



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**“Transporte de hemo y biosíntesis de hemo A  
en *Trypanosoma cruzi*”**

Presentada por Marcelo Luciano Merli

Directora: Dra. Julia A. Cricco

Rosario, Argentina

2016

## **“Transporte de hemo y biosíntesis de hemo A en *Trypanosoma cruzi*”**

Marcelo Luciano Merli

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 2011 y Octubre de 2016, bajo la dirección de la Dra. Julia Alejandra Cricco.

## *Agradecimientos*

En primer lugar quiero agradecer a Julia por dirigirme durante estos años, por las oportunidades que me dio y su apoyo tanto para la realización de esta tesis como a nivel personal.

A todos los que pasaron por el Hemo Team: Lucía, Jose, Lucas, Brenda y Jero. Por el trabajo en conjunto, el tiempo compartido y la catarsis dentro y fuera del laboratorio.

A Esteban y a quienes forman o formaron parte del Bromo Team: Pame, Carla, Lucho, Sofi, Vir, María, Isa y Romi; y en especial a Viky por el asesoramiento experimental.

Al Dr. Oscar A. Roveri y al Dr. Alejandro J. Vila por permitirme trabajar en el área Biofísica y con sus grupos durante los primeros años.

Al resto del área de Biofísica por haberme integrado como uno más del grupo en el inicio de este trabajo, en especial a Irina, Paula, Sory, Andrés y Andrea.

A mis amigos de siempre, los Alberdis, las LPDF y Piki, por estar y haber estado siempre.

A los nuevos, Maxi, Jorge, Nico y Dave, por haber sido indispensables en momentos de estos últimos años.

Y por último a mi familia, por el apoyo incondicional.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS y SÍMBOLOS	6
LENGUAJE ESPECIAL	8
RESUMEN	9
I- INTRODUCCIÓN	11
I.1. Hemo	12
I.1.1. Biosíntesis de hemo	14
I.1.2. Transporte intracelular de hemo y de los intermediarios de su síntesis	17
I.1.3. Adquisición de hemo como fuente de hierro	19
I.1.4. Detoxificación de hemo	21
I.1.5. Hemo A, cofactor del complejo citocromo c oxidasa (CcO)	25
I.1.5.1. Hemo A sintasa (HAS)	26
I.1.5.2. Biosíntesis de hemo A y ensamblado de la citocromo c oxidasa (CcO)	30
I.2. Enfermedad de Chagas-Mazza	32
I.2.1. Formas de transmisión y distribución geográfica de la enfermedad	34
I.2.2. Etapas de la enfermedad y formas clínicas	37
I.2.3. Tratamiento del Chagas	38
I.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
I.3.1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
I.3.2. Mecanismos de invasión	42
I.3.3. Estructura celular	44
I.3.4. Metabolismo energético	46
I.3.5. La succinato reductasa y la cadena respiratoria mitocondrial	49
I.4. Metabolismo de hemo en tripanosomátidos	52
I.4.1. Transporte de hemo en tripanosomátidos	53
I.4.2. Relevancia del estudio del metabolismo de hemo en <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
I.5. Objetivos	56
II- MATERIALES y MÉTODOS	58
II.1. Análisis bioinformático	59
II.1.1. Análisis predictivo	59
II.1.2. Análisis de secuencias	59
II.2. Cepas bacterianas, levaduras y líneas celulares	60

II.2.1. Cepas bacterianas utilizadas	60
II.2.2. Cepas de levaduras utilizadas	60
II.2.3. Líneas celulares utilizadas	60
II.3. Técnicas de cultivo	60
II.3.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	60
II.3.2. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	61
II.3.3. Medios de cultivo para levadura	61
II.3.4. Transformación de células de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
II.3.5. Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
II.3.6. Recuento de parásitos	65
II.3.7. Transfección de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
II.4. Estudios de transporte de hemo	66
II.4.1. Crecimiento de epimastigotes a distintas concentraciones de hemo	66
II.4.2. Análogos de hemo	66
II.4.3. Crecimiento de epimastigotes en medio LIT suplementado con análogos de hemo	67
II.4.4. Ensayos de transporte de análogos de hemo en epimastigotes	67
II.4.5. Detección de la incorporación de los análogos de hemo en epimastigotes	68
II.5. Determinaciones de hemos (B y A) en epimastigotes	68
II.5.1. Cuantificación de hemo (hemo B) intracelular	68
II.5.2. Extracción de hemos con acetona ácida	70
II.5.3. Cuantificación de hemo A	71
II.5.4. Ensayo de degradación de hemo <i>in vitro</i>	72
II.5.5. Ensayo de degradación de hemo <i>in vivo</i>	73
II.6. Manipulación de ácidos nucleicos	73
II.6.1. Plásmidos	73
II.6.2. Oligonucleótidos	77
II.6.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	78
II.6.3.1. Amplificación de las secuencias codificantes P1TcCOX15 y P2TcCox15	78
II.6.3.2. Amplificación de la secuencia codificante TcCOX15.HIS.noStop	79
II.6.3.3. Amplificación de la secuencia codificante de GFP	80
II.6.3.4. Obtención de las secuencias mutantes de <i>TcCOX15.HIS</i>	80
II.6.3.5. PCR de colonias	83
II.6.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	84
II.6.5. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa	84

II.6.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción	84
II.6.7. Reacciones de ligación de fragmentos de ADN	85
II.6.8. Purificación de ADN plasmídico a partir de células de <i>E. coli</i>	85
II.6.9. Secuenciación de fragmentos de ADN	86
II.6.10. Cuantificación de ADN	86
II.7. Manipulación de Proteínas	87
II.7.1. Purificación de GST-P1/P2TcCox15 y obtención de anticuerpos policlonales anti-TcCox15	87
II.7.1.1. Ensayos de inducción de la expresión de <i>P1/P2TcCOX15</i>	87
II.7.1.2. Purificación de GST-P1TcCox15 por medio de cromatografía de afinidad empleando resina de glutatión agarosa	88
II.7.1.3. Obtención de anticuerpos policlonales contra P1TcCox15	89
II.7.1.4. Purificación de anticuerpos anti-P1TcCox15 a partir de suero inmune	90
II.7.2. Preparación de extractos mitocondriales crudos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
II.7.3. Obtención de extractos celulares totales de epimastigotes	92
II.7.4. Obtención de extractos celulares totales de los distintos estadios de <i>T. cruzi</i>	92
II.7.5. Obtención de extractos mitocondriales de epimastigotes	93
II.7.6. Análisis de extractos proteicos	93
II.7.6.1. Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)	93
II.7.6.2. Western blot	95
II.7.6.3. Actividad peroxidasa de hemoproteínas	96
II.7.7. Cuantificación de proteínas	97
II.8. Estudio de expresión de genes recombinantes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	97
II.8.1. Ensayo de complementación en el sistema heterólogo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	97
II.8.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de proteínas recombinantes en el crecimiento de epimastigotes	98
II.8.3. Mediciones de consumo de oxígeno (como evaluación de la actividad CcO)	98
II.8.4. Análisis de la sobreexpresión de proteínas recombinantes sobre la infección de <i>Trypanosoma cruzi</i> en células Vero	100
II.9. Microscopía	100
II.9.1. Epimastigotes incubados con análogos de hemo	100
II.9.2. Tinción mitocondrial en epimastigotes	101

II.9.3. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en epimastigotes	101
II.9.4. Microscopía de células de levaduras que contienen GFP recombinante	102
II.10. Estadística	102
<b>III- RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	<b>103</b>
<b>III.1. Transporte de hemo en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>104</b>
III.1.1. Efecto de la disponibilidad de hemo en el medio de cultivo sobre el crecimiento de epimastigotes	104
III.1.2. Ensayos de degradación de hemo en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	111
III.1.3. Transporte de análogos de hemo en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y análisis del efecto que producen sobre su crecimiento	116
III.1.3.1. Análisis de la incorporación de protoporfirina IX en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	117
III.1.3.2. Efecto de la presencia de los análogos de hemo en el medio de cultivo sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	120
III.1.3.3. Transporte de análogos de hemo en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	123
III.1.3.4. Detección de los niveles de hemo y hemoproteínas en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> crecidos en presencia de los análogos de hemo	129
III.1.3.5. SnMP interfiere con el transporte de hemo en <i>Trypanosoma cruzi</i>	133
<b>III.2. Biosíntesis de hemo A en <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>137</b>
III.2.1. Análisis bioinformático de proteínas que estarían involucradas en la síntesis de hemo A en <i>Trypanosoma cruzi</i>	138
III.2.2. Diseño y obtención de anticuerpos policlonales de conejo específicos para el reconocimiento de TcCox15	143
III.2.3. Análisis de la expresión endógena del gen <i>TcCOX15</i> en <i>T. cruzi</i>	146
III.2.4. Detección y localización subcelular de la proteína TcCox15 en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	148
III.2.5. Localización de TcCox15 en epimastigotes que sobreexpresan el gen <i>TcCOX15</i> recombinante	149
III.2.5.1. Evaluación de la expresión de <i>TcCOX15.HIS.GFP</i> para comprobar la localización subcelular de TcCox15	149
III.2.5.2. Evaluación de la expresión de <i>TcCOX15.HIS</i> y posterior análisis de la localización subcelular de TcCox15	156
III.2.6. Estudio del rol de TcCox15 en la síntesis de hemo A de <i>T. cruzi</i>	156
III.2.6.1. Diseño y construcción de mutantes puntuales en residuos	

conservados de TcCox15	157
III.2.6.2. Análisis de la actividad HAS de las mutantes de TcCox15 en <i>Saccharomyces cerevisiae cox15Δ</i>	159
III.2.6.3. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>TcCOX15.HIS</i> salvaje y mutantes en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	161
III.2.6.4. Análisis del efecto de la expresión de TcCox15H307A.His en la infectividad de tripomastigotes y en la replicación intracelular de amastigotes	171
<u>IV. CONCLUSIONES</u>	<u>178</u>
<u>V. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>181</u>

## **ABREVIATURAS y SÍMBOLOS**

ADN	ácido desoxirribonucleico
AHs	análogos de hemo
AOX	<i>Alternative Oxidase</i> (oxidasa terminal alternativa)
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
CcO	citocromo c oxidasa
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>ferrochelata</i> se (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
HAS	hemo A sintasa
Hb	hemoglobina
HO	hemooxigenasa
HOS	hemo O sintasa
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
SHAM	<i>Salicylhydroxamic acid</i> (ácido salicilhidroxámico), inhibidor de oxidasa terminal alternativa tipo planta
spp.	especies
TAE	buffer Tris acetato EDTA
TAO	<i>Trypanosome Alternative Oxidase</i>
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>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

## **RESUMEN**

El hemo es una molécula esencial para la mayoría de los organismos aeróbicos (Koreny *et al.*, 2013). Su biosíntesis consta de 8 pasos enzimáticos y está conservada a lo largo de la evolución (Koreny *et al.*, 2010; Panek y O'Brian, 2002). *Trypanosoma cruzi*, el protista causante de la enfermedad de Chagas-Mazza, no es capaz de sintetizar el hemo por lo que debe incorporarlo ya sea del hospedador mamífero o del insecto vector y al mismo tiempo controlar los niveles intracelulares para evitar su toxicidad (Koreny *et al.*, 2010). El hemo no puede atravesar libremente las membranas biológicas, por ello está aceptado que existen transportadores proteicos dedicados a esta función (Cupello *et al.*, 2011; Lara *et al.*, 2007) y de esta manera pueda ser distribuido entre los diferentes compartimentos subcelulares incluida la mitocondria. En ella se incorpora a diferentes hemoproteínas, siendo una de las más relevantes la citocromo *c* oxidasa (CcO) del tipo *aa3* de la cadena transportadora de electrones (complejo IV) (Tripodi *et al.*, 2011).

En este trabajo de tesis nos proponemos entonces estudiar aspectos generales del transporte y del metabolismo de hemo en epimastigotes de *T. cruzi*: requerimiento del hemo en el crecimiento, efecto tóxico y posibles vías de degradación, y mediante el uso de distintos análogos fluorescentes de hemo (AHs) avanzar en la caracterización del transporte de hemo. Los AHs poseen estructuras similares al hemo pero sus propiedades fluorescentes permiten el estudio del transporte mediante técnicas espectroscópicas y de microscopía de fluorescencia. Por otro lado, se estudió el rol de TcCox15, la enzima hemo A sintasa (HAS) de *T. cruzi* responsable de la segunda reacción de la conversión del hemo en hemo A: cofactor únicamente de la CcO del tipo *aa3*. Para ello se obtuvieron anticuerpos específicos contra la proteína que permitieron estudiar los niveles de TcCox15 en los distintos estadios y su localización, y se generaron mutantes puntuales de TcCox15 cuya expresión en los distintos estadios del parásito permitieron evaluar el rol de esta enzima.

Nuestros resultados nos permiten proponer que los epimastigotes de *T. cruzi* captan más hemo del mínimo necesario para cumplir con sus funciones celulares y pueden almacenarlo para usos posteriores aunque estas reservas son limitadas; tienen capacidad de regular la cantidad de hemo intracelular y ante una disminución de este, incrementan su capacidad de tomarlo del medio adaptándose a variaciones en la disponibilidad del hemo del entorno. Por otro lado se corroboró que no tienen actividad ferroquelatasa (FeCH), la última

enzima de la vía de síntesis de hemo. Todos los AHs ensayados interfirieron con el transporte de hemo por parte del parásito, aunque solo algunos fueron transportados y solo los que fueron incorporados lograron ejercer un efecto tóxico. Esta selectividad en el transporte no fue igual en todas las cepas estudiadas, lo que apoyaría la hipótesis de un sistema de transporte de hemo específico mediado por un complejo proteico especializado.

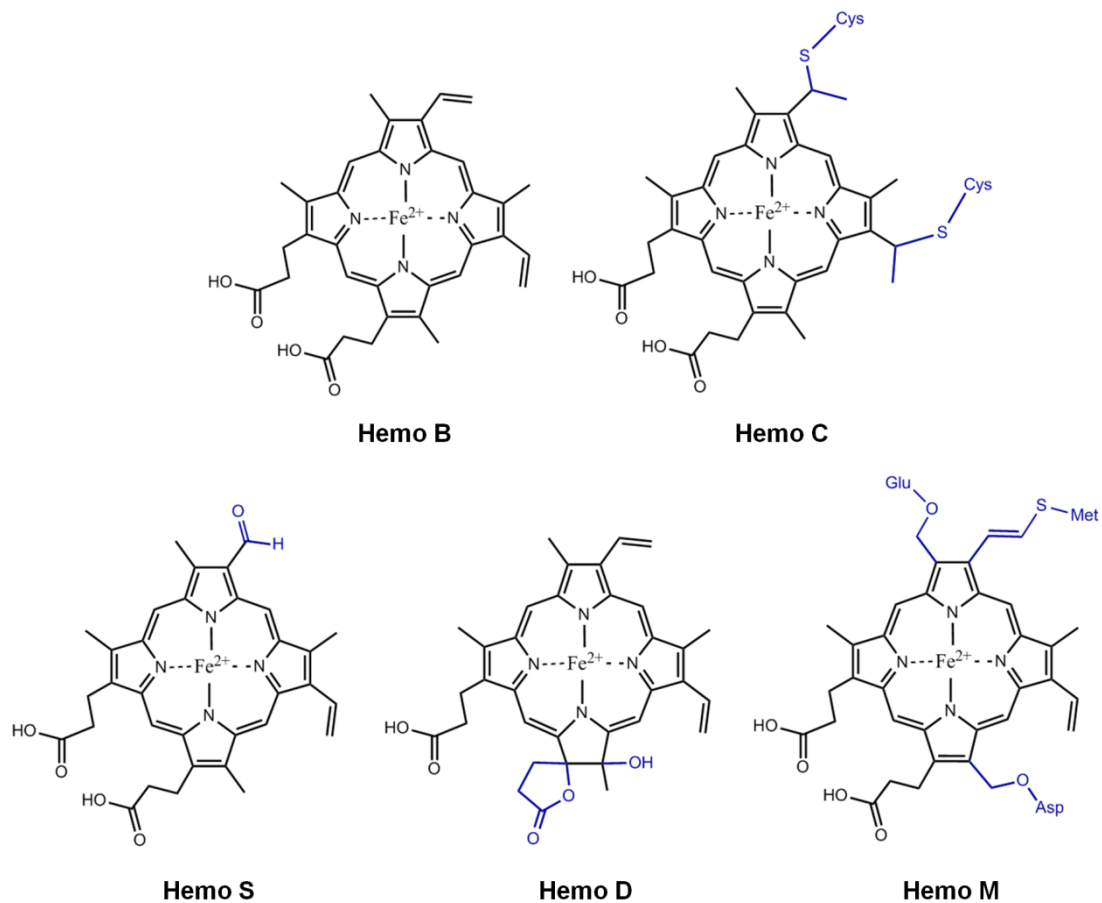
Con respecto a la síntesis de hemo A, se identificaron en el genoma de *T. cruzi* por búsqueda bioinformática genes que podrían participar junto a TcCox15 en la síntesis de hemo A y en el ensamblado del CcO: una posible ferredoxina Yah1, una posible ferredoxina reductasa Arh1 y una secuencia con homología a Shy1. La presencia de estas proteínas (probables) apoyarían la hipótesis de que la síntesis de hemo A en *T. cruzi*, la reacción catalizada por la enzima HAS, procedería de manera similar a lo que sucede en otros organismos eucariotas como *S. cerevisiae* y justifica la actividad observada por TcCox15 cuando se expresó en células de levaduras *cox15Δ* (Buchensky *et al.*, 2010 y este trabajo de tesis). En cuanto a TcCox15, se determinó que su localización es mitocondrial como en las demás eucariotas y sus niveles de acumulación fueron mayores en los estadios replicativos, epimastigote y amastigote (aunque es mayor en epimastigote), en comparación con el estadio infectivo de tripomastigote. En ensayos de complementación en levadura *cox15Δ* se determinó que la fusión de GFP al C-terminal de TcCox15 afecta la función de la enzima y que incluso se afectaría el funcionamiento de la Cox15 endógena de levaduras cuando TcCox15.His.GFP se expresó en un entorno salvaje. Por último, los residuos H129, H206 y H307 de TcCox15 conservados en la familia de enzimas con actividad HAS, resultaron esenciales para la actividad de esta enzima. El reemplazo de los residuos de histidinas por alaninas generó mutantes no funcionales y el análisis de la sobreexpresión de estas mutantes en los distintos estadios nos permitieron determinar que la síntesis de hemo A es esencial para el crecimiento de los epimastigotes y para la actividad de la CcO, demostrando además que esta sería la oxidasa terminal principal del parásito. Además afectar la ruta de síntesis de hemo A causó un efecto negativo sobre la infección de tripomastigotes (en las primeras etapas de la infección) y sobre la replicación intracelular de amastigotes.

