTE, como posible responsable del transporte de hemo, presentando resultados novedosos que permiten comprender en parte como es la incorporación de hemo en este parásito relevante para la salud humana. Considerando que el transporte de hemo es esencial para el desarrollo del parásito, completar la elucidación de esta vía, identificando otras proteínas que participen en el proceso, y estableciendo los mecanismos de regulación, permitirán identificar nuevos blancos moleculares que, luego de ser validados, podrían ser utilizados como estrategias para la inhibición de la proliferación de *T. cruzi*.

## **VII- Bibliografía**

- 1 - Akilov O. E., Kosaka S., O'Riordan K. y Hasan T. (2007) Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp Dermatol* - 16, 651-660
- 2 - Alarcon de Noya B., Diaz-Bello Z., Colmenares C., Ruiz-Guevara R., Mauriello L., Zavala-Jaspe R., Suarez J. A., Abate T., Naranjo L., Paiva M., Rivas L., Castro J., Marques J., Mendoza I., Acquatella H., Torres J. y Noya O. (2010) Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* - 201, 1308-1315
- 3 - Alcantara C. L., Vidal J. C., de Souza W. y Cunha-e-Silva N. L. (2014) The three-dimensional structure of the cytostome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Cell Sci* - 127, 2227-2237
- 4 - Alonso V. L., Ritagliati C., Cribb P. y Serra E. C. (2014) Construction of three new Gateway(R) expression plasmids for *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* - 109, 1081-1085
- 5 - Andrade L. O. y Andrews N. W. (2005) The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol* - 3, 819-823
- 6 - Angheben A., Boix L., Buonfrate D., Gobbi F., Bisoffi Z., Pupella S., Gandini G. y Aprili G. (2015) Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* - 13, 540-550
- 7 - Anzaldi L. L. y Skaar E. P. (2010) Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect Immun* - 78, 4977-4989
- 8 - Atamna H. y Ginsburg H. (1995) Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. *J Biol Chem* - 270, 24876-24883
- 9 - Atwood J. A., 3rd, Weatherly D. B., Minning T. A., Bundy B., Cavola C., Opperdoes F. R., Orlando R. y Tarleton R. L. (2005) The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* - 309, 473-476
- 10 - Barrias E. S., de Carvalho T. M. y De Souza W. (2013) *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol* - 4, 186
- 11 - Batista M., Marchini F. K., Celedon P. A., Fragoso S. P., Probst C. M., Preti H., Ozaki L. S., Buck G. A., Goldenberg S. y Krieger M. A. (2010) A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol* - 10, 259
- 12 - Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler C., Blandin G., Renauld H., Bartholomeu D. C., Lennard N. J., Caler E., Hamlin N. E., Haas B., Bohme U., Hannick L., Aslett M. A., Shallom J., Marcello L., Hou L., Wickstead B., Alsmark U. C., Arrowsmith C., Atkin R. J., Barron A. J., Bringaud F., Brooks K., Carrington M., Cherevach I., Chillingworth T. J., Churcher C., Clark L. N., Corton C. H., Cronin A., Davies R. M., Doggett J., Djikeng A., Feldblyum T., Field M. C., Fraser A., Goodhead I., Hance Z., Harper D., Harris B. R., Hauser H., Hostetler J., Ivens A., Jagels K., Johnson D., Johnson J., Jones K., Kerhornou A. X., Koo H., Larke N., Landfear S., Larkin C., Leech V., Line A., Lord A., Macleod A., Mooney P. J., Moule S., Martin D. M., Morgan G. W., Mungall K., Norbertczak H., Ormond D., Pai G., Peacock C. S., Peterson J., Quail M. A., Rabbinowitsch E., Rajandream M. A., Reitter C., Salzberg S. L., Sanders M., Schobel S., Sharp S., Simmonds M., Simpson A. J., Tallon L., Turner C. M., Tait A., Tivey A. R., Van Aken S., Walker D., Wanless D., Wang S., White B., White O., Whitehead S., Woodward J., Wortman J., Adams M. D., Embley T. M., Gull K., Ullu E., Barry J. D., Fairlamb A. H.,

- Opperdoes F., Barrell B. G., Donelson J. E., Hall N., Fraser C. M., Melville S. E. y El-Sayed N. M. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* - 309, 416-422
- 13 - Berry E. A. y Trumpower B. L. (1987) Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem* - 161, 1-15