# I- INTRODUCCIÓN

## **I.1. Hemo**

El hemo, también llamado protohemo IX o hemo B, es una molécula formada por un ión ferroso central unido a los cuatro átomos de nitrógeno de un anillo denominado protoporfirina IX (PP) (figura 1). El ión de hierro central ( $\text{Fe}^{2+}$ ) puede oxidarse al estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y esto le confiere propiedades catalíticas especiales (de oxido-reducción) a las enzimas que poseen esta molécula como cofactor o grupo prostético. Si bien suele nombrárselos indistintamente, al anillo de PP coordinando  $\text{Fe}^{3+}$ , que es la forma que predomina en su forma libre, se la denomina hemina. Por otro lado las porfirinas son compuestos orgánicos que por sus propiedades hidrofóbicas pueden interaccionar con proteínas y lípidos. Estas propiedades hacen al hemo una molécula esencial para muchos procesos biológicos (Kumar y Bandyopadhyay, 2005; Toh *et al.*, 2010).

Entre las hemoproteínas, proteínas que poseen una o más moléculas de hemo unidas, se encuentran los complejos transportadores de electrones de la cadena respiratoria (el complejo II, el complejo III y el citocromo *c*), los citocromos P450 involucrados por ejemplo en el metabolismo de drogas, oxidasas como la NADPH oxidasa que produce anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peroxidasas, catalasas, desaturasas de ácidos grasos (AG) en el retículo endoplasmático (RE), enzimas de la vía de síntesis de esteroides y proteínas transportadoras de oxígeno como la mioglobina y la hemoglobina. El hemo participa también en la regulación de procesos celulares como el procesamiento de microARN, el ritmo circadiano, transporte de iones y la diferenciación de neuronas y adipocitos; participa en la detección de diferentes gases diatómicos ( $\text{NO}$ ,  $\text{CO}$  y  $\text{O}_2$ ) por su propiedad de unirlos y en la señalización celular con la óxido nítrico sintasa y guanilato sintasas solubles. 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). En todas estas proteínas el hemo puede permanecer unido mediante enlaces no covalentes, donde el hierro se coordina generalmente a residuos de histidina, metionina o cisteína de la cadena polipeptídica; o estar unido por enlaces covalentes generalmente por los 2 grupos vinilos de sus cadenas laterales a 2 cisteínas por enlace tioéter. A este último se lo denomina hemo C (figura 1) (Tripodi *et al.*, 2011; Warren y Smith, 2009a).



**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 de hierro y 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, 2009a.

Los organismos que dependen de la fosforilación oxidativa necesitan grandes cantidades de hemo para formar los complejos de la cadena respiratoria. El único organismo eucariota reportado hasta la fecha que presenta metabolismo oxidativo y que puede sobrevivir sin hemo es *Phytomonas serpens*, un parásito de plantas de la familia de los tripanosomátidos. Si bien la utilización de hemo le confiere ventajas, cuando el parásito se encuentra en un ambiente sin disponibilidad de hemo se adapta modificando diferentes procesos celulares por reacciones alternativas que no utilizan hemo o prescindiendo de los metabolitos que lo necesitan para su síntesis (Koreny *et al.*, 2012). Por otro lado, algunos organismos eucariotas anaeróbicos, como *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, poseen

algunas hemoproteínas involucradas principalmente en la detección de gases diatómicos o en evitar el estrés oxidativo. Se cree que estos organismos podrían ser capaces de sobrevivir sin hemo, pero hasta ahora no se los ha podido mantener en medios definidos. Igualmente, a pesar de no producir ciertos metabolitos como el colesterol y los AG que son sintetizados mediante rutas en las que intervienen hemoproteínas, necesitarían incorporarlos del medio extracelular por lo que no podrían ser considerados completamente independientes de hemo (Koreny *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, el hemo posee características particulares, pero estas características también lo hacen tóxico. Por sus propiedades redox, el hemo libre puede generar especies reactivas del oxígeno (EROs), por ejemplo por la reacción de Fenton o por la descomposición de compuestos orgánicos (Koreny *et al.*, 2013; Krishnamurthy *et al.*, 2007). También pueden generar daño directo sobre diferentes componentes celulares: oxidar lípidos, agregarse en las membranas y alterar su permeabilidad hasta la disrupción celular, degradar proteínas o entrecruzarlas formando agregados, y dañar el ADN tanto genómico como mitocondrial y plasmídico (Krishnamurthy *et al.*, 2007; Kumar y Bandyopadhyay, 2005). Incluso las porfirinas pueden acumularse en membranas y al absorber energía lumínica producir oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) en su estado excitado. En humanos, esto puede generar efectos en el funcionamiento de los riñones, neuronas, células cardíacas, hepatocitos y leucocitos periféricos; incluso puede estimular reacciones inflamatorias locales (Kumar y Bandyopadhyay, 2005).

Dada la importancia del hemo en muchos procesos celulares de la mayoría de los organismos y por su toxicidad, el metabolismo de hemo - síntesis, transporte y degradación - es regulado finamente con el fin de controlar sus niveles, manteniendo a este cofactor siempre coordinado por alguna proteína (Koreny *et al.*, 2013).

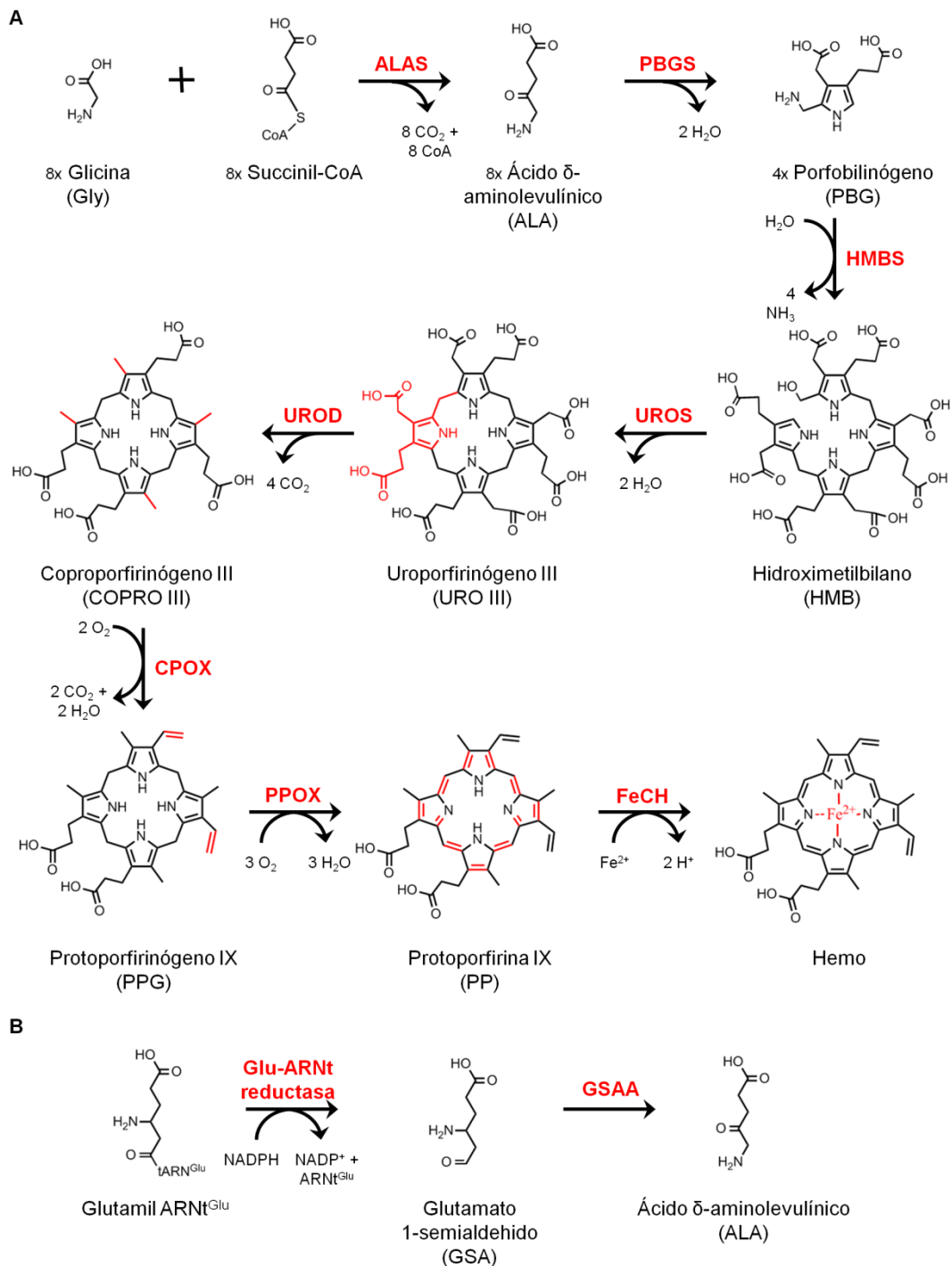
### **I.1.1. Biosíntesis de hemo**

El anillo tetrapirrólico que forma el hemo posee como cadenas laterales: 4 grupos metilos, 2 grupos vinilos y 2 grupos propiónicos. Si bien el hemo B y el hemo C - la forma unida covalentemente a las proteínas - son las más relevantes, existen otras clases de hemo que difieren en la composición de las cadenas laterales: hemo O, hemo A (ver sección I.1.4), hemo D, hemo S y hemo M (figura 1). Todos ellos se forman a partir del hemo B a través de

la modificación de las cadenas laterales (Kumar y Bandyopadhyay, 2005; Warren y Smith, 2009a).

La vía de biosíntesis de hemo B está conservada a lo largo de los tres dominios de la vida y sólo difieren en la síntesis del primer precursor, el ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA). En los organismo procariontas, a excepción de las  $\alpha$ -proteobacterias, y en los organismos eucariotas fotosintéticos, este precursor se sintetiza a partir del glutamil ARNt<sup>Glu</sup> (figura 2.B). En el caso de las  $\alpha$ -proteobacterias y eucariotas no fotosintéticas se sintetiza a partir de glicina y succinil-CoA. Las siguientes 7 reacciones son comunes para ambas vías (figura 2.A). Otra diferencia está en la localización de las diferentes reacciones de la vía: mientras que en procariontas ocurre completamente 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). La única excepción a esto son los apicomplexos, grupo de protistas que incluye al patógeno humano del género *Plasmodium* causante de la malaria. En este organismo la síntesis empieza y termina en la mitocondria, pero algunos pasos intermedios ocurren en un plástido no fotosintético llamado apicoplasto (Korený *et al.*, 2010; Panek y O'Brian, 2002).

La vía de síntesis está regulada, siendo la primer reacción catalizada por la enzima ALAS el paso limitante en eucariotas no fotosintéticas. Además del producto final (el hemo), los intermediarios también son relativamente reactivos y tóxicos (Hamza y Dailey, 2012). La deficiencia parcial de alguna de las enzimas de la vía produce en humanos lo que se llaman porfirias y generalmente son enfermedades genéticas heredables. Mientras que la deficiencia de la enzima ALAS produce anemia sideroblástica por falta de hemo, la alteración de las otras enzimas producen diferentes patologías por la acumulación de intermediarios. La acumulación de ALA produce cuadros agudos caracterizados por problemas neurológicos, y la acumulación de los demás intermediarios produce principalmente daños cutáneos inducidos por luz (ya que esta produce la fotoactivación de los compuestos y la producción de EROs), a veces combinado con problemas neurológicos (Hamza y Dailey, 2012; Warren y Smith, 2009b).



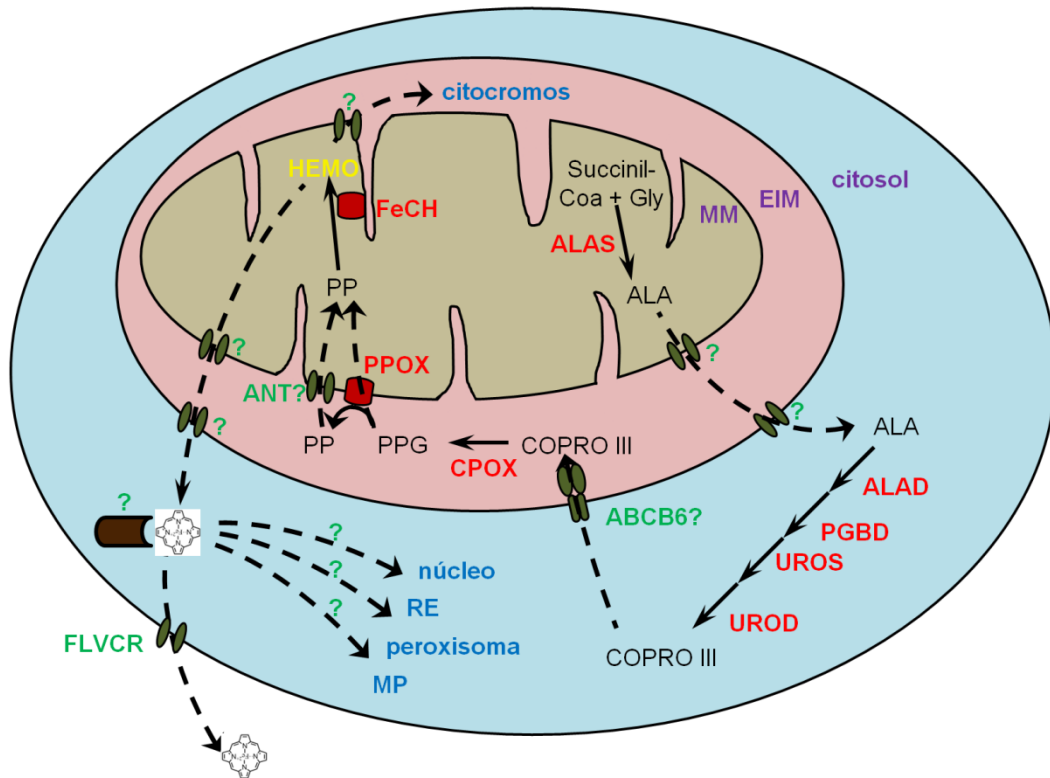
**Figura 2. Biosíntesis de hemo.** A) Biosíntesis de hemo a partir de glicina y succinil-CoA como ocurre en  $\alpha$ -proteobacterias y eucariotas no fotosintéticos. B) Reacción alternativa para la síntesis del primer precursor, el ácido  $\delta$ -aminolevulinico (ALA), como ocurre en la mayoría de los organismos procariontas y en los organismos eucariotas fotosintéticos. Enzimas de la vía: ALAS (ácido  $\delta$ -aminolevulinico sintasa); PBGS (porfobilinógeno sintasa); HMBS (hidroximetilbilano sintasa); UROS (uroporfirinógeno III sintasa); UROD (uroporfirinógeno III decarboxilasa); CPOX (coproporfirinógeno III oxidasa); PPOX (protoporfirinógeno IX oxidasa); FeCH (ferroquelatasa); Glu-ARNt reductasa (glutamil ARNt<sup>Glu</sup> reductasa) y GSAA (glutamato 1-semialdehido aminotransferasa). Se muestran en rojo las modificaciones introducidas en cada reacción en el anillo de protoporfirina. Adaptado de Hamza y Dailey, 2012; Warren y Smith, 2009c. 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 del mismo. Esto último, que es frecuente en procariontas, les permite sintetizar hemo en ausencia de oxígeno (Anzaldi y Skaar, 2010; Panek y O'Brian, 2002).

La ruta de biosíntesis de hemo también aporta intermediarios para la síntesis de otras porfirinas donde además de variar algunas de las cadenas laterales del anillo, coordinan otro ión metálico central (Khan y Quigley, 2011). La síntesis de clorofilas y bacterioclorofilas en organismos fotosintéticos comparte la vía del hemo hasta la formación de PP, luego se inserta el ión  $Mg^{2+}$  y posteriormente se modifican las cadenas laterales. En estos organismos la vía de biosíntesis de hemo se utiliza principalmente para la síntesis de clorofilas y es por esto que ésta se lleva a cabo en el cloroplasto (Warren y Smith, 2009d). En cuanto a la síntesis de la vitamina B12 (cobalamina), que solo se sintetiza *de novo* en procariontes, 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, 2009f).

### **I.1.2. Transporte intracelular de hemo y de los intermediarios de su síntesis**

Si bien existe una exhaustiva descripción sobre las enzimas que intervienen en la biosíntesis de hemo y su localización celular, se desconoce si otras proteínas intervienen en el transporte de los intermediarios de la vía y de los productos (figura 3). Además, una vez sintetizado, el hemo se transporta fuera de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana y fuera de la mitocondria al retículo endoplasmático, peroxisomas, membrana plasmática y núcleo donde es requerido por las diferentes hemoproteínas por algún mecanismo que no ha sido identificado aún (figura 3) (Hamza y Dailey, 2012).

Por otro lado en humanos, gran parte del hemo sintetizado en los eritrocitos no se utiliza para la producción de hemoglobina y las demás hemoproteínas, sino que se exporta al medio extracelular. Esto se debe a que el 80% de la biosíntesis de hemo ocurre en células eritrocíticas de la médula ósea, mientras que un 10 - 15% en el hígado (principalmente para citocromos en el RE, especialmente el P450, y para catalasas en los peroxisomas) (Hamza y Dailey, 2012; Khan y Quigley, 2011; Warren y Smith, 2009b). La gran producción de hemo se debe a que los eritrocitos cuentan con una isoforma de la primer enzima de la vía (ALAS-2) además de la isoforma que se expresa en todas las células somáticas (ALAS-1). Para evitar el efecto tóxico en la célula, el hemo excedente se exporta al medio (figura 3) (Hamza y Dailey, 2012).



**Figura 3. Transporte intracelular en eucariotas no fotosintéticas.** Se muestran en la figura el recorrido que realizan los diferentes intermediarios de la biosíntesis de hemo hasta la inserción final del hemo en las hemoproteínas. En humanos está propuesta la participación de la proteína ABCB6 (un transportador del tipo ABC) para el transporte de COPRO III a través de la membrana externa mitocondrial y ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*) para el transporte de la PP a través de la membrana interna mitocondrial, pero tal vez este podría ser entregado por la enzima PPOX que lo sintetiza a la siguiente enzima (la FeCH) directamente. En el citosol, las diferentes enzimas podrían formar complejos y canalizar los intermediarios entre ellas, evitando que estos difundan libremente por el citosol. En cuanto al transporte de hierro a la mitocondria, Mtf1 (Mitoferrina) sería el transportador estabilizado por ABCB10, que podrían interaccionar directamente con la FeCH para la inserción del hierro en el anillo de PP. ABCB7 (ortóloga a *Atm1* de *Saccharomyces cerevisiae*) tiene un rol en la disponibilidad de hierro en la mitocondria pero se desconoce su función (Hamza y Dailey, 2012; Khan y Quigley, 2011; Krishnamurthy *et al.*, 2006; Warren y Smith, 2009g). FLVCR (*Feline Leukemia Virus subtype C Receptor*) sería el encargado de exportar el hemo al medio extracelular (Keel *et al.*, 2008; Quigley *et al.*, 2004). PPOX y FeCH están asociadas a la membrana interna mitocondrial. En levaduras, CPOX está asociada a membrana externa mitocondrial del lado citosólico mientras que en mamíferos está localizada del lado del espacio intermembrana. En plantas, la biosíntesis de hemo ocurre en cloroplasto y para aportar hemo a la mitocondria, se transporta el intermediario PPG y este se convierte en hemo por la acción de una PPOX y una FeCH mitocondriales (Hamza y Dailey, 2012; Warren y Smith, 2009g). EIM (espacio intermembrana mitocondrial) y MM (matriz mitocondrial). Adaptado de Khan y Quigley, 2011.

Debido a las características fisicoquímicas del hemo, es ampliamente aceptado que además de su síntesis, su distribución intracelular debería estar controlada e incluso que existirían proteínas transportadoras solubles además de las proteínas translocadoras de membrana.

### **I.1.3. Adquisición de hemo como fuente de hierro**

El  $\text{Fe}^{3+}$  es insoluble a pH neutro y por eso no se asimila fácilmente a pesar de ser la forma más abundante en medios aeróbicos y neutros (Wandersman y Delepelaire, 2004). El hemo, que proviene principalmente de la ingesta de carne animal rica en hemoglobina y mioglobina, es la forma principal de absorción de hierro por el cuerpo humano. En una dieta occidental un tercio del hierro ingerido proviene del hemo y el resto es hierro inorgánico proveniente principalmente de fuentes vegetales, pero como el hierro inorgánico es de difícil asimilación, más de dos tercios del hierro absorbido por el sistema digestivo provienen del hemo (Khan y Quigley, 2011; Shayeghi *et al.*, 2005). Para la importación de hemo se han propuesto dos mecanismos: endocitosis mediada por receptor o transporte activo, donde participaría la proteína HCP1 (*Heme Carrier Protein 1*) que se localiza en la membrana de enterocitos del duodeno (Shayeghi *et al.*, 2005). Una vez incorporado por las células del intestino, el hierro hemínico es transportado por transportadores citosólicos solubles dentro de las células y luego degradado para pasar al flujo sanguíneo y al resto del cuerpo como hierro libre (Khan y Quigley, 2011). De los 4 g de hierro que hay en el cuerpo humano, 2,67 g se encuentran en la hemoglobina, 0,2 g en la mioglobina, 0,08 g en hemoenzimas, 1 g como hierro insoluble en ferritina y 0,07 g en otros compartimentos (Tong y Guo, 2009).

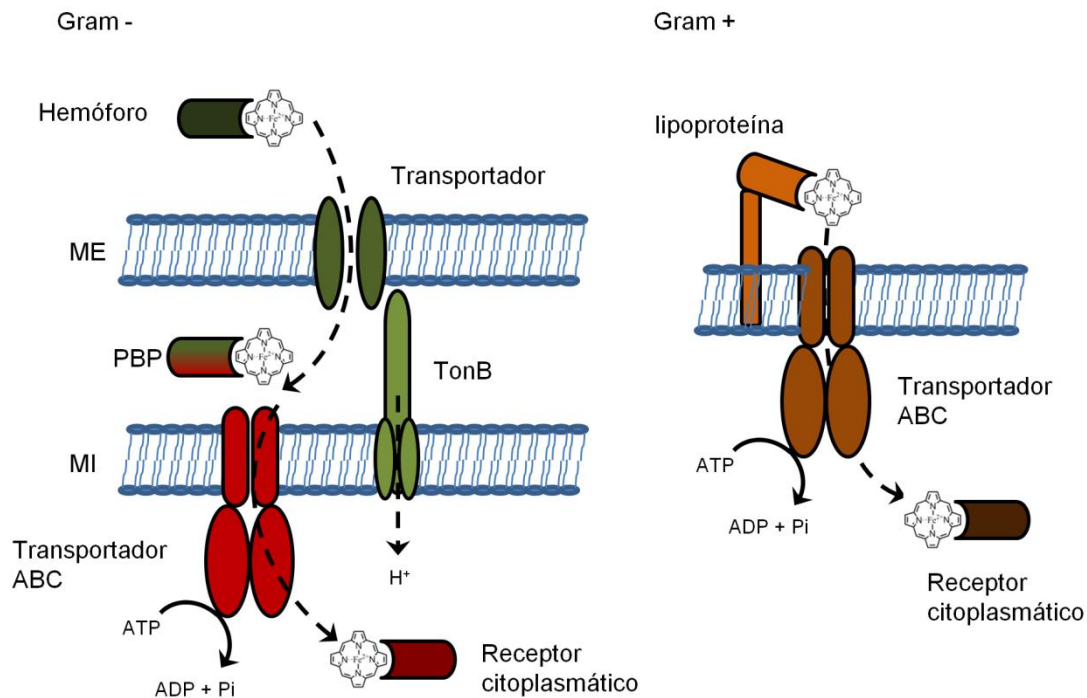
El cuerpo humano mantiene baja la concentración de las distintas formas de hierro libre y en especial el hemo, esto debido a que este no se absorbe fácilmente y necesita ser reciclado para su reutilización, y además para protegerse de los patógenos. Al ser el hemo la principal fuente de hierro en el cuerpo, los microorganismos patógenos deben ser capaces de tomarlo para poder sobrevivir y los mecanismos desarrollados para disminuir su disponibilidad funcionan como mecanismos de defensa: inmunidad nutricional (Haley y Skaar, 2012; Hamza y Dailey, 2012). El cuerpo humano posee entonces mecanismos para captar el hierro libre, el hemo libre y la hemoglobina (liberada por la hemólisis de los glóbulos rojos), manteniendo baja las concentraciones de estos. El hierro se almacena unido a ferritina principalmente en hígado, bazo, mucosa intestinal y médula ósea, y se transporta en sangre principalmente unido a la transferrina. Por otro lado el hemo liberado al plasma se une a la hemopexina sintetizada por el hígado y se evita así el efecto citotóxico. El complejo hemopexina-hemo es internalizado por endocitosis mediada por receptor principalmente en hepatocitos para su reutilización o almacenamiento. La albumina también es capaz de transportar hemo, pero lo hace con baja afinidad. Cuando los glóbulos rojos se lisan, se

libera al torrente sanguíneo gran cantidad de hemoglobina que es reconocida por la haptoglobina, una proteína también sintetizada por el hígado. El complejo haptoglobina-hemoglobina es tomado por monocitos, macrófagos y hepatocitos (Hamza y Dailey, 2012; Kumar y Bandyopadhyay, 2005; Wilks y Burkhard, 2007).

Por 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). Hasta la fecha se han descrito diferentes mecanismos de importación de hemo; en bacterias Gram positivas y Gram negativas estos están bien caracterizados y participan transportadores de membrana del tipo ABC (figura 4). En eucariotas se han identificado algunas proteínas involucradas en el metabolismo del hemo pero no está descrito ningún modelo completo de transporte y tampoco se han identificado a todas las proteínas que participarían. A continuación se enumeran algunas de las proteínas que intervendrían en el transporte de hemo en organismos eucariotas que han sido descritas hasta la fecha:

➤ En el hongo patógeno *Candida albicans* se identificaron las proteínas ancladas a membrana Rbt51 y Rbt5 que actuarían como receptores de hemo y hemoglobina que luego son incorporados por endocitosis (Hamza y Dailey, 2012).

➤ El nematodo *Caenorhabditis elegans* es incapaz de sintetizar hemo (Rao *et al.*, 2005), por lo que necesita incorporarlo del medio extracelular y es uno de los eucariotas donde más se ha estudiado el metabolismo de hemo. Se identificaron 288 genes cuya transcripción responde a cambios en la concentración de hemo (*Heme Responsive Genes - HRG*) (Severance *et al.*, 2010), de los cuales cuatro de ellos fueron estudiados en profundidad y fue posible asignarles una función relacionada al transporte de hemo. HRG-1 y HRG-4 son proteínas con 4 hélices transmembrana (son parálogos entre sí); HRG-4 mediaría la importación de hemo en la membrana plasmática y HRG-1 regularía la disponibilidad de hemo en los compartimentos endosomales. Hay proteínas ortólogas a estas en otros organismos como humanos, ratones, peces zebra, pollos y ranas (Rajagopal *et al.*, 2008). HRG-2 es una proteína con una única hélice transmembrana y participaría en la homeostasis de hemo en tejido hipodérmico extraintestinal, se expresa en RE y membrana plasmática (Chen *et al.*, 2012). HRG-3 sería la responsable de llevar hemo del intestino a los embriones (transporte intercelular) (Chen *et al.*, 2011).



**Figura 4. Transporte de hemo en bacterias Gram negativas y Gram positivas.** En Gram negativas, el hemo (o la hemina, la forma predominante en medio aeróbico) es transportado a través de la membrana externa por un transportador TonB dependiente y entregado en el periplasma a PBP (*Periplasmic Binding Protein*). Luego en la membrana interna se transloca por una permeasa del tipo ABC a un receptor citoplasmático soluble. En Gram positivas el hemo es reconocido por una lipoproteína anclada en la membrana, se transfiere a una permeasa del tipo ABC en la membrana y luego a un receptor citoplasmático soluble. En muchas bacterias Gram negativas se han descrito hemóforos que unen hemo y lo entregan al transportador de membrana externa. Para ser utilizado en las hemoproteínas, el cofactor necesita ser reducido a  $\text{Fe}^{2+}$ ; además se han reportado la existencia de reductasas extracelulares que facilitarían el transporte: el anillo de PP con  $\text{Fe}^{2+}$  es eléctricamente neutro a diferencia de la especie con  $\text{Fe}^{3+}$  que posee una carga positiva y se le asocia un contraión. En todos los casos el hemo transportado puede provenir del hemo libre presente o ser tomado de otras proteínas como la hemoglobina. ME (membrana externa); MI (membrana interna). Adaptado de Anzaldi y Skaar, 2010; Haley y Skaar, 2012; Wandersman y Delepelaire, 2004; Wilks y Burkhard, 2007.

#### I.1.4. Detoxificación de hemo

Los organismos poseen mecanismos de detoxificación con el fin de evitar la acumulación de hemo en forma libre (figura 5). La estrategia mejor descrita es la ruta canónica de degradación catalizada por enzimas hemooxigenasas (HO) (Kumar y Bandyopadhyay, 2005). Esta vía permite además la reutilización del hierro y es utilizada por muchos patógenos para recuperar el hierro a partir del hemo que incorporan (Wilks y Burkhard, 2007). Algunas de las HO más estudiadas son la HO-1 humana, la Hmx-1 de *S. cerevisiae*, las enzimas de *Arabidopsis thaliana* y de algunas bacterias, especialmente las patógenas. Estas enzimas presentan una alta variabilidad de secuencia y se detectaron

residuos esenciales para la actividad en alguna de ellas pero estos no están presentes en todas las secuencias, como es el caso de las glicinas 139, 143 y 144 según la numeración de HO-1 humana. Solo la histidina 25, según la numeración en la HO-1 humana, parecería estar ampliamente conservadas. Mientras las HO bacterianas son solubles, homodiméricas y de aproximadamente 13 kDa cada subunidad, las HO eucariotas son monoméricas, de aproximadamente 25 kDa y presentan una secuencia C-terminal que les permite anclarse a la membrana del RE. El mecanismo de reacción de las HO está descrito y 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 obtiene como productos:  $Fe^{2+}$ , CO y biliverdina IX $\alpha$  (pasando por el intermediario verdohemo). Esta reacción se puede reproducir *in vitro* fácilmente, donde a partir de una mezcla agua/piridina en presencia de oxígeno y ascorbato se obtiene la formación no enzimática de verdohemo y CO; y luego mediante el agregado de KOH y HCl se obtiene biliverdina. En humanos, una vez producida la reacción catalizada por la HO, actúa la enzima biliverdina IX $\alpha$  reductasa-A y como producto se obtiene la bilirrubina IX $\alpha$  (figura 5) que se excreta por la bilis luego de ser conjugado a ácido glucorónico en el hígado para aumentar su solubilidad. Si bien la bilirrubina IX $\alpha$  es neurotóxica y menos soluble, actuaría como antioxidante. En plantas y cianobacterias la vía de degradación de hemo catalizada por enzimas HO se utiliza además para producir pigmentos - ficobilinas y fitocromobilinas – que son derivados de la biliverdina (Khan y Quigley, 2011; Kim *et al.*, 2006; Protchenko y Philpott, 2003; Sakamoto *et al.*, 2002; Warren y Smith, 2009e; Wilks y Ikeda-Saito, 2014).

Se han reportado otras enzimas capaces de degradar hemo utilizando una ruta diferente a la canónica, incluso en levaduras *hmx-1 $\Delta$*  (*knockout* para el gen *HMX1*) se observó una degradación residual de hemo que apoyaría la existencia de un segundo mecanismo de degradación. Algunas de estas enzimas y sus productos de degradación se muestran en la figura 5 (Protchenko y Philpott, 2003; Wilks y Ikeda-Saito, 2014).

Otro mecanismo de detoxificación es mediado por las enzimas glutatión S-transferasas (GST) que catalizan normalmente la transferencia de glutatión a sustratos electrofílicos para la detoxificación de xenobióticos. También tienen actividad peroxidasa, isomerasa y la capacidad de unir no-catalíticamente diversos ligandos. En *C. elegans* se identificaron GST de un nuevo tipo - tipo Nu - ausentes en otros organismos como los mamíferos. Se observó que las cantidades celulares de estas proteínas responden a la

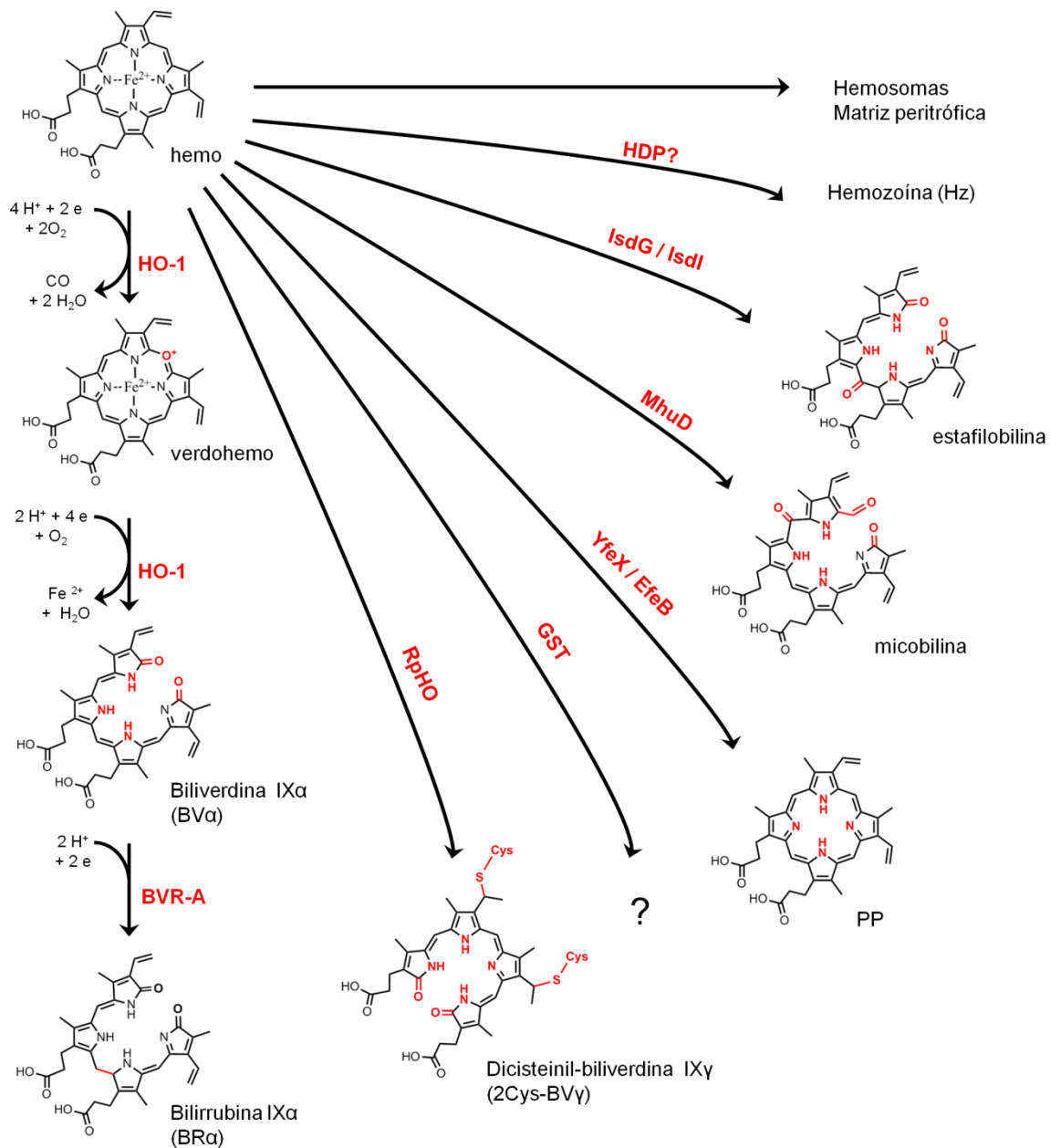
concentración de hemo y son capaces de unirlos con alta afinidad, y se ha propuesto que podrían degradarlo mediante su actividad glutatión peroxidasa (Perally *et al.*, 2008; Sheehan *et al.*, 2001). Por otro lado se ha reportado que el glutatión por sí mismo es capaz de degradar hemo en solución y para eso depende de la presencia de oxígeno. Estudios realizados en eritrocitos indican que el glutatión protege del estrés oxidativo al degradar el hemo que está unido a las membranas de los mismos (Atamna y Ginsburg, 1995).