- 14 - Buchensky C., Almiron P., Mantilla B. S., Silber A. M. y Cricco J. A. (2010) The *Trypanosoma cruzi* proteins TcCox10 and TcCox15 catalyze the formation of heme A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* - 312, 133-141
- 15 - Burchmore R. J. y Hart D. T. (1995) Glucose transport in amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* - 74, 77-86
- 16 - Cabello-Donayre M., Malagarie-Cazenave S., Campos-Salinas J., Galvez F. J., Rodriguez-Martinez A., Pineda-Molina E., Orrego L. M., Martinez-Garcia M., Sanchez-Canete M. P., Estevez A. M. y Perez-Victoria J. M. (2016) Trypanosomatid parasites rescue heme from endocytosed hemoglobin through lysosomal HRG transporters. *Mol Microbiol* - 101, 895-908
- 17 - Camargo E. P. (1964) Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* - 6, 93-100
- 18 - Campos-Salinas J., Cabello-Donayre M., Garcia-Hernandez R., Perez-Victoria I., Castanys S., Gamarro F. y Perez-Victoria J. M. (2011) A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. *Mol Microbiol* - 79, 1430-1444
- 19 - Cardoso M. S., Reis-Cunha J. L. y Bartholomeu D. C. (2015) Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front Immunol* - 6, 659
- 20 - Carvalho S., Cruz T., Santarem N., Castro H., Costa V. y Tomas A. M. (2009) Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. *Acta Trop* - 109, 131-135
- 21 - Clark A. D. B., P. O. H., F. H., M. S., A. F. y G. G. (2002) Guidelines on: Antibody Production. Canadian council on animal care. -
- 22 - Clayton J. (2010) Chagas disease 101. *Nature* - 465, S4-5
- 23 - Coura J. R. (2006) [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* - 39 Suppl 3, 113-117
- 24 - Coura J. R. y Vinas P. A. (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* - 465, S6-7
- 25 - Crisp R. J., Pollington A., Galea C., Jaron S., Yamaguchi-Iwai Y. y Kaplan J. (2003) Inhibition of heme biosynthesis prevents transcription of iron uptake genes in yeast. *J Biol Chem* - 278, 45499-45506
- 26 - Cunha-e-Silva N., Sant'Anna C., Pereira M. G., Porto-Carreiro I., Jeovanio A. L. y de Souza W. (2006) Reservosomes: multipurpose organelles? *Parasitol Res* - 99, 325-327
- 27 - Cupello M. P., Souza C. F., Buchensky C., Soares J. B., Laranja G. A., Coelho M. G., Cricco J. A. y Paes M. C. (2011) The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta Trop* - 120, 211-218

- 28 - Chagas C. (1909) Nova trypanozomíaze humana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, tomo1, pp.159-218 -
- 29 - Chang K. P., Chang C. S. y Sassa S. (1975) Heme biosynthesis in bacterium- protozoan symbioses: enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbiotes. Proc Natl Acad Sci U S A - 72, 2979-2983
- 30 - Chen C., Samuel T. K., Krause M., Dailey H. A. y Hamza I. (2012) Heme utilization in the *Caenorhabditis elegans* hypodermal cells is facilitated by heme-responsive gene-2. J Biol Chem - 287, 9601-9612
- 31 - Chen C., Samuel T. K., Sinclair J., Dailey H. A. y Hamza I. (2011) An intercellular heme-trafficking protein delivers maternal heme to the embryo during development in *C. elegans*. Cell - 145, 720-731
- 32 - Chen J. J. y London I. M. (1995) Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. Trends Biochem Sci - 20, 105-108
- 33 - De Souza W. (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des - 8, 269-285
- 34 - de Souza W. (2008) An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. Curr Pharm Des - 14, 822-838
- 35 - de Souza W., de Carvalho T. M. y Barrias E. S. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol - 2010,
- 36 - de Souza W., Sant'Anna C. y Cunha-e-Silva N. L. (2009) Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. Prog Histochem Cytochem - 44, 67-124
- 37 - Dereeper A., Audic S., Claverie J. M. y Blanc G. (2010) BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. BMC Evol Biol - 10, 8
- 38 - Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J. F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J. M. y Gascuel O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res - 36, W465-469