Algunos organismos parásitos y hematófagos que ingieren gran cantidad de hemoglobina evitan el efecto tóxico del hemo libre acumulándolo en organelas o formando agregados:

➤ En la garrapata *Rhipicephalus microplus* se ha identificado la formación de un agregado no cristalino en una organela especializada de las células epiteliales llamada hemosoma. La garrapata acumula allí el exceso de hemo que adquiere de la digestión de sangre y luego estas células digestivas se desprenden y se eliminan con las heces (Toh *et al.*, 2010).

➤ La matriz peritrófica es una barrera física para retener selectivamente nutrientes en el intestino medio de insectos hematófagos. Esta es una estructura semipermeable formada por proteínas, proteoglicanos y quitina que protegen al epitelio intestinal de la abrasión que podría causarle ciertos metabolitos, virus o bacterias. En el mosquito *Aedes aegypti* se postula que la matriz peritrófica es capaz de unir hemo y cumpliría una función de protección frente a este (Toh *et al.*, 2010).

➤ La hemozoína o pigmento malárico es un polímero cristalino de hemo identificado por primera vez en enfermos de malaria, enfermedad causada por protistas del género *Plasmodium*; también se forma en el lumen intestinal del gusano parásito *Schistosoma mansoni* y del insecto hematófago *Rhodnius prolixus*. El mecanismo de formación no está determinado pero la polimerización sería no enzimática, se cree que proteínas facilitarían la nucleación o la entrega del hemo al polímero. En especies de *Plasmodium* se identificaron las proteínas HDP (*Heme Detoxification Protein*) que podrían participar en el sitio de iniciación (figura 5) (Hamza y Dailey, 2012; Jani *et al.*, 2008; Toh *et al.*, 2010).



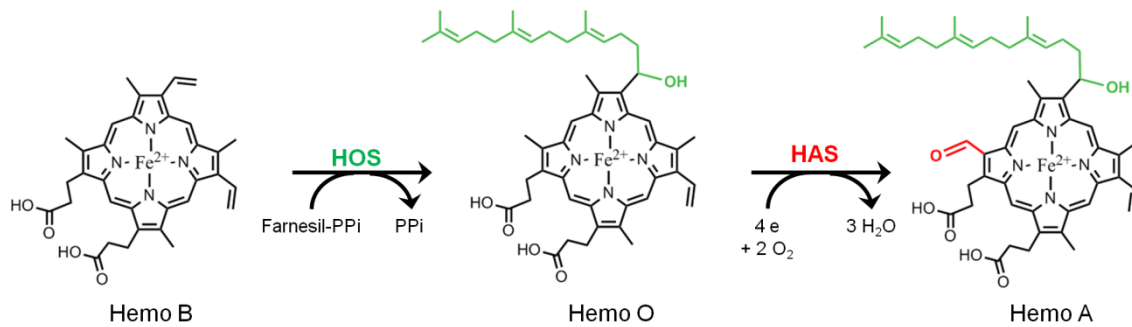
**Figura 5. Mecanismos de detoxificación de hemo.** En la figura se muestra la ruta canónica de degradación de hemo formada por la acción de la hemooxigenasa (HO-1) y la biliverdina IXα reductasa-A (BVR-A) humanas hasta la formación de bilirrubina IXα; en animales los electrones utilizados provienen del citocromo P450 reductasa (Warren y Smith, 2009e). Las rutas no-canónicas de degradación incluyen la HO de *Rhodnius prolixus* (RphO) (Paiva-Silva *et al.*, 2006); las proteínas YfeX y EfeB de *Escherichia coli* con actividad desferroquelatasa (Letoffe *et al.*, 2009); enzimas con actividad tipo oxigenasa que no generan CO y tienen entre sí alta similitud de secuencia (Wilks y Ikeda-Saito, 2014): MhuD de *Mycobacterium tuberculosis* (Nambu *et al.*, 2013), LsdG y IsdI de *Staphylococcus aureus* (Wu *et al.*, 2005) y LsdG de *Bacillus anthracis* (Skaar *et al.*, 2006); y la degradación mediada por GST (Toh *et al.*, 2010). Las enzimas hmuQ y hmuD de *Bradyrhizobium japonicum* (que no se muestran en la figura) con homología a LsdG de *S. aureus* dan como producto biliverdina (Puri y O'Brian, 2006). Como alternativa a la degradación, el hemo puede ser almacenado en hemosomas, retenido en la matriz peritrófica o polimerizar formando hemozoína, proceso por el cual participaría la proteína HDP (*Heme Detoxification Protein*) (Toh *et al.*, 2010). Por simplicidad solo se muestra en detalles la reacción de degradación canónica del hemo.

### **I.1.5. Hemo A, cofactor del complejo citocromo c oxidasa (CcO)**

El hemo A difiere del hemo B por tener un hidroxietilfarnesilo en el carbono 2 del anillo porfirínico en lugar de un grupo vinilo y un formilo en el carbono 8 en lugar de un metilo y se obtiene a partir del hemo B luego de dos modificaciones. La primera modificación está a cargo de la enzima hemo O sintasa (HOS o Cox10, una farnesiltransferasa) que cataliza la síntesis de hemo O mediante la farnesilación del grupo vinilo del hemo B a partir del farnesil pirofosfato (Puustinen y Wikstrom, 1991; Saiki *et al.*, 1993). La segunda reacción involucra la oxidación a aldehído del grupo metilo del hemo O y es catalizada por la enzima hemo A sintasa (HAS o Cox15) (figura 6) (Hederstedt, 2012). Estas enzimas son de codificación nuclear y son proteínas integrales de la membrana plasmática o de la membrana interna mitocondrial en los organismos procariotas y eucariotas, respectivamente (Bestwick *et al.*, 2010; Glerum *et al.*, 1997; Mogi, 2009a). En algunas arqueas existen diferentes variantes de hemo A con etilfarnesilo, etenilgeranilgeranil o, como en el caso de *Aeropyrum pernix*, con hidroxietilgeranilgeranil en su carbono 2 (Hederstedt, 2012).

La única proteína conocida que utiliza hemo A como cofactor es la citocromo c oxidasa (CcO) del tipo  $aa_3$  (también llamado Complejo IV) de la cadena respiratoria, en la membrana interna mitocondrial de organismos eucariotas y en la membrana plasmática de algunos procariotas aeróbicos (Hederstedt, 2012; Moraes *et al.*, 2004). Este complejo es el último en la secuencia de transferencia de electrones de la cadena respiratoria y transfiere los electrones provenientes del citocromo c soluble al oxígeno formando agua. Posee dos moléculas de hemo A, denominados hemo  $a$  y  $a_3$  por sus propiedades espectroscópicas, y dos centros de cobre: CuA y CuB. El hemo  $a_3$  junto al centro CuB forman el sitio catalítico donde se produce la reducción del oxígeno a agua; el centro CuA formado por dos átomos de cobre junto al hemo  $a$  son los encargados de transferir los electrones desde el citocromo c al centro catalítico. Esta reducción es el paso limitante de la cadena respiratoria y se acopla a la translocación de protones generando un gradiente electromotriz en la membrana que es utilizado luego para la síntesis de ATP (Fontanesi *et al.*, 2008; Hederstedt, 2012). Si bien el hemo A posee características diferentes a los otros tipos de hemo (por ejemplo un potencial redox de 230 mV contra los 85 mV del hemo B), en principio el hemo A no es esencial para bombear protones en este tipo de oxidasas con centros de hemo y cobre. Otros complejos

como el citocromo  $bo_3$  de *E. coli* tienen hemo B y O que ocupan lugares similares en la CcO del tipo  $aa_3$  y son capaces de cumplir la misma función catalítica (Hederstedt, 2012).



**Figura 6. Biosíntesis de hemo A.** Reacción de síntesis de hemo O catalizado por la hemo O sintasa (HOS) y de hemo A por la hemo A sintasa (HAS). Se muestran en color las modificaciones realizadas (Hederstedt, 2012).

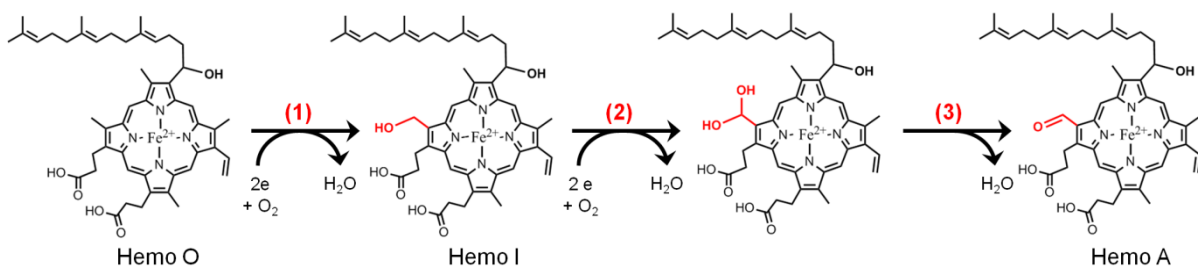
Deficiencias en el complejo CcO provocan alteraciones en la cadena respiratoria y en humanos esto produce diferentes manifestaciones clínicas: trastornos neurodegenerativos como el síndrome de Leigh y la degeneración de las vainas de mielina de las neuronas (leucodistrofia), afecciones en los túbulos renales, afecciones metabólicas como la acidosis láctica en infantes, afecciones musculares como el síndrome piriforme, cardiomiopatía hipertrófica, disminución del tono muscular en recién nacidos (hipotonía) y debilitamiento muscular (ataxia) (Morales *et al.*, 2004; Zee y Glerum, 2006). Distintos estudios clínicos han determinado que estos desórdenes pueden estar originados por mutaciones en los genes *COX10* y *COX15* (Antonicka *et al.*, 2003a; Antonicka *et al.*, 2003b; Valnot *et al.*, 2000; Bugiani *et al.*, 2005; Oquendo *et al.*, 2004).

#### **I.1.5.1. Hemo A sintasa (HAS)**

La reacción catalizada por las HAS se lleva a cabo a través de 2 reacciones sucesivas de monooxigenación (figura 7) (Barros *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2002; Hederstedt, 2012). Aunque las HAS dependen para su actividad de la presencia de oxígeno molecular, estudios con oxígeno marcado demostraron que el átomo de oxígeno incorporado provendría de moléculas de agua y no del oxígeno molecular, por lo que se propone también un mecanismo tipo peroxidasa donde se oxida el carbono vía transferencia de electrones (Brown *et al.*, 2004b; Hederstedt, 2012; Soto *et al.*, 2012).

Actualmente no se conoce la estructura cristalográfica de ninguna HAS ni se ha podido determinar su actividad en ensayos utilizando proteína purificada para así conocer

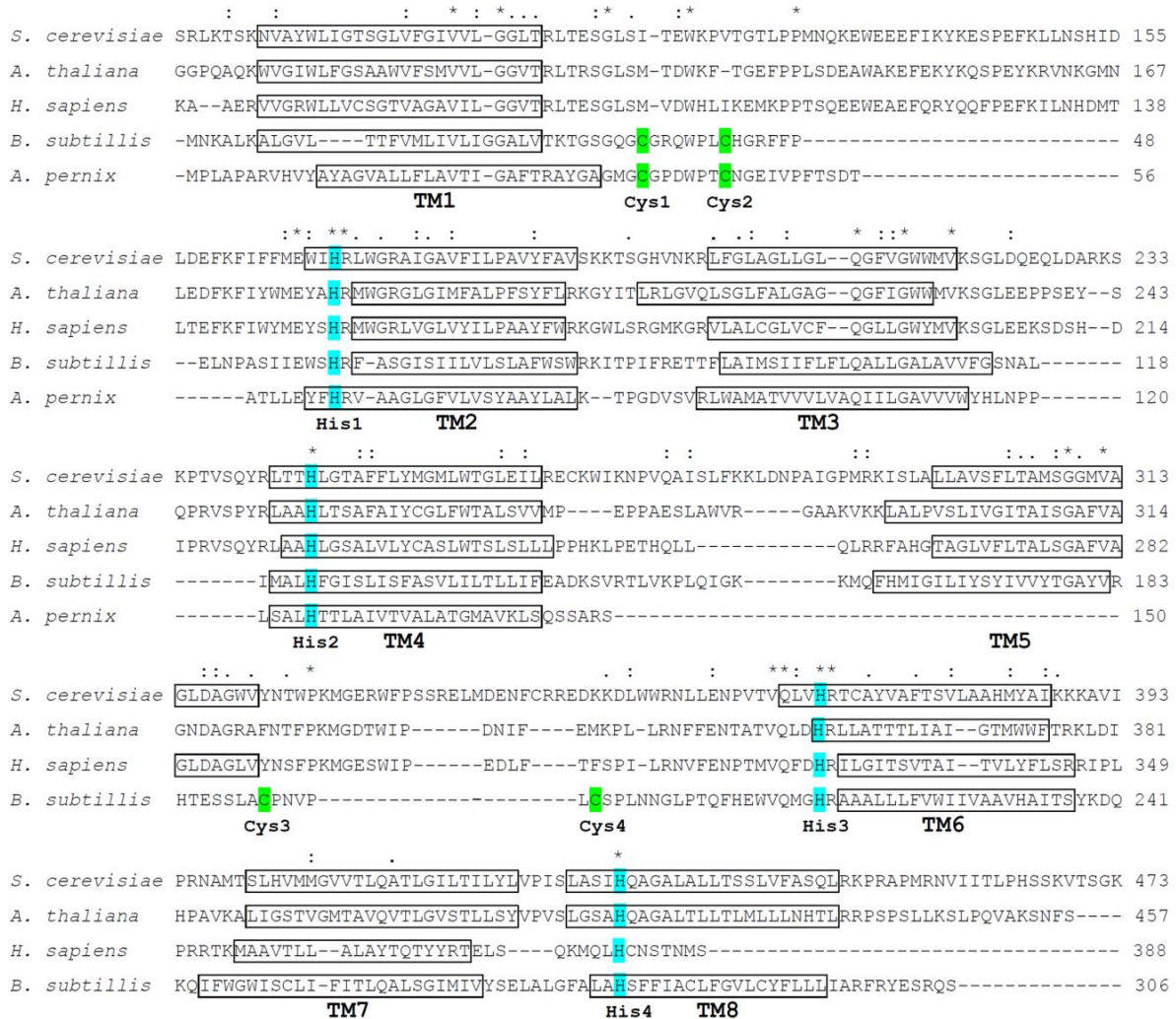
los cofactores necesarios, aunque si se ha medido actividad en extractos de membrana de *E. coli* o de *Bacillus subtilis* que expresan el gen CtaA de *B. subtilis* (Svensson y Hederstedt, 1994; Mogi, 2009a), *Rhodobacter sphaeroides* (Brown *et al.*, 2004a) o *Bacillus stearothermophilus* (Sakamoto *et al.*, 1999). A partir del análisis de su secuencia primaria y utilizando programas predictores de dominios transmembrana disponibles, se determinó que las HAS presentarían 8 hélices transmembranas (TM) y sus orientación probable (ver figuras 8 y 9). La región formada por las TM I y II es la más conservada en secuencia entre los diferentes organismos e incluso en procariotas posee dos cisteínas conservadas en el bucle que las une. Además se han identificado 4 residuos de histidina que se encuentran conservadas en todas las secuencias reportadas hasta la fecha y se postula que las mismas estarían involucradas en la unión del hemo O en la actividad catalítica (figura 8 y figura 9) (Hederstedt, 2012).



**Figura 7. Mecanismo de la HAS.** Los pasos 1 y 2 son monooxigenaciones sucesivas catalizadas por la hemo A sintasa (HAS) donde se forma hemo I con un hidroxilo en el carbono 8 y luego un intermediario inestable con un grupo diol en el mismo carbono. El paso 3 es una deshidratación espontánea donde se forma el grupo formilo del hemo A (Hederstedt, 2012).

Mediante ensayos de mutagénesis sitio dirigida se determinó que existirían dos sitios de unión a hemo, ambos del lado extracelular o del espacio intermembrana mitocondrial para el caso de las HAS procariotas y eucariotas, respectivamente. El primero estaría formado por residuos que pertenecen a la región entre las TM I y II siendo el responsable de la unión de hemo O o hemo A, sustrato y producto. El segundo sitio estaría formado por residuos que pertenecen a las TM V y VI y este uniría una molécula de hemo B que cumpliría el rol de cofactor de la enzima (Hederstedt, 2012; Hederstedt *et al.*, 2005). Además se determinó que los residuos His1 y His3 que se encuentran en cada uno de los sitios de unión serían los responsables de coordinar axialmente al hemo, que el residuo His2 cumpliría un rol esencial en la actividad catalítica de la enzima mientras que el residuo His4 tendría importancia en la unión a hemo pero no sería esencial. Por otro lado se verificó que los residuos de cisteína que se encuentran conservados en organismos procariotas (Cys1 y Cys2)

no cumplirían un rol relevante en la actividad enzimática pero se postula que al formar un enlace disulfuro podrían regular la actividad enzimática en bacterias (Hederstedt, 2012; Hederstedt *et al.*, 2005; Mogi, 2009b). Hasta la fecha no se ha podido dilucidar cómo llega el hemo desde el citosol o la matriz mitocondrial hasta los sitios activos de la enzima.