- 39 - Dobson L., Remenyi I. y Tusnady G. E. (2015) CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server. Nucleic Acids Res - 43, W408-412
- 40 - Eger I. y Soares M. J. (2012) Endocytosis in *Trypanosoma cruzi* (Euglenozoa: Kinetoplastea) epimastigotes: visualization of ingested transferrin-gold nanoparticle complexes by confocal laser microscopy. J Microbiol Methods - 91, 101-105
- 41 - El-Sayed N. M., Myler P. J., Bartholomeu D. C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A. N., Ghedin E., Worthey E. A., Delcher A. L., Blandin G., Westerberger S. J., Caler E., Cerqueira G. C., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P., Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D. A., Carrington M., Crabtree J., Darban H., da Silveira J. F., de Jong P., Edwards K., Englund P. T., Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A. C., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M. J., Lorenzi H., Louie T., Machado C. R., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J. C., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J. L., Rinta J., Robertson L., Salzberg S. L., Sanchez D. O., Seyler A., Shama R., Shetty J., Simpson A. J., Sisk E., Tammi M. T., Tarleton R.,

- Teixeira S., Van Aken S., Vogt C., Ward P. N., Wickstead B., Wortman J., White O., Fraser C. M., Stuart K. D. y Andersson B. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* - 309, 409-415
- 42 - Fernandes M. C. y Andrews N. W. (2012) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol Rev* - 36, 734-747
- 43 - Fish K. N. (2009) Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Curr Protoc Cytom* - Chapter 12, Unit12 18
- 44 - Gietz R. D. y Woods R. A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* - 350, 87-96
- 45 - Hach A., Hon T. y Zhang L. (1999) A new class of repression modules is critical for heme regulation of the yeast transcriptional activator Hap1. *Mol Cell Biol* - 19, 4324-4333
- 46 - Hamza I. y Dailey H. A. (2012) One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim Biophys Acta* - 1823, 1617-1632
- 47 - Hanna D. A., Harvey R. M., Martinez-Guzman O., Yuan X., Chandrasekharan B., Raju G., Outten F. W., Hamza I. y Reddi A. R. (2016) Heme dynamics and trafficking factors revealed by genetically encoded fluorescent heme sensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* - 113, 7539-7544
- 48 - Hendriksen C. F. (2005) Introduction: laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities. *ILAR J* - 46, 227-229
- 49 - Hernández J. (2013) Estudio del requerimiento de hemo en *Trypanosoma cruzi*. Caracterización del transportador hipotético de hemo TcHR1 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesina de grado, Licenciatura en Biotecnología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina. -
- 50 - Horakova E., Changmai P., Vancova M., Sobotka R., Van Den Abbeele J., Vanhollebeke B. y Lukes J. (2017) The *Trypanosoma brucei* TbHrg protein is a heme transporter involved in the regulation of stage-specific morphological transitions. *J Biol Chem* - 292, 6998-7010
- 51 - Huynh C., Yuan X., Miguel D. C., Renberg R. L., Protchenko O., Philpott C. C., Hamza I. y Andrews N. W. (2012) Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1. *PLoS Pathog* - 8, e1002795
- 52 - Jani D., Nagarkatti R., Beatty W., Angel R., Slobodnick C., Andersen J., Kumar S. y Rathore D. (2008) HDP-a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathog* - 4, e1000053
- 53 - Khan A. A. y Quigley J. G. (2011) Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochim Biophys Acta* - 1813, 668-682
- 54 - Kim D., Yukl E. T., Moenne-Loccoz P. y Montellano P. R. (2006) Fungal heme oxygenases: Functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry* - 45, 14772-14780
- 55 - Kolaskar A. S. y Tongaonkar P. C. (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* - 276, 172-174

- 56 - Koreny L., Lukes J. y Obornik M. (2010) Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? *Int J Parasitol* - 40, 149-156
- 57 - Koreny L., Obornik M. y Lukes J. (2013) Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites. *PLoS Pathog* - 9, e1003088