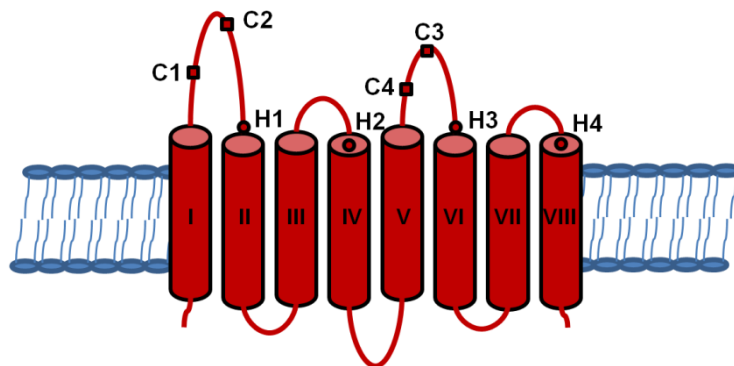


**Figura 8. Alineamientos de secuencias de enzimas hemo A sintasa.** Secuencias de las HAS de *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *H. sapiens*, *B. subtilis* y *A. pernix* - YER141W, XM\_005269539.3, XM\_005269539.3, CAB11340.1 y NP\_148103.2 respectivamente – alineadas con ClustalW. Se muestran recuadradas las 8 TM predichas (7 para el caso de la secuencia de *H. sapiens*), en celeste las 4 histidinas conservadas y en verde las cisteínas conservadas en bacterias (Cys1 y Cys2) y las cisteínas adicionales de *B. subtilis* (Cys3 y Cys4). No se muestran los primeros 60-90 residuos correspondientes a los extremos N-terminales de las secuencias eucariotas. Adaptado de Hederstedt, 2012.

Si bien la secuencia de las HAS está conservada en diferentes organismos, se han reportado algunas particularidades: por ejemplo en las HAS de Actinomycetales (*Mycobacterium* y *Streptomyces*) el residuo His1 fue reemplazado por un residuo de asparagina (Mogi, 2003) y curiosamente a partir de la secuencia genómica de *Thermus thermophilus* se deduce que las HOS y HAS están fusionadas en el mismo polipéptido

(Q5SLI3) (Mogi, 2009b). Algunas arqueas, como la hipertermófila *A. pernix*, poseen un polipéptido de menor tamaño que solo consta de 4 TM pero al formar un homodímero resultaría en un complejo funcional con 8 TM. Se propone que este tipo de polipéptido de menor tamaño se fusionó durante la evolución para formar las HAS distribuidas en la mayoría de los organismos, donde incluso los residuos His1 y His2 tienen posición análoga a los residuos His3 y His4 (Hederstedt, 2012; Lewin y Hederstedt, 2006). En el caso de *Bacillus subtilis*, la secuencia de la HAS posee dos residuos de cisteínas adicionales entre las TM V y VI en posición análoga a las cisteínas en las TM I y II conservadas en los procariotas (Hederstedt, 2012; Mogi, 2009b).

Las HAS no actúan solas en la biosíntesis de hemo A, necesitan el aporte de electrones por parte de una ferredoxina y una ferredoxina reductasa. En *S. cerevisiae* estas funciones la cumplen la ferredoxina Yah1 y la ferredoxina reductasa Arh1. Ambas son proteínas solubles de la matriz mitocondrial están asociadas a la membrana interna y son esenciales para la actividad de HAS. Están conservadas en las distintas especies, aunque por ejemplo Yah1 está fusionada a Cox15 en *Schizosaccharomyces pombe* (Barros *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2004).



**Figura 9. Topología de las enzimas hemo A sintasa.** Modelo de la topología de la proteína HAS de *B. subtilis* determinada por programas predictores. Se muestran las 8 TM con los extremos C-terminal y N-terminal del lado negativo de la membrana – lado citoplasmático o de matriz mitocondrial en el caso de procariotas o de eucariotas respectivamente; y los residuos de histidina conservados – His60, His123, His216 y His278 (H1-4) - y los residuos de cisteína conservados – Cys35 y Cys42 (C1 y C2) en los bucles que quedarían expuestos del lado extracelular o del espacio intermembrana para el caso de procariotas o de eucariotas respectivamente. En el caso de *B. subtilis* se mantienen 2 residuos de cisteína - Cys191 y Cys197 (C3 y C4) - con posiciones análogas a las otras dos cisteínas. Adaptado de Hederstedt, 2012.

Actualmente no se conoce cómo el hemo A es degradado. Se reportó en la polilla *Cerura vinula* la presencia de una bilina denominada CV-bilina que representa a un derivado de la biliverdina IX $\alpha$  pero con un epoxi-dihidroietilfarnesilo como sustituyente en el

carbono 18 y un hidroximetilo en el carbono 13. Por el patrón de sustituyentes, podría ser el producto de degradación del hemo A (Kayser *et al.*, 2014).

### **I.1.5.2. Biosíntesis de hemo A y ensamblado de la citocromo c oxidasa (CcO)**

Es aceptado que el hemo A, por compartir características estructurales con el hemo y por tener un mayor potencial de reducción, es también una molécula altamente tóxica (Hederstedt, 2012). Además si consideramos que es producido para servir como cofactor a una única enzima, la CcO, su síntesis está regulada y acoplada al ensamblado de este complejo.

En *S. cerevisiae*, Cox10 y Cox15 (HOS y HAS, respectivamente) están reguladas tanto a nivel de su síntesis como de su actividad. El gen *COX15*, a diferencia del gen *COX10*, responde transcripcionalmente a la concentración de hemo intracelular. Por otro lado ambos genes responden a diferentes factores transcripcionales que son regulados por la disponibilidad de distintas fuentes de carbono y por los niveles de oxígeno. Además, la cantidad detectada de ambas proteínas resultó diferente, los ensayos de Western blot realizados por Wang y colaboradores mostraron que en células de *S. cerevisiae* la relación entre la concentración de Cox15 respecto de Cox10 es de 8:1 (Wang *et al.*, 2009). Esta y otras observaciones les ha permitido proponer que alguna de las dos proteínas presentaría alguna función adicional a la de su actividad HOS/HAS y que Cox10 sería el paso limitante de la vía de biosíntesis de hemo A. Sin embargo, la regulación de esta ruta no recae principalmente a nivel de la síntesis de ambas enzimas, sino en su actividad. Esto se ha propuesto a partir de ensayos donde se observó que mutantes en el factor de traducción Mss51 que bloquea completamente la traducción de la subunidad 1 de la CcO (Cox1) no afecta los niveles de proteína de Cox10 o Cox15, pero si limita la producción de hemo A (Wang *et al.*, 2009). Por otro lado, la mutación de residuos esenciales de Cox15, que anula su actividad, no genera la acumulación de hemo O en exceso, aún en condiciones donde conjuntamente se sobreexpresaba el gen *COX10*. Estos resultados permitieron proponer que los productos de la enzima Cox15 (hemo A o hemo I) o los intermediarios de la síntesis de CcO regulan la reacción catalizada por Cox10, es decir la farnesilación del hemo B (Barros *et al.*, 2001; Barros y Tzagoloff, 2002).

También se ha propuesto como otro posible punto de regulación la transferencia del hemo O desde Cox10 a Cox15. En función de las predicciones topológicas de las proteínas

HOS y HAS y de donde quedarían localizados los residuos relevantes para su actividad catalítica, se postula que los sitios activos de ambas proteínas quedarían expuestos hacia el mismo lado de la membrana (citoplasma o espacio intermembrana mitocondrial), entonces podría existir un intercambio directo del hemo O entre ambas proteínas, es decir que en esta etapa no existiría un intermediario que medie en el transporte de hemo O (Mogi, 2009a). Brown y colaboradores mostraron mediante ensayos de copurificación *in vitro* que las enzimas HOS y HAS de *B. subtilis* y *R. sphaeroides* pueden interactuar formando complejos (Brown *et al.*, 2004a). Sin embargo este tipo de interacción no ha podido ser comprobada en la mayoría de los organismos eucariotas, lo que sugeriría que existe otro componente encargado de transportar el hemo O entre ambas enzimas o que la interacción entre Cox10 y Cox15 es demasiado inestable como para ser detectada mediante este tipo de experimentos.

En algunos organismos la biosíntesis de hemo A está acoplada a la síntesis y ensamblado del complejo de la CcO a tal punto que deficiencias en la formación de hemo A produce el ensamblado incorrecto del complejo y su posterior degradación (Antonicka *et al.*, 2003a; Antonicka *et al.*, 2003b; Glerum *et al.*, 1997; Moraes *et al.*, 2004). En *S. cerevisiae* los niveles proteicos de las subunidades del complejo CcO se regulan post-traduccionalmente: las que no maduran son degradadas impidiendo su acumulación y agregación, manteniendo así la homeostasis de la membrana (Fontanesi *et al.*, 2008). Además de la biosíntesis de hemo A (Svensson *et al.*, 1993), el ensamblado correcto del complejo depende de proteínas como las encargadas del transporte de cobre – el otro cofactor de la enzima - (Glerum *et al.*, 1996a, b), de proteínas encargadas del procesamiento de los pre-ARNm mitocondriales (McEwen *et al.*, 1986), de factores activadores de la traducción de los ARNm (Costanzo *et al.*, 1986) y factores involucrados en la inserción de las subunidades en la membrana (Fontanesi *et al.*, 2008). En la figura 10 se muestra un esquema del proceso de ensamblado de la CcO. Trabajos recientes en *S. cerevisiae* mostraron que Cox15 interacciona con intermediarios tempranos del ensamblado de la CcO formado por las proteínas Cox1, Mss51, Coa3, Cox14, Coa1, Shy1, Cox5A y Cox6; y particularmente presenta una interacción fuerte con Shy1 (Bareth *et al.*, 2013). También se ha mostrado que Coa2, otro factor de ensamblado localizado en la matriz que interacciona transitoriamente con Shy1 y participa en la incorporación del hemo A en Cox1, permite la oligomerización de Cox15 y además que se produzca la oligomerización de Cox10 acoplada con la síntesis reciente de Cox1 (Bestwick *et*

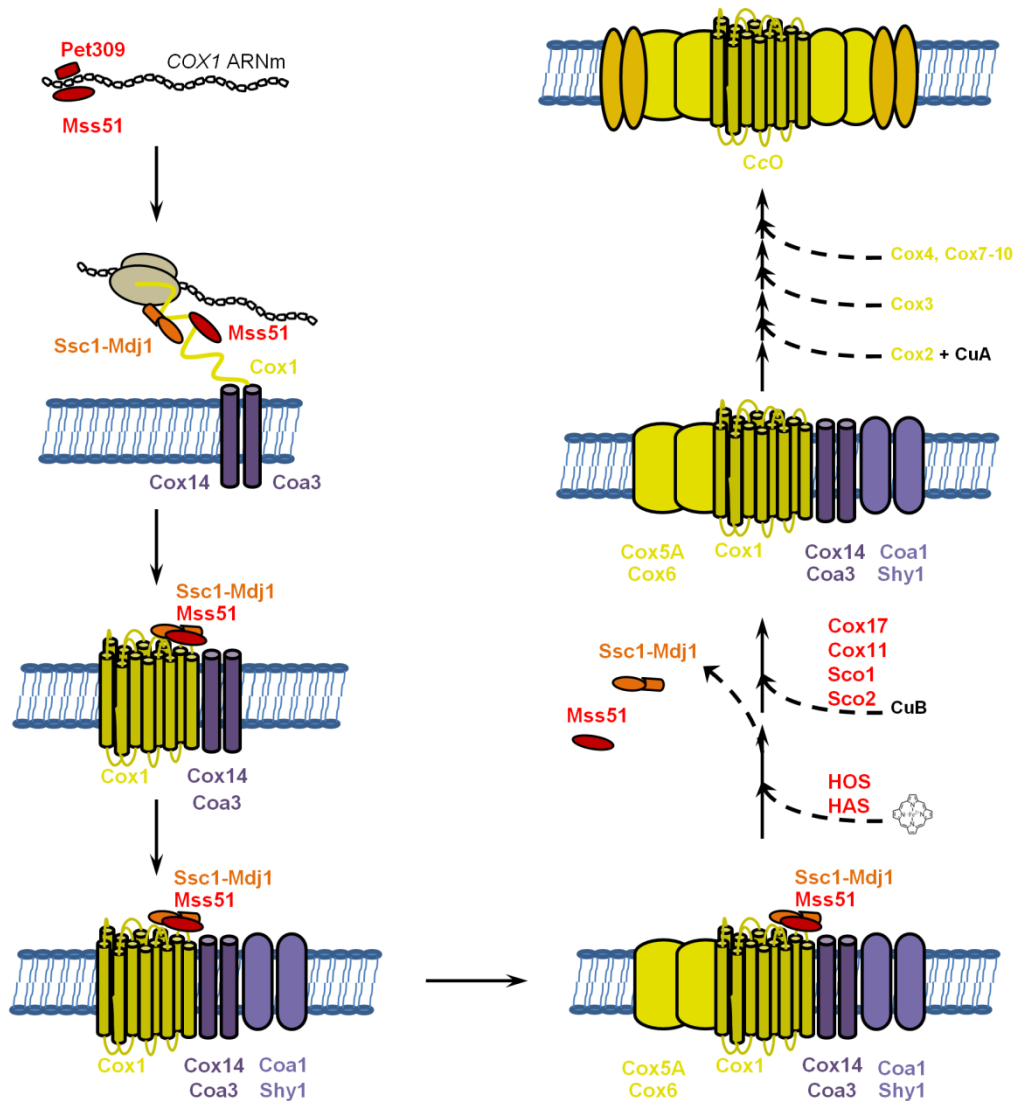
*al.*, 2010; Khalimonchuk *et al.*, 2010; Khalimonchuk *et al.*, 2012). Para desarrollar su actividad HOS, debe producirse la oligomerización de Cox10 y para que esto ocurra es necesario también de la presencia de Coa1, Cox14 y del extremo C-terminal de Cox1 (Bestwick *et al.*, 2010; Khalimonchuk *et al.*, 2012).

Las mayoría de las proteínas mencionadas están conservadas: las subunidades de codificación mitocondrial y nuclear del complejo CcO - aunque estas últimas pueden variar en algunos organismos, las que participan en la entrega de hemo A (Cox10, Cox15 y Shy1) y de los iones cobre (Cox11, Cox17, Sco1 y Sco2), pero no así las proteínas que participan en el procesamiento y traducción de los ARNm como Mss51 y en el ensamblado de las subunidades (Coa1, Coa2, Coa3, Cox14).

## **I.2. Enfermedad de Chagas-Mazza**

La enfermedad de Chagas o enfermedad de Chagas-Mazza, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria sistémica generalmente crónica causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Fue reconocida por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas (1879-1934) que describió completamente la enfermedad, el patógeno (figura 11), el vector hematófago (miembros de la familia Triatominae), el hospedador, las manifestaciones clínicas y la epidemiología. En Argentina, la enfermedad fue estudiada principalmente por el médico Salvador Mazza (1886-1946) a partir de 1926, mostrando la importancia sanitaria de esta endemia en el país y describió las formas clínicas (Rassi *et al.*, 2010).

El ciclo de esta enfermedad se mantuvo naturalmente entre animales (enzoonosis) por miles de años, la transmisión se daba principalmente mediante la picadura de los insectos hematófagos a desdentados, marsupiales y primates, o mediante la ingesta de insectos portadores de *T. cruzi* o de otros animales infectados. Cuando el hombre invadió los distintos territorios para la agricultura y la ganadería hace 200 - 300 años, los triatominos perdieron sus hábitats y fuentes naturales de alimento, se adaptaron a las zonas urbanas y la enfermedad se estableció como zoonosis. Igualmente hay registros más antiguos de la enfermedad en momias de hace 9 mil años encontradas en el norte de Chile y sur de Perú donde se detectó ADN del parásito (Clayton, 2010a; Coura, 2006; Coura y Vinas, 2010).



**Figura 10. Ensamblado de la citocromo c oxidasa (CcO).** Las CcO eucariotas están formadas por varias subunidades (11 en *S. cerevisiae* y 13 en humanos). Las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3 son de codificación mitocondrial y forman el núcleo catalítico: Cox1 une ambas moléculas de hemo A y al centro CuB como cofactores; y Cox2 al centro CuA. Las demás subunidades son periféricas y son de codificación nuclear (Fontanesi *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2012). En *S. cerevisiae* el ARNm de COX1 se traduce en la matriz mitocondrial por la acción de los activadores de la traducción Mss51 y Pet309. Mss51 permanece unido estabilizando al polipéptido luego de ser sintetizado y recién se libera cuando Cox1 madura y promueve así la traducción de más ARNm. Este complejo, Cox1-Mss51, interactúa con los factores de ensamblado Cox14 y Coa3 – proteínas pequeñas de membrana de una sola TM - y con la chaperona mitocondrial Ssc1 del tipo Hsp70 y su co-chaperona Mdj1; lo que permite que Cox1 se inserte en la membrana y se formen sus 12 TM. Luego se incorpora el factor de ensamblado Coa1, el factor Shy1 (ortóloga a Surf1 humana), y las subunidades de la CcO Cox5A y Cox6 que a diferencia de las demás proteínas mencionadas permanecerán en el complejo finalizado el proceso de ensamblado. Luego se insertan las moléculas de hemo A y el centro CuB, y se libera Mss51 (Khalimonchuk *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 2012). Se postula que en bacterias, Shy1 podría transportar el hemo A para su inserción en Cox1, promover la liberación de este de Cox15 o estabilizar el sitio donde se insertaría en Cox1 (Hannappel *et al.*, 2012; Hederstedt, 2012; Soto *et al.*, 2012). La incorporación de los centros CuA y CuB en Cox2 y Cox1, respectivamente, es catalizada por la acción de las proteínas Cox17, Cox11, Sco1 y Sco2. En pasos posteriores se incorporan las subunidades Cox2, Cox3 y las demás subunidades de codificación nuclear (Fontanesi *et al.*, 2008;

Soto *et al.*, 2012) y en los últimos pasos del ensamblado existe interacción con el Complejo III y el citocromo *c* de la cadena respiratoria (Fontanesi *et al.*, 2008).



**Figura 11. *Trypanosoma cruzi*.** Reproducción de los dibujos originales hechos por Carlos Chagas en 1909 describiendo los diferentes estadios en el vector invertebrado y el hospedador mamífero. Adaptado de de Souza, 2009.