- 58 - Krishnamurthy G., Vikram R., Singh S. B., Patel N., Agarwal S., Mukhopadhyay G., Basu S. K. y Mukhopadhyay A. (2005) Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket. *J Biol Chem* - 280, 5884-5891
- 59 - Krishnamurthy P., Xie T. y Schuetz J. D. (2007) The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther* - 114, 345-358
- 60 - Kumar S. y Bandyopadhyay U. (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* - 157, 175-188
- 61 - Landfear S. M. y Ignatushchenko M. (2001) The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* - 115, 1-17
- 62 - Lara F. A., Sant'anna C., Lemos D., Laranja G. A., Coelho M. G., Reis Salles I., Michel A., Oliveira P. L., Cunha E. S. N., Salmon D. y Paes M. C. (2007) Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* - 355, 16-22
- 63 - Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. y Higgins D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* - 23, 2947-2948
- 64 - Lathrop J. T. y Timko M. P. (1993) Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science* - 259, 522-525
- 65 - Lee B. Y., Bacon K. M., Bottazzi M. E. y Hotez P. J. (2013) Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* - 13, 342-348
- 66 - Lieu P. T., Heiskala M., Peterson P. A. y Yang Y. (2001) The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med* - 22, 1-87
- 67 - Lombardo M. E., Araujo L. S. y Batlle A. (2003) 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem Cell Biol* - 35, 1263-1271
- 68 - Menendez Bravo S. M. (2011) Estudio de proteínas mitocondriales de *trypanosoma cruzi* involucradas en el metabolismo de hemo. Tesina de grado. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina. -
- 69 - Merli M. L. (2016b) Transporte de hemo y biosíntesis de hemo A en *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina. -
- 70 - Merli M. L., Cirulli B. A., Menendez-Bravo S. M. y Cricco J. A. (2017) Heme A synthesis and CcO activity are essential for *Trypanosoma cruzi* infectivity and replication. *Biochem J* - 474, 2315-2332

- 71 - Merli M. L., Pagura L., Hernandez J., Barison M. J., Pral E. M., Silber A. M. y Cricco J. A. (2016) The Trypanosoma cruzi Protein TcHTE Is Critical for Heme Uptake. PLoS Negl Trop Dis - 10, e0004359
- 72 - Miguel D. C., Flannery A. R., Mitra B. y Andrews N. W. (2013) Heme uptake mediated by LHR1 is essential for Leishmania amazonensis virulence. Infect Immun - 81, 3620-3626
- 73 - Mumberg D., Muller R. y Funk M. (1994) Regulatable promoters of Saccharomyces cerevisiae: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. Nucleic Acids Res - 22, 5767-5768
- 74 - Nambu S., Matsui T., Goulding C. W., Takahashi S. y Ikeda-Saito M. (2013) A new way to degrade heme: the Mycobacterium tuberculosis enzyme MhuD catalyzes heme degradation without generating CO. J Biol Chem - 288, 10101-10109
- 75 - Ogawa K., Sun J., Taketani S., Nakajima O., Nishitani C., Sassa S., Hayashi N., Yamamoto M., Shibahara S., Fujita H. y Igarashi K. (2001) Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. EMBO J - 20, 2835-2843
- 76 - Panek H. y O'Brian M. R. (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. Microbiology - 148, 2273-2282
- 77 - Perez-Morga D., Vanhollebeke B., Paturiaux-Hanocq F., Nolan D. P., Lins L., Homble F., Vanhamme L., Tebabi P., Pays A., Poelvoorde P., Jacquet A., Brasseur R. y Pays E. (2005) Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. Science - 309, 469-472
- 78 - Porto-Carreiro I., Attias M., Miranda K., De Souza W. y Cunha-e-Silva N. (2000) Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. Eur J Cell Biol - 79, 858-869
- 79 - Protchenko O. y Philpott C. C. (2003) Regulation of intracellular heme levels by HMX1, a homologue of heme oxygenase, in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem - 278, 36582-36587
- 80 - Pyrih J., Harant K., Martincova E., Sutak R., Lesuisse E., Hrdy I. y Tachezy J. (2014) Giardia intestinalis incorporates heme into cytosolic cytochrome b(5). Eukaryot Cell - 13, 231-239