Actualmente esta enfermedad es una endemia (proceso patológico que se mantiene a lo largo del tiempo en una población determinada o zona geográfica) en América Latina donde hay un ciclo doméstico y uno selvático que eventualmente se cruzan (Fernandes y Andrews, 2012). Es una de las parasitosis más importantes en Latinoamérica por su persistencia, la falta de drogas que combatan las formas crónicas de la enfermedad y por las pérdidas económicas que causa (Rassi *et al.*, 2010). La enfermedad se caracteriza por desarrollarse lentamente sin diagnóstico en la mayoría de los casos por lo que produce muchos gastos ocultos (que no se asocian directamente a la enfermedad). Se estima que tiene un costo de 7 mil millones de dólares al año, más que otras enfermedades como el cáncer de útero que tiene un costo de 4,7 mil millones de dólares al año (Lee *et al.*, 2013).

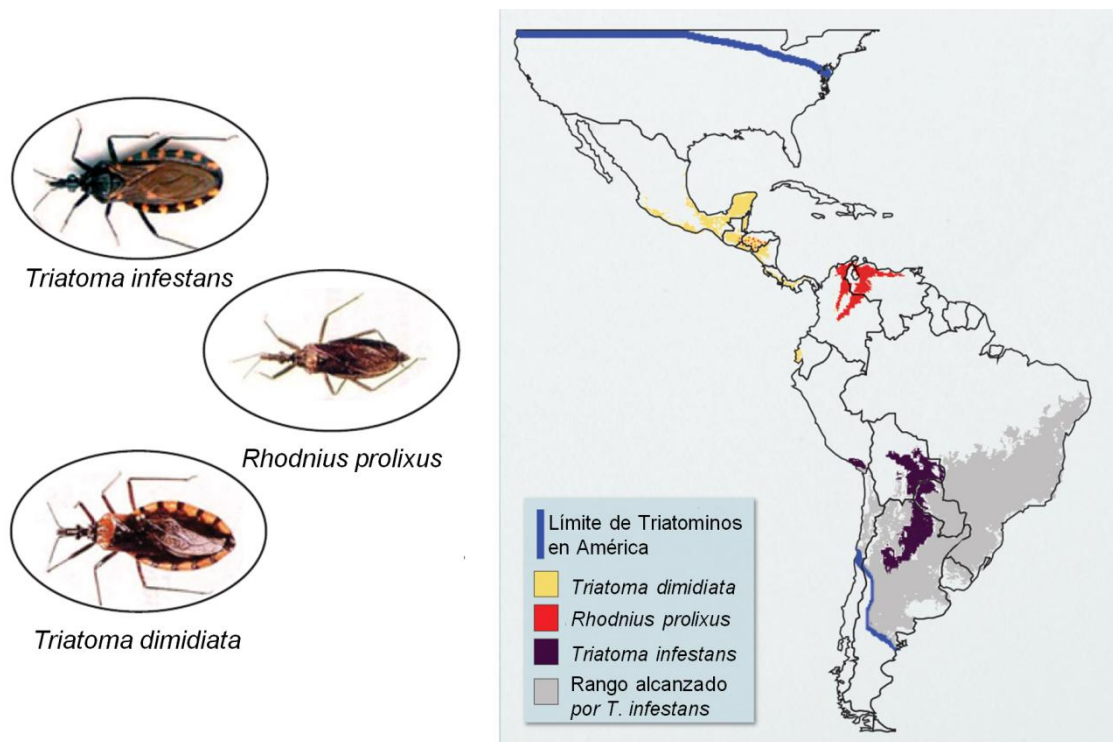
### **I.2.1. Formas de transmisión y distribución geográfica de la enfermedad**

Los insectos vectores y diversos mamíferos, incluidos los domésticos, son reservorio de la enfermedad de Chagas. Hay unas 100 especies de vertebrados que pueden infectarse, entre ellos murciélagos, perros, ratas, cerdos de guinea y otros mamíferos pequeños como

mapaches y zarigüeyas (Clayton, 2010a; Fernandes y Andrews, 2012); y más de 100 especies de triatomos que la transmiten pertenecientes a 3 géneros de la familia Reduviidae subfamilia Triatominae: *Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. Los vectores más importantes en zonas urbanas son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (figura 12). En Argentina el más importante es *T. infestans*, generalmente conocido como vinchuca. Estos insectos poseen actividad nocturna y se esconden en las grietas de las paredes de barro de las casas y en la naturaleza habitan en palmeras, árboles huecos, cuevas y debajo de piedras.

Existen diferentes formas de transmisión de la enfermedad, entre ellas la que se produce cuando el insecto vector se alimenta de los mamíferos y defeca sobre las heridas producidas (transmisión vectorial); también mediante la ingesta de alimentos contaminados ya sea porque los insectos defecaron sobre la comida o bien porque durante el procesamiento de alimentos quedaron incluidos insectos y fueron triturados (transmisión oral). Además, el parásito puede entrar a través de la piel dañada por cualquier lesión, a través de mucosas como los ojos o la boca. También se han descrito otras formas de transmisión: madre-hijo durante el embarazo (Chagas congénito), mediante transfusiones sanguíneas o trasplantes, en accidentes en la manipulación del parásito en tareas de investigación y recientemente se mostraron evidencias de contagio por vía sexual (Alarcon de Noya *et al.*, 2010; Clayton, 2010a; Ribeiro *et al.*, 2016).

Ante este escenario complejo de transmisión de la enfermedad, la forma más efectiva de interrumpir el contagio es evitando la transmisión vectorial. Para ello se ha recurrido a la fumigación con insecticidas con el fin de eliminar al insecto de las zonas habitadas. Desde los años '80 en la Argentina se utilizan insecticidas piretroides para fumigar, pero en ciertas regiones se han encontrado triatomos resistentes a estos compuestos. El otro problema al combatir al insecto es que si bien *T. infestans* no vuela, puede desplazarse por distancias de 200 - 500 metros, por lo que es posible la reinfección de las zonas fumigadas por insectos provenientes de zonas no fumigadas (Petherick, 2010b). Por otro lado en Brasil, que tiene una población de 186,4 millones de habitantes, se certificó la eliminación de la transmisión vectorial del Chagas en el año 2006 luego de campañas de control del vector (Petherick, 2010a), pero desde entonces las otras formas de transmisión se han vuelto relevantes, en especial la transmisión por vía oral detectada en algunas zonas del Amazonas (Coura, 2006; Coura *et al.*, 2002).



**Figura 12. Triatominos.** Distribución geográfica de los tres principales vectores domésticos de la enfermedad de Chagas-Mazza: *T. dimidiata*, *R. prolixus* y *T. infestans*. Diferentes campañas han reducido el área alcanzada por los diferentes vectores, se muestra en la figura el cambio de la zona afectada por *T. infestans*. Adaptado de Rassi *et al.*, 2010 y del artículo “Who, how, what y where?”<sup>1</sup>.

Actualmente, el 99% de los infectados se encuentran en el hemisferio occidental donde de los 10 millones de infectados en el mundo, 8 millones se encuentran en América Latina y aproximadamente 1,5 - 2 millones en Argentina (Coura y Vinas, 2010). Esto representa una prevalencia del 4% en el país, muy superior a la de otras patologías infecciosas como el HIV con prevalencias del 0,3%<sup>2</sup>. Es importante mencionar que en los últimos años y debido a los movimientos migratorios de la población, esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud en zonas no endémicas como en EE.UU., Europa y Asia; aunque en EE.UU. hay antecedentes de la enfermedad en años anteriores: reportándose un caso de Chagas autóctono en 1955 y la presencia de insectos hematófagos desde 1899 (Garcia *et al.*, 2015a; Garcia *et al.*, 2015b). Si bien en regiones como Europa no hay insectos que puedan transmitir a *T. cruzi*, si los hay en EE.UU., África, medio oriente, sureste asiático y oeste del Pacífico (Coura y Vinas, 2010). Algunos reportes indican que en el estado de Texas (EE.UU.) alrededor del 40% de los triatominos (Reisenman *et al.*, 2010) y el 8,8% de los perros de refugios están infectados con el parásito (Tenney *et al.*, 2014). Se estima más de 300 mil infectados en EE.UU., más de 5,5 mil en Canadá y más de 80 mil en Europa y oeste

<sup>1</sup> “Who, how, what and where?”, (2010), Nature 465, S8-9.

<sup>2</sup> Datos del Ministerio de Salud, Argentina (<http://www.msal.gob.ar>).

del Pacífico. En estos casos la forma más común de contagio es a través de la transmisión madre-hijo, trasplante de órganos y transfusiones de sangre ya que la mayoría de estos países no realiza controles de esta enfermedad (Coura y Vinas, 2010). Solo EE.UU., Canadá, España, Reino Unido, Francia, Suecia, Suiza e Italia controlan las donaciones de sangre, mediante análisis bioquímicos o mediante criterios de exclusión de donantes provenientes de zonas endémicas (Angheben *et al.*, 2015).

### **I.2.2. Etapas de la enfermedad y formas clínicas**

El ciclo de la enfermedad se desarrolla en 2 etapas características: la etapa aguda que dura entre 4 y 8 semanas en la cual el parásito se detecta en sangre y una posterior etapa crónica de baja parasitemia (número de parásitos en el torrente circulatorio). La fase aguda se caracteriza por ser asintomática en el 95% de los casos pero en ocasiones se presentan cuadros febriles y hepatoesplenomegalia, entre otros síntomas, todos ellos son inespecíficos y no pueden asociarse fácilmente con la infección. Aún en menor proporción, principalmente en personas inmunodeprimidas o con problemas cardíacos, se presentan cuadros de miocarditis y meningoencefalitis que llevan a la muerte en un 5 – 10% de estos casos sintomáticos. En los casos en que la enfermedad se adquiere por vía oral, la fase aguda es más severa con múltiples afecciones digestivas además de las cardíacas y en algunos casos tienen alta mortalidad (1 - 35%). En la etapa crónica entre el 30 y 40% de los infectados desarrollan sintomatología, principalmente miocardiopatías, dilatación patológica del esófago o del colon por anidación del parásito en estos órganos (megaesófago y megacolon) (Pecoul *et al.*, 2016). La afección más común es la cardiopatía y solo un 10 – 15% de los pacientes sintomáticos desarrollan afecciones digestivas. Los síntomas dependen de la genética del hospedador y de la cepa de *T. cruzi* ya que estas presentan tropismo por diferentes tejidos (Alarcon de Noya *et al.*, 2010; Andrade y Andrews, 2005; Rassi *et al.*, 2010).

Existe una población heterogénea de parásitos, diferentes cepas, que se han agrupado en 6 DTU (*Discrete Typing Units*): *T. cruzi* I al VI o TcI a TcVI. La mayoría de las cepas descritas hasta la fecha pertenecen a TcI y TcII. Si bien el parásito se expande clonalmente, existen cepas híbridas que pertenecen a TcV y TcVI y son híbridos de TcII y TcIII (Coura y Vinas, 2010; Zingales *et al.*, 2009) y de artículo “Who, how, what and where?”<sup>3</sup>). Las

---

<sup>3</sup> “Who, how, what and where?”, (2010), Nature 465, S8-9.

cepas de TcI normalmente desarrollan ciclos selváticos a lo largo de todo el continente americano y son las principales causantes de la enfermedad en la región norte del Amazonas. Las cepas de TcII, TcV y TcVI desarrollan ciclos domésticos y fueron aisladas principalmente en el cono sur de América Latina; en general estas desarrollan la patología de megacolon. Las cepas de TcIII y TcIV infectan esporádicamente a humanos, se encuentran en la zona del Amazonas en el caso de TcIII y norte del Amazonas y América del Norte en el caso de TcIV (Clayton, 2010b; Rassi *et al.*, 2010; Zingales *et al.*, 2009).

### **I.2.3. Tratamiento del Chagas**

Actualmente no existe vacuna para combatir la infección por *T. cruzi* y se cuenta con dos medicamentos específicos: el nifurtimox (Lampit®) lanzado por Bayer en 1967 y el benznidazol (Rochagan®, Radanil®) lanzado por Roche en 1972. Desde el 2012 y luego de años sin producción, el benznidazol (Abarax®) se produce por ELEA en Argentina. En EE.UU., ninguno de estos compuestos están aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) y solo están disponibles para protocolos de investigación<sup>4</sup>. El tratamiento con estos tripanosidas es recomendado y efectivo durante la fase aguda de la enfermedad, en casos de Chagas congénito o en casos crónicos de pacientes jóvenes, menores de 14 años, donde tienen una efectividad del 80% si se completan los 60 días que demanda el tratamiento. El problema que trae este tipo de terapia que involucra tratamientos prolongados, sumado a los efectos secundarios que produce en los pacientes (dermatitis, anorexia, insomnio, vómito, náuseas, neuropatías, etc.), es que muchas veces se los discontinúa y en consecuencia disminuye su efectividad (Clayton, 2010a; Rassi *et al.*, 2010; Schofield *et al.*, 2006). El tratamiento de enfermos crónicos adultos es aún controversial: algunos estudios muestran una disminución en la progresión de los cuadros clínicos, sin embargo otros estudios no reflejan una mejora significativa. En 2015 se publicaron los resultados del ensayo *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis* (BENEFIT) realizado en 5 países de Latinoamérica con más de 2800 pacientes crónicos con cardiopatía chagásica, y se concluyó que si bien la administración de benznidazol produce una disminución de la detección del parásito esto no va acompañado de una mejora en la progresión de los cuadros cardíacos luego de 5 años de seguimiento. Otro resultado muestra que el 17 - 18% de los enfermos crónicos fallecieron a lo largo del estudio. Esto permite estimar, considerando el número de

---

<sup>4</sup> Datos del *Centers for Disease Control and Prevention* de EE.UU. (<http://www.cdc.gov>)

enfermos crónicos, que unas 200 mil personas morirán por esta enfermedad en los próximos 5 años y no se cuenta aún con un tratamiento efectivo para ellos (Machado-de-Assis *et al.*, 2013; Morillo *et al.*, 2015).

### **I.3. Trypanosoma cruzi**

*Trypanosoma cruzi* es un protista perteneciente a la familia de los tripanosomátidos dentro de la clase de los kinetoplástidos; el nombre del género proviene del griego *trypano* (taladro) y *soma* (cuerpo) debido al movimiento que describen al desplazarse. Los tripanosomátidos se caracterizan por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria cuyo ADN se encuentra compactado cerca de la base del flagelo en una estructura denominada kinetoplasto. Son organismos heterótrofos y hasta ahora todas las especies conocidas son parásitos que pueden tener ciclos de vida simples - con un solo huésped - o ciclos de vida complejos (o digenéticos) que comprenden varias etapas diferenciadas en dos huéspedes. Algunas especies ocasionan enfermedades en humanos y animales, como son los casos de *Trypanosoma brucei* causante de la tripanosomiasis africana (o enfermedad del sueño) transmitida por la mosca tse-tsé (del género *Glossina*) y las diferentes especies de *Leishmania* causantes de la leishmaniasis transmitida por moscas de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Otras especies como *Trypanosoma vivax* infectan a ganado y a especies de animales silvestres; y las especies del género *Phytomonas* infectan plantas (Tielens y van Hellemond, 2009).

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

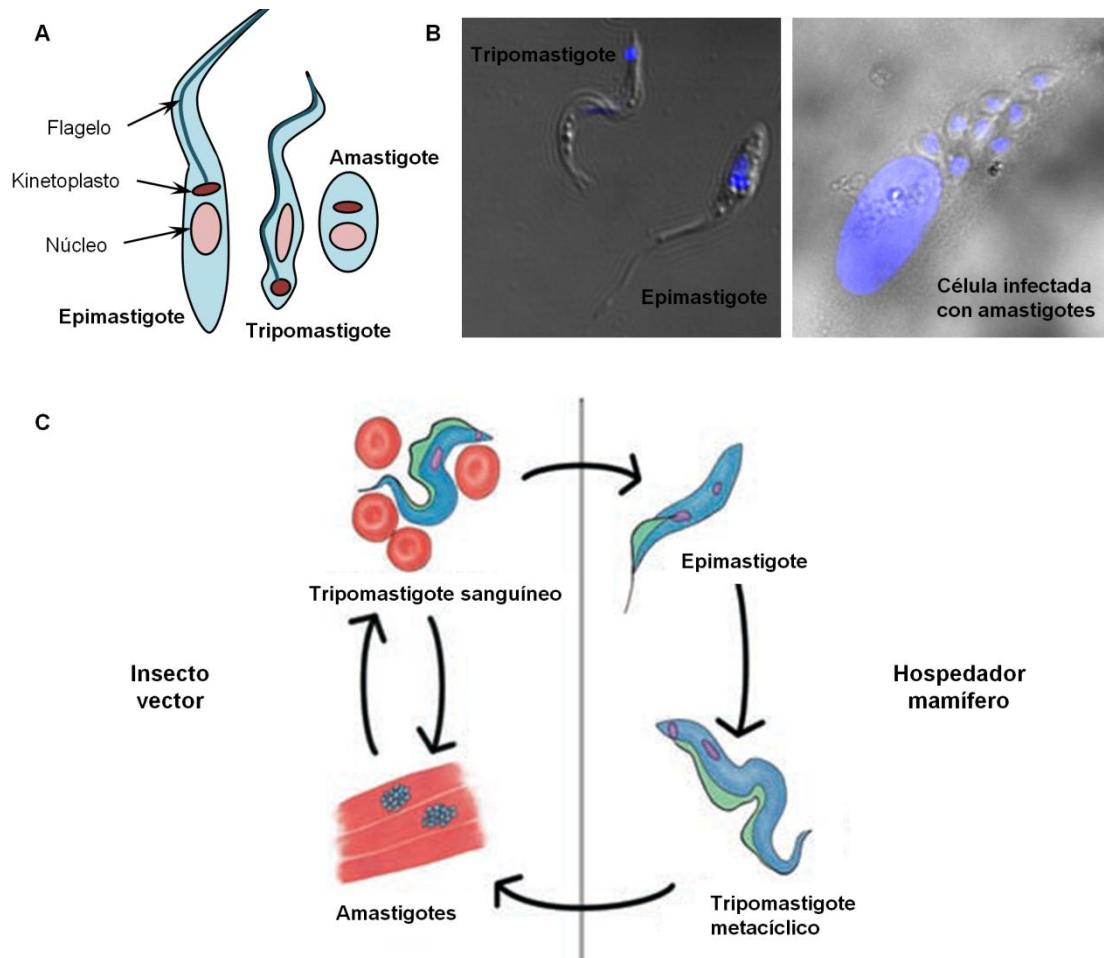
*T. cruzi* presenta un ciclo de vida digenético, alterna entre los hospedadores vertebrados y el insecto vector. Los principales estadios del parásito - epimastigote, tripomastigote metacíclico, amastigote y tripomastigote sanguíneo - se muestran en la figura 13.A y B (de Souza, 2002).

El ciclo inicia cuando el insecto ingiere sangre de un hospedador infectado tomando así la forma circulante no replicativa del parásito, denominada tripomastigote sanguíneo. En el estómago del insecto se diferencian a la forma epimastigote, pasando por un estado intermedio de esferomastigotes. El epimastigote es la forma replicativa no infectiva del parásito que se divide por fisión binaria. En su trayecto por el tracto digestivo del insecto se unen a través del flagelo mediante interacciones hidrofóbicas a la membrana perimicrovillar

de la parte posterior del recto, proceso favorecido por la disminución de glucosa que produce la elongación del flagelo. Esta interacción sumado a la disminución de nutrientes desencadena la metacicloogénesis, que es la diferenciación a la forma infectiva no replicativa denominada tripomastigote metacíclico, y luego de este proceso, el parásito se desprende del tracto digestivo (de Souza *et al.*, 2010; Tyler y Engman, 2000, 2001). Los tripomastigotes ingresan al torrente sanguíneo del hospedador mamífero a través de las heces del insecto cuando éste se alimenta del hospedador y desde allí invaden las células nucleadas del organismo. Una vez dentro de la célula se diferencian en amastigote que es la forma replicativa intracelular, inmóvil y de flagelo corto. Luego de 9 divisiones celulares, los amastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigote sanguíneo pasando por un estadio de morfología similar al de epimastigote pero intracelular, denominado *epimastigote-like*; los tripomastigotes al ganar movilidad producen la lisis celular. Al quedar otra vez en circulación, los tripomastigotes sanguíneos son capaces de infectar otras células o de reiniciar el ciclo de infección si algún insecto hematófago se alimenta del hospedador infectado (figura 13.C) (Andrade y Andrews, 2005; de Souza, 2002, 2009; de Souza *et al.*, 2010; Tyler y Engman, 2001). Los tripomastigotes sanguíneos se pueden diferenciar por su morfología en dos clases, los *slender* y los *stumpy* o *stout*, siendo estos últimos la forma intermedia entre los tripomastigotes *slender* y los amastigotes (de Souza *et al.*, 2010).

A partir de ensayos de infección *in vitro* se observó que los tripomastigotes sanguíneos que no invadieron células adoptaban una forma redondeada sin flagelo similar a los amastigotes y además se replican y mantienen su capacidad infectiva; debido a las características morfológicas se los ha denominado amastigotes extracelulares (Ley *et al.*, 1988; Tyler y Engman, 2001). Si bien la relevancia de este estadio durante la infección del hospedador es controversial, se ha reportado que en ratones el 10% de los parásitos circulantes en sangre presentan características similares a los amastigotes extracelulares infectivos. Por esto se propone que los tripomastigotes sanguíneos adoptarían siempre la forma de amastigotes, intracelular o extracelular dependiendo de si invaden o no una célula (Andrews *et al.*, 1987; de Souza *et al.*, 2010). De todas maneras, la presencia de amastigotes extracelulares en los ensayos de infección *in vitro* podría ser una consecuencia de la liberación prematura de amastigotes de las células antes de adoptar la forma de tripomastigote ya que la diferenciación de amastigote a tripomastigotes no está sincronizada (de Souza, 2002; Ley *et al.*, 1988). Por otro lado, los tripomastigotes metacíclicos, a

diferencia de los sanguíneos, mueren si no han invadido alguna célula luego de 24 h (Tyler y Engman, 2001).



**Figura 13. Estadios de *Trypanosoma cruzi*.** Los epimastigotes tienen de 20 - 40  $\mu\text{m}$  de largo con el kinetoplasto en la parte anterior y un núcleo redondeado. Los tripomastigotes (sanguíneos o metacíclicos) tienen 25  $\mu\text{m}$  de largo con el kinetoplasto en la parte posterior y un núcleo alargado centrado en el cuerpo. En epimastigotes y amastigotes el kinetoplasto tiene forma de barra y se encuentra perpendicular al eje del flagelo; mientras que en tripomastigotes tiene forma redondeada; en todos los casos se localiza cerca del cuerpo basal del flagelo y hay una estructura que lo conecta con él (de Souza, 2002, 2009). A) Esquemas de los distintos estadios del parásito adaptado de de Souza, 2002. B) Microscopías de los distintos estadios del parásito con el ADN teñido con DAPI. En el caso de las células infectadas, también se observa marcado el núcleo de la misma. C) Esquema del ciclo de vida de *T. cruzi*. Adaptado de Atwood *et al.*, 2005.

Los estadios dentro del hospedador son los relevantes para el estudio de la infección, y en especial el estadio de amastigote que es la forma replicativa y la que permanece latente durante años. A pesar de su importancia, la mayoría de los estudios se han realizado sobre el estadio de epimastigote. Esto se debe a que este estadio es replicativo y extracelular, lo que permite que sean cultivables fácilmente en medios de cultivos (Camargo, 1964; Tyler y Engman, 2001). En los laboratorios de investigación el estadio de epimastigote se mantiene

de rutina en cultivos axénicos y luego mediante diferentes estrategias se obtienen los estadios de tripomastigotes y amastigotes, *in vitro* o infectando animales de laboratorio (De Lima *et al.*, 2008; Schuster y Sullivan, 2002).

### **I.3.2. Mecanismos de invasión**

Los resultados aportados por estudios de infección por *T. cruzi in vitro* permitieron identificar que la invasión a células (fagocíticas y no fagocíticas) puede proceder mediante diferentes mecanismos, pero todos ellos incluyen: el reconocimiento entre proteínas de la membrana del parásito y del hospedador, internalización y formación de una vacuola (vacuola parasitófora), y el posterior escape de la vacuola que permite al parásito establecerse como amastigote en el citosol celular y replicarse. El estadio de amastigote es inmóvil y esto sería necesario para mantenerse dentro de las células del hospedador y permitir su replicación (Andrade y Andrews, 2005). En la etapa de reconocimiento intervienen las mucinas del parásito que reconocen proteínas del hospedador, además de transialidasas y neuraminidasas que reconocen azúcares (Barrias *et al.*, 2013; Fernandes y Andrews, 2012). Si bien las neuraminidasas y transialidasas son importantes en la invasión, también cumplen un rol relevante en la etapa de escape del parásito de la vacuola parasitófora: aumentan en cantidad luego de la invasión y remueven ácido siálico de la membrana de la vacuola haciéndolas más sensibles a la acción de la proteína Tc-TOX. Tc-TOX es similar al factor 9 del complemento humano, es activa en medio ácido y forma poros en la membrana (Hall *et al.*, 1992; Ley *et al.*, 1990).

En el caso de las células fagocíticas, estas son capaces de fagocitar las diferentes formas del parásito: *T. cruzi* interacciona con receptores de membrana de las células fagocíticas que inducen la polimerización de actina, invaginación de la membrana plasmática alrededor del parásito y formación de una vacuola con el parásito dentro (Barrias *et al.*, 2013). En el caso de los epimastigotes, estos también son internalizados pero son destruidos en la vacuola y no escapan al citosol como si lo hacen los estadios de tripomastigotes y amastigotes (Romano *et al.*, 2012).

Entre las células no fagocíticas, el parásito es capaz de infectar cualquier célula nucleada, pero las más afectadas son las células del tejido del músculo cardíaco y esquelético y tejido adiposo. Además, la persistencia se da principalmente en células musculares y es el tejido muscular cardíaco el más afectado en las formas clínicas de la

enfermedad. Es por esto que resulta importante dilucidar el mecanismo de invasión a células no fagocíticas (Andrade y Andrews, 2005). En estas células cada estadio del parásito tiene un patrón diferente de entrada y de maduración de la vacuola parasitófora que es independiente de la cepa. Una vez que el parásito se encuentra en la vacuola, el tráfico intracelular, la salida de la vacuola y la replicación es similar para los diferentes estadios, solo difieren en la velocidad del proceso: mientras que los tripomastigotes escapan de la vacuola y se diferencian a amastigotes a las 2 h de la invasión, los amastigotes, que tienen transialidasas y Tc-TOX activas desde el inicio de la invasión, escapan antes de la vacuola parasitófora (Fernandes y Andrews, 2012; Hall *et al.*, 1992; Ley *et al.*, 1990; Stecconi-Silva *et al.*, 2003). Una vez que se establecen en el citoplasma, los amastigotes tienen el mismo tiempo de duplicación independientemente de que si provienen de una infección con la forma de tripomastigote o de amastigote. En el caso de los amastigotes extracelulares, se ha descrito que estos interactúan por cualquier zona de su membrana con las células no fagocíticas, inducen la polimerización de actina y la posterior internalización en un proceso similar a la fagocitosis (de Souza *et al.*, 2010; Ley *et al.*, 1988; Mortara *et al.*, 2005). Por otro lado, los tripomastigotes interactúan por su zona posterior - contrario a la dirección de desplazamiento - y desencadenan su internalización por diversos mecanismos (de Souza *et al.*, 2010). El mecanismo de internalización de los tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos sería el mismo, pero como poseen diferentes proteínas de superficie presentan diferente infectividad: los metacíclicos poseen menos transialidasas activas y por eso son retenidos más tiempo en la vacuola parasitófora (Fernandes y Andrews, 2012). Los dos principales mecanismos de invasión que han sido descritos para tripomastigotes son:

➤ Mecanismo  $\text{Ca}^{2+}$ -lisosoma dependiente (también ocurre en células fagocíticas). Es similar al mecanismo de reparación de membranas pero en este caso la membrana no se daña. La interacción del tripomastigote con la célula induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular. Los lisosomas que son reclutados por los microtúbulos cerca de la membrana plasmática se fusionan a esta (exocitosis) aportando membrana para la formación de la vacuola parasitófora y en este proceso liberan esfingomielinasa. Esta enzima degrada la esfingomielina de la membrana produciendo ceramida que facilita la deformación de la membrana y por ende la endocitosis. Es un mecanismo irreversible e independiente de actina (Andrade y Andrews, 2005; Fernandes *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 1995; Tardieux *et al.*, 1992).

➤ Mecanismo fosfoinositol 3-quinasa (PI3Q) dependiente. Durante la interacción del tripomastigote con la membrana de la célula hospedadora se activa una PI3Q clase I y se acumula

fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato y fosfatidilinositol 3,4-bifosfato en la membrana de la célula hospedadora. Esto provoca la invaginación de la membrana plasmática en esa región, lo que produce la internalización del parásito en la vacuola parasitófora. Este es un mecanismo independiente de actina (no es fagocitosis) y reversible, si no se produce la fusión posterior a lisosoma que permite la actividad de la Tc-TOX, la vacuola se fusiona nuevamente con la membrana plasmática y se liberan los tripomastigotes al medio extracelular (Andrade y Andrews, 2004; Woolsey *et al.*, 2003).

El 20% de los tripomastigotes se internalizan por el mecanismo  $Ca^{2+}$ -lisosoma dependiente y un 50% por el mecanismo PI3Q dependiente. Existirían otros mecanismos responsables de la internalización: macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolinas y flotilinas (Barrias *et al.*, 2013) e incluso se han observado marcadores de la vía autofágica como LC3 en muchas vacuolas (Romano *et al.*, 2009) pero la relevancia de cada uno de estos mecanismos no ha sido aún determinada.

### **I.3.3. Estructura celular**

*T. cruzi* es un organismo eucariota que presenta una organización celular clásica con la mayoría de las organelas típicas de una célula de mamífero. Sin embargo, presenta algunas estructuras diferentes que se detallan a continuación, muchas de ellas son características de los tripanosomátidos (de Souza, 2008):

➤ La superficie celular está conformada por la membrana plasmática (MP) que no presenta pared celular y por debajo de esta se encuentra una capa formada por microtúbulos subpeliculares que envuelven casi completamente el volumen celular. Se pueden diferenciar 3 macrodominios en la MP: un cuerpo celular, un flagelo que nace de una invaginación llamada bolsillo flagelar y el bolsillo flagelar. Este último es una zona especializada de la membrana que no posee la capa de microtúbulos y presenta una alta actividad endocítica y exocítica (de Souza, 2009).

➤ Los reservosomas son compartimentos ácidos presentes sólo en los epimastigotes, se ubican en la parte posterior de la célula y desaparecen durante la metaciclologénesis. Se forman a partir de fusiones de vesículas de la vía endocítica que provienen del bolsillo flagelar y vesículas de la vía secretoria provenientes del Golgi. En ellos se acumulan y degradan principalmente las proteínas, y además se acumulan lípidos (Cunha-e-Silva *et al.*, 2006; de Souza, 2009; Sant'Anna *et al.*, 2004).

➤ La membrana nuclear tiene la particularidad de permanecer intacta durante todo el ciclo celular. El genoma nuclear es de 43 – 50 Mpb distribuido entre 30 a 40 cromosomas de 0,45 - 4 Mpb cada uno. En el estadio de tripomastigote no se observa nucléolo y la transcripción debido a las ARN polimerasas I y II es baja durante la metaciclologénesis (de Souza, 2002).

➤ El ADN de la única mitocondria que posee el parásito forma una estructura compacta llamada kinetoplasto, que es distintivo en los tripanosomátidos. El kinetoplasto representa el 20 - 25% del ADN de la célula y está formado por cientos de minicírculos de 0,5 - 2,5 kpb y una docena de maxicírculos de 20 - 40 kpb. El kinetoplasto codifica para los ARNr y los ARNm de algunas de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Una característica de estos organismos es que también presentan ARN guías que dirigen el ARN *editing* (editado de ARN): inserción/delección de uracilos en los ARN mitocondriales. Este proceso de *editing* dificulta el estudio de los genes de codificación mitocondrial ya que las secuencias de los ARN maduros difieren de las secuencias genómicas mitocondriales. La mayoría de las proteínas que se encuentran en la mitocondria son de codificación nuclear, se sintetizan en ribosomas libres en el citoplasma y se mantienen desplegadas hasta que se importan en la mitocondria. Estas proteínas presentan un péptido señal necesario para su direccionamiento a la organela que son más cortos de lo habitual, de 6 a 8 aminoácidos normalmente combinando serina, leucina y aminoácidos básicos. Se ha descrito una maquinaria de importación mitocondrial que es similar a la de los demás eucariotas (de Souza, 2009; de Souza *et al.*, 2009).

➤ Los glicosomas son organelas que concentran proteínas básicas al igual que los peroxisomas de las células animales, se cree que estos tendrían el mismo origen evolutivo. La diferencia reside principalmente en que los glicosomas no poseen catalasas pero poseen las enzimas para los primeros 7 pasos de la glucólisis - la conversión de glucosa a 3-fosfoglicerato (3PG). Además contienen enzimas de otras vías metabólicas como las del salvataje de purinas, síntesis *de novo* de pirimidinas, elongación de ácidos grasos (AG) y síntesis de isoprenoides y esteroides. Se postula que la compartimentalización de estas vías metabólicas le permitiría al parásito una rápida adaptación ante los cambios de ambiente que sufre a lo largo de su ciclo de vida. La adaptación ocurriría por la degradación por autofagia de las organelas que no son útiles y así de todas las enzimas que contienen (de Souza, 2009; Michels *et al.*, 2006).

➤ Los acidocalcisomas son vacuolas que contienen polímeros lineales de ortofosfato (fosfatos unidos por enlaces fosfoanhidro de alta energía), pirofosfato y fosfato. Además acumula iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y en menor proporción  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ ; regulan su pH mediante una ATPasa translocadora de  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$  y son importantes en la osmorregulación celular (de Souza, 2002).

➤ La vacuola contráctil está formada por microtúbulos conectados a una vacuola contráctil central localizada cerca del bolsillo flagelar. Al igual que los acidocalcisomas, participan en la regulación de la osmorregulación, al poseer acuoporinas (de Souza, 2009).

### **I.3.4. Metabolismo energético**

Todos los tripanosomátidos son parásitos y dependen metabólicamente del hospedador, por ejemplo las especies de *Phytomonas* que infectan plantas metabolizan principalmente sacarosa, las especies que habitan en el flujo sanguíneo de animales tienen acceso a grandes cantidades de glucosa y los parásitos que habitan en el intestino de los insectos tienen mayor disponibilidad de aminoácidos. Igualmente, no siempre concuerda la fuente de energía utilizada con el metabolito más abundante en ese ambiente, es así que diferentes parásitos que habitan el mismo tejido no siempre utilizan los mismos metabolitos (Tielens y van Hellemond, 2009).

*T. cruzi* presenta preferencia por distintas fuentes de carbono según el estadio en que se encuentre. Los epimastigotes son capaces de metabolizar tanto glucosa como aminoácidos pero ante la presencia de ambos tienen preferencia por la glucosa. En el intestino del insecto la glucosa no es abundante por lo que se cree que utilizaría en mayor proporción aminoácidos, en especial la prolina (Cazzulo, 1992; Maugeri *et al.*, 2011). De todas maneras los medios de cultivo que resultaron eficientes y son utilizados para el crecimiento de estos *in vitro* - LIT (*Liver Infusión Tryptose*) y BHI (*Brain Heart Infusión*) – tienen glucosa como fuente de carbono (Camargo, 1964; Warren, 1960). Además, los epimastigotes y los tripomastigotes sanguíneos, a diferencia de los amastigotes, expresan un transportador de glucosa por lo que podrían incorporarla para luego ser utilizada como fuente de carbono (Silber *et al.*, 2009). Durante el pasaje de tripomastigotes sanguíneos a amastigotes intracelulares, la concentración de glucosa disminuye y esto va acompañado de un cambio de un metabolismo basado en carbohidratos a un metabolismo basado en la degradación de lípidos. A baja concentración de glucosa, los amastigotes tendrían activa la vía de la gluconeogénesis para la síntesis de glucosa necesaria para las glucoproteínas y glucoinositolfosfolípidos (Atwood *et al.*, 2005). Por otro lado, los tripomastigotes metacíclicos poseen un catabolismo no glucolítico: degradan proteínas y aminoácidos para utilizarlos como fuentes de carbono (Cazzulo, 1992).