- 81 - Qi Z., Hamza I. y O'Brian M. R. (1999) Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. Proc Natl Acad Sci U S A - 96, 13056-13061
- 82 - Rajagopal A., Rao A. U., Amigo J., Tian M., Upadhyay S. K., Hall C., Uhm S., Mathew M. K., Fleming M. D., Paw B. H., Krause M. y Hamza I. (2008) Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. Nature - 453, 1127-1131
- 83 - Ramos T. C., Freymuller-Haapalainen E. y Schenkman S. (2011) Three-dimensional reconstruction of Trypanosoma cruzi epimastigotes and organelle distribution along the cell division cycle. Cytometry A - 79, 538-544
- 84 - Rao A. U., Carta L. K., Lesuisse E. y Hamza I. (2005) Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. Proc Natl Acad Sci U S A - 102, 4270-4275

- 85 - Rassi A., Jr., Rassi A. y Marin-Neto J. A. (2010) Chagas disease. *Lancet* - 375, 1388-1402
- 86 - Renberg R. L., Yuan X., Samuel T. K., Miguel D. C., Hamza I., Andrews N. W. y Flannery A. R. (2015) The Heme Transport Capacity of LHR1 Determines the Extent of Virulence in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* - 9, e0003804
- 87 - Ribeiro M., Nitz N., Santana C., Moraes A., Hagstrom L., Andrade R., Rios A., Sousa A., Dallago B., Gurgel-Goncalves R. y Hecht M. (2016) Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp Parasitol* - 162, 1-6
- 88 - Rodgers K. R. (1999) Heme-based sensors in biological systems. *Curr Opin Chem Biol* - 3, 158-167
- 89 - Sah J. F., Ito H., Kolli B. K., Peterson D. A., Sassa S. y Chang K. P. (2002) Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. *J Biol Chem* - 277, 14902-14909
- 90 - Sakamoto H., Sugishima M., Omata Y., Kakuta Y., Fukuyama K., Palmer G. y Noguchi M. (2002) Structure and reaction mechanism of heme oxygenase-1. *International Congress Series* - 1233, 177-183
- 91 - Salzman T. A., Stella A. M., Wider de Xifra E. A., Batlle A. M., Docampo R. y Stoppani A. O. (1982) Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B* - 72, 663-667
- 92 Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. 1989 *Molecular Cloning: a laboratory manual*
- 93 - Sartorello R., Budu A., Bagnaresi P., Fernandes C. A., Sato P. M., Bueno V. B., Fontes M. R., Oliveira P. L., Paiva-Silva G. O., Alves S. V., Netto L. E., Catalani L. H. y Garcia C. R. (2010) In vivo uptake of a haem analogue Zn protoporphyrin IX by the human malaria parasite *P. falciparum*-infected red blood cells. *Cell Biol Int* - 34, 859-865
- 94 - Sasse R. y Gull K. (1988) Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* - 90 ( Pt 4), 577-589
- 95 - Schmitt M. P. (1999) Identification of a two-component signal transduction system from *Corynebacterium diphtheriae* that activates gene expression in response to the presence of heme and hemoglobin. *J Bacteriol* - 181, 5330-5340
- 96 - Schneider C. A., Rasband W. S. y Eliceiri K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* - 9, 671-675
- 97 - Schofield C. J., Jannin J. y Salvatella R. (2006) The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* - 22, 583-588
- 98 - Schuster F. L. y Sullivan J. J. (2002) Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin Microbiol Rev* - 15, 374-389
- 99 - Severance S. y Hamza I. (2009) Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chem Rev* - 109, 4596-4616

- 100 - Severance S., Rajagopal A., Rao A. U., Cerqueira G. C., Mitreva M., El-Sayed N. M., Krause M. y Hamza I. (2010) Genome-wide analysis reveals novel genes essential for heme homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* - 6, e1001044
- 101 - Shan Y., Lambrecht R. W., Ghaziani T., Donohue S. E. y Bonkovsky H. L. (2004) Role of Bach-1 in regulation of heme oxygenase-1 in human liver cells: insights from studies with small interfering RNAs. *J Biol Chem* - 279, 51769-51774
- 102 - Silber A. M., Tonelli R. R., Lopes C. G., Cunha-e-Silva N., Torrecilhas A. C., Schumacher R. I., Colli W. y Alves M. J. (2009) Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* - 168, 102-108
- 103 - Souto-Padron T., de Carvalho T. U., Chiari E. y de Souza W. (1984) Further studies on the cell surface charge of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* - 41, 215-225
- 104 - Souza W. (2008) Electron microscopy of trypanosomes--a historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz* - 103, 313-325
- 105 - Souza W. (2009) Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* - 104 Suppl 1, 89-100
- 106 - Stecconi-Silva R. B., Andreoli W. K. y Mortara R. A. (2003) Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* - 98, 953-958
- 107 - Taylor M. C. y Kelly J. M. (2010) Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology* - 137, 899-917
- 108 - Taylor M. C. y Kelly J. M. (2006) pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol* - 6, 32
- 109 - Teixeira D. E., Benchimol M., Crepaldi P. H. y de Souza W. (2012) Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* - 6, e1749
- 110 - Tetaud E., Bringaud F., Chabas S., Barrett M. P. y Baltz T. (1994) Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* - 91, 8278-8282
- 111 - Toh S. Q., Glanfield A., Gobert G. N. y Jones M. K. (2010) Heme and blood-feeding parasites: friends or foes? *Parasit Vectors* - 3, 108
- 112 - Tong Y. y Guo M. (2009) Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch Biochem Biophys* - 481, 1-15
- 113 - Trigo C., Vivar J. P., Gonzalez C. B. y Brauchi S. (2013) A cell-free assay to determine the stoichiometry of plasma membrane proteins. *Biotechniques* - 54, 191-196
- 114 - Tripodi K. E., Menendez Bravo S. M. y Cricco J. A. (2011) Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. *Enzyme Res* - 2011, 873230

- 115 - Tyler K. M. y Engman D. M. (2000) Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton* - 46, 269-278
- 116 - Tyler K. M. y Engman D. M. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* - 31, 472-481
- 117 - Ulbrich M. H. y Isacoff E. Y. (2007) Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat Methods* - 4, 319-321
- 118 - Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F., Poelvoorde P., Nolan D. P., Lins L., Van Den Abbeele J., Pays A., Tebabi P., Van Xong H., Jacquet A., Moguevsky N., Dieu M., Kane J. P., De Baetselier P., Brasseur R. y Pays E. (2003) Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* - 422, 83-87
- 119 - Vanhollenbeke B., De Muylder G., Nielsen M. J., Pays A., Tebabi P., Dieu M., Raes M., Moestrup S. K. y Pays E. (2008) A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science* - 320, 677-681
- 120 - Vanhollenbeke B., Nielsen M. J., Watanabe Y., Truc P., Vanhamme L., Nakajima K., Moestrup S. K. y Pays E. (2007) Distinct roles of haptoglobin-related protein and apolipoprotein L-I in trypanolysis by human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* - 104, 4118-4123
- 121 - Veliz L. A., Toro C. A., Vivar J. P., Arias L. A., Villegas J., Castro M. A. y Brauchi S. (2010) Near-membrane dynamics and capture of TRPM8 channels within transient confinement domains. *PLoS One* - 5, e13290
- 122 - Warren L. G. (1960) Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *J Parasitol* - 46, 529-539
- 123 - Warren M. J. y Smith A. G. (2009) *Tetrapyrroles: Birth, Life and Death*. Austin, Texas, USA, Landes Bioscience - 235
- 124 - Wilks A. y Burkhard K. A. (2007) Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme. *Nat Prod Rep* - 24, 511-522
- 125 - Wilks A. y Ikeda-Saito M. (2014) Heme utilization by pathogenic bacteria: not all pathways lead to biliverdin. *Acc Chem Res* - 47, 2291-2298
- 126 - Wunder C., Lippincott-Schwartz J. y Lorenz H. (2010) Determine membrane protein topologies in single cells and high-throughput screening applications. *Curr Protoc Cell Biol* - 5.7,
- 127 - Yuan X., Fleming M. D. y Hamza I. (2013) Heme transport and erythropoiesis. *Curr Opin Chem Biol* - 17, 204-211
- 128 - Yuan X., Protchenko O., Philpott C. C. y Hamza I. (2012) Topologically conserved residues direct heme transport in HRG-1-related proteins. *J Biol Chem* - 287, 4914-4924
- 129 - Zhang Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* - 9, 40
- 130 - Zitomer R. S. y Lowry C. V. (1992) Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* - 56, 1-11