En los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, las diferentes fuentes de carbono afectan tanto a la replicación como a los procesos de diferenciación. La metaciclogénesis es sensible a la presencia de ciertos azúcares, por ejemplo la presencia de glucosa y fructosa inhiben el proceso (Tyler y Engman, 2001). También se observó que una deficiencia en la disponibilidad de prolina arresta la diferenciación de amastigote a tripomastigote en el

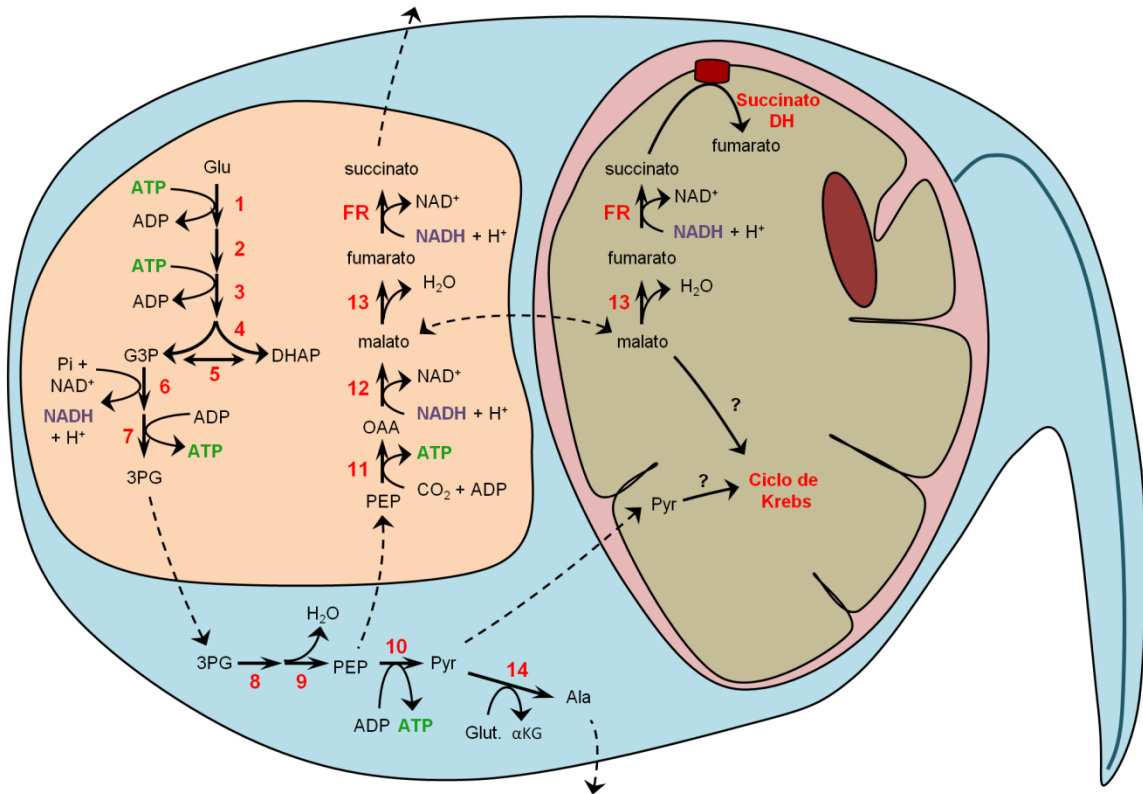
estadio *epimastigote-like* (Tonelli *et al.*, 2004). Y a partir de ensayos de diferenciación *in vitro*, se observó que la transición amastigote-epimastigote es reversible y depende de glucosa (Tyler y Engman, 2000).

*T. cruzi* utiliza la glucólisis y el ciclo de Krebs para la degradación de las diferentes fuentes de carbono antes mencionadas (figura 14). Una particularidad reside en que la glucólisis no está regulada alostéricamente en las primeras enzimas como sucede en la mayoría de los organismos sino que la regulación de la vía reside en la compartimentalización en el glicosoma de las primeras 7 enzimas donde la glucosa se convierte en 3-fosfoglicerato (3PG). Luego el 3PG se transporta al citosol para producir piruvato y luego poder entrar al ciclo de Krebs en la mitocondria. Se cree que el glicosoma cumple un papel esencial en la regulación de la vía, ya que en ausencia de regulación alostérica en las primeras enzimas el ATP producido en las últimas etapas de la glucólisis aceleraría los primeras etapas (cuando se forma glucosa-6P y fructosa-1,6BP mediante la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa) - lo que se denomina efecto turbo - pero esto no ocurre ya que los últimos pasos ocurren en el citosol. A falta de regulación alostérica de la glucólisis, al disminuir la presencia de oxígeno disminuye el consumo de glucosa, generando el fenómeno que se denomina “efecto Pasteur inverso”. Por otro lado se especula que el ciclo de Krebs completo no funciona para producir energía, sino que funcionaría parcialmente en el sentido anabólico para la gluconeogénesis y síntesis de ácidos grasos (AG) o para las últimas etapas de la degradación de aminoácidos (Haanstra *et al.*, 2008; Maugeri *et al.*, 2011; Michels *et al.*, 2006; Tielens y van Hellemond, 2009).

En cuanto a las otras rutas del metabolismo de carbohidratos, *T. cruzi* no acumula polisacáridos de reserva, toda la glucosa que importa es degradada. También puede realizar la gluconeogénesis ya que tienen las enzimas principales para ello, pero separadas de la vía glucolítica gracias al glicosoma evitando así un ciclo fútil. Además, se ha mostrado que la vía de las pentosas fosfato es activa en todos los estadios del ciclo de vida del parásito (Maugeri *et al.*, 2011; Michels *et al.*, 2006).

A partir de ensayos realizados en cultivos de epimastigotes, se mostró que cuando el parásito crece en medio suplementado con glucosa, el 25 – 30% de la glucosa metabolizada se libera al medio como succinato (Bowman *et al.*, 1963). El succinato es el principal producto de degradación seguido luego por la alanina; ambos metabolitos se producen consumiendo el poder reductor en la célula mediante procesos de fermentación. También se

observó la producción de acetato, pero posiblemente este sea producto de degradación de la  $\beta$ -oxidación de AG y no de la metabolización de la glucosa. Los aminoácidos consumidos producen amonio que se libera al medio aumentando el pH y esto compensa la disminución del pH producida por la liberación de ácidos orgánicos (Cazzulo, 1992, 1994; Tielens y van Hellemond, 2009).



**Figura 14. Metabolismo energético de *T. cruzi*.** Solo se muestran los intermediarios más relevantes para la interpretación del metabolismo aeróbico fermentativo: Glu (glucosa), DHAP (dihidroxiacetona-fosfato), G3P (gluceraldehído-3-fosfato), 3PG (3-fosfoglicerato), Pyr (piruvato), Glut (glutamato),  $\alpha$ KG ( $\alpha$ -cetoglutarato), Ala (alanina), PEP (fosfoenolpiruvato) y OAA (oxalacetato). Enzimas de la glucólisis: hexoquinasa (1), glucosa-6-fosfato isomerasa (2), fosfofructoquinasa (3), aldolasa (4), triosa-fosfato isomerasa (5), gluceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (6), fosfoglicerato quinasa (7), fosfoglicerato mutasa (8), enolasa (9) y piruvato quinasa (10). Las enzimas involucradas en la síntesis de succinato desde PEP son: PEP carboxiquinasa (11), malato deshidrogenasa (12), fumarato hidratasa (13) y fumarato reductasa (FR). La producción de alanina es por la alanina aminotransferasa (14). Adaptado de Maugeri *et al.*, 2011; Tielens y van Hellemond, 2009.

*T. cruzi*, al igual que los demás tripanosomátidos, no puede independizarse del consumo de oxígeno a través de una cadena respiratoria mitocondrial (figura 15) a pesar de tener un metabolismo fermentativo. A este tipo de metabolismo se lo denomina fermentativo aeróbico (Tielens y van Hellemond, 2009). *T. cruzi* presentaría una respiración deficiente por poseer cantidades menores de los componentes de la cadena respiratoria (citocromo *b* y citocromos *aa*<sub>3</sub>) en relación a las células de mamíferos; esto lo compensaría

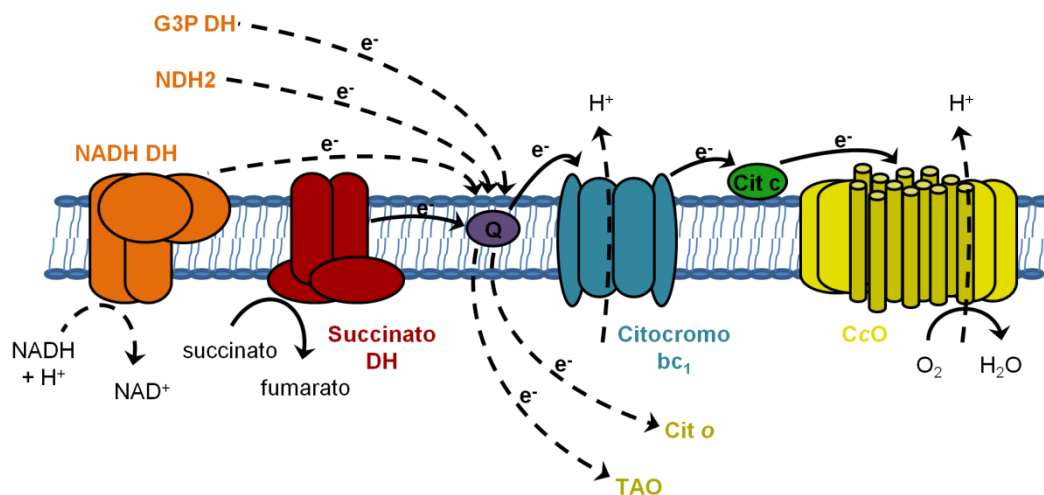
utilizando compuestos orgánicos como aceptor final de electrones (De Boiso *et al.*, 1979). Además, si bien la respiración es más eficiente que la fermentación en la obtención de energía, al habitar en medios que son ricos en diversas fuentes de carbono la prioridad reside en poder responder rápidamente a los cambios en el medio para obtener energía y no en la utilización eficiente de cada una (Bringaud *et al.*, 2006; Michels *et al.*, 2006).

### **I.3.5. La succinato reductasa y la cadena respiratoria mitocondrial**

El succinato es producido en el glicosoma mediante 4 reacciones enzimáticas a partir del fosfoenolpiruvato (PEP) que fue previamente producido en el citosol. Las enzimas involucradas son: la PEP carboxiquinasa, la malato deshidrogenasa, la fumarato hidratasa y por último la fumarato reductasa, esta última no se encuentra presente en células de mamíferos (figura 14). Tanto la malato deshidrogenasa como la fumarato reductasa consumen NADH, por lo que la producción de una molécula de succinato consume las dos de NADH producidas en la glucólisis por molécula de glucosa; de esta forma se balancea el estado redox del glicosoma y el succinato es secretado al medio. A pesar de esto, el 70% de la glucosa es convertida en succinato y esto se debe a que las últimas 2 etapas pueden ocurrir también en la mitocondria a partir del malato transportado desde el glicosoma y el citosol (Bringaud *et al.*, 2006; Denicola *et al.*, 2002; Michels *et al.*, 2006). El succinato es el mayor dador de electrones a la cadena respiratoria mitocondrial a través de la succinato deshidrogenasa (complejo II) (Denicola-Seoane *et al.*, 1992). Si bien los genes para la NADH deshidrogenasa (complejo I) se conservan en el genoma de *T. cruzi*, el aporte de electrones de este complejo no es significativo y tampoco es capaz de bombear protones a diferencia de las NADH deshidrogenas de otros organismos. Se postula que el complejo se conservaría porque cooperaría en la formación de los supercomplejos respiratorios estabilizándolos y permitiría una transferencia de electrones más eficiente entre ellos (Carranza *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). Se postula también que habría un aporte de electrones desde una glicerol-3P deshidrogenasa (G3PDH) del lado externo de la membrana interna mitocondrial (Michels *et al.*, 2006) y una NADH deshidrogenasa insensible a rotenona (NADH<sub>2</sub>) como la detectada en *T. brucei* (Fang y Beattie, 2002).

Además de los complejos NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa, *T. cruzi* completaría su cadena respiratoria con los siguientes complejos y enzimas: una citocromo *bc*<sub>1</sub> (complejo III) (Tielens y van Hellemond, 2009); un citocromo *c* soluble responsable del

transporte de electrones - aunque este tiene la particularidad de que la unión del hemo a la proteína se da a través de una sola unión covalente a cisteína (Allen *et al.*, 2004), oxidadas terminales para la reducción del oxígeno y un complejo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa para la síntesis de ATP (Stoppani *et al.*, 1980). A partir de los resultados obtenidos de estudios bioquímicos y espectroscópicos se ha propuesto que existirían múltiples oxidadas terminales generando así una cadena respiratoria ramificada (figura 15). Estudios bioquímicos y espectroscópicos determinaron que una CcO del tipo *aa3* sensible a cianuro sería la principal oxidasa terminal de la cadena ramificada, siendo la responsable del 94% del consumo de oxígeno en epimastigotes (Affranchino *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 2011; Tielens y van Hellemond, 2009). En ensayos similares realizados en los demás estadios (amastigotes, tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos) se detectó una actividad respiratoria con sensibilidad a cianuro similar a la mostrada en epimastigotes y esto ha permitido proponer que en *T. cruzi* no habría un cambio en el mecanismo respiratorio a lo largo de su ciclo de vida (Gutteridge *et al.*, 1978). Además de los estudios bioquímicos, en estudios de proteómica se identificaron subunidades pertenecientes al complejo CcO en el estadio de epimastigote y tripomastigotes metacíclicos (Ferella *et al.*, 2008; Parodi-Talice *et al.*, 2007).



**Figura 15. Cadena transportadora de electrones mitocondrial de *T. cruzi*.** En el esquema se indican los diferentes componentes de la cadena mitocondrial y la dirección del flujo de electrones. NADH2 (NADH deshidrogenasa insensible a rotenona), G3PDH (glicerol-3fosfato deshidrogenasa), Q (ubiquinona), Cit c (citocromo c), CcO (citocromo c oxidasa), Cit o (citocromo o) y TAO (*Trypanosome Alternative Oxidase*). Adaptado de Silva *et al.*, 2011.

Diferente a lo planteado para *T. cruzi* es el comportamiento observado en *T. brucei*. Este presenta una mitocondria completamente desarrollada con actividad CcO y unos 50 glicosomas en el estadio procíclico (en el insecto vector) pero en los estadios sanguíneos

muestra una mitocondria rudimentaria, de menor volumen y menor actividad donde además se observa la actividad de una oxidasa terminal alternativa del tipo planta (AOX), llamadas *Trypanosome Alternative Oxidase* (TAO), sensible a SHAM (ácido salicilhidroxámico) y en contrapartida tiene unos 200 glicosomas de mayor tamaño (Chaudhuri *et al.*, 2005; de Souza, 2008; Shiba *et al.*, 2013). Las AOX son proteínas transmembrana ampliamente distribuidas en plantas y en algunos otros eucariotas y procariotas, poseen un centro catalítico con 2 átomos de hierro no hemínico, tienen actividad quinol oxidasas que no bombea protones a través de la membrana - transfieren los electrones desde la ubiquinona al oxígeno sin pasar por el complejo III (McDonald, 2008). En el estadio sanguíneo de *T. brucei* el potencial de membrana necesario para el transporte mitocondrial y la biogénesis de la misma se mantendría por el complejo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa mitocondrial funcionando en el sentido de la hidrólisis de ATP, bombeando protones y consumiendo el ATP producido en la glucólisis (Schnauffer *et al.*, 2005).

En *T. cruzi*, además de la CcO del tipo *aa3* sensible a cianuro y azida, se ha detectado espectroscópicamente la presencia de un citocromo *o* y un citocromo *d*, y se propone también la existencia de una TAO como en *T. brucei* sensible a SHAM o bien que alguno de los citocromos anteriores tendrían dicha actividad TAO (Affranchino *et al.*, 1986; Carneiro y Caldas, 1982; Silva *et al.*, 2011; Stoppani *et al.*, 1980). Pero hasta la fecha los resultados de ensayos realizados con inhibidores de los complejos respiratorios no son concluyentes. Rogerson y Gutteridge determinaron que la respiración es insensible a SHAM tanto en epimastigotes, tripomastigotes sanguíneos y amastigotes (Rogerson y Gutteridge, 1977; Rogerson y Gutteridge, 1979). Sin embargo, los trabajos de Felix y colaboradores y de Stoppani y colaboradores mostraron que en epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, el SHAM inhibe un 35% y el cianuro un 80% del consumo de oxígeno (Felix *et al.*, 1978; Stoppani *et al.*, 1980), pero esta situación cambia en epimastigotes en fase estacionaria donde se observó la inhibición completa del consumo de oxígeno por cianuro (Stoppani *et al.*, 1980). Además estos resultados son contradictorios con los obtenidos por Engel y colaboradores que observaron que la respiración es inhibida por SHAM independientemente de la fase de crecimiento del parásito (Engel *et al.*, 1990).

Actualmente la existencia de una TAO en *T. cruzi* no ha sido descartada a pesar de que no se ha encontrado en ninguno de los genomas secuenciados hasta la fecha, una secuencia génica que codifique para una proteína con homología de secuencia a AOX de

otros organismos. Por otro lado, el rol de la citocromo *c* no es claro: a través de análisis espectroscópicos pudo determinarse que sus niveles no se vieron afectados ante la variación de los niveles de oxígeno, como si lo hace la CcO (Harrison, 1972). Por otro lado, en *Crithidia fasciculata* (Kusel y Storey, 1973) y en *Leishmania tropica* (Martin y Mukkada, 1979) estos complejos no tienen actividad de oxidasa terminal, y en epimastigotes de *T. cruzi* las cantidades de citocromo *c* superan la cantidad de CcO detectada (12 y 0,7 nmol/mg proteína, respectivamente) lo que sugiere que debería ser responsable en mayor medida del consumo de oxígeno en este organismo (Affranchino *et al.*, 1986). Por otro lado, la presencia de citocromo *c* no pudo ser detectada espectroscópicamente en todas las cepas de *T. cruzi* ensayadas (Engel *et al.*, 1990).

Mientras que el rol de las otras oxidاسas no ha sido determinado y no se conoce si son realmente las responsables del consumo de oxígeno residual observado cuando se inhibe la CcO con cianuro, tampoco puede ser atribuido a la formación de EROs. La producción de EROs es normal en un metabolismo aeróbico y aumenta cuando la cadena respiratoria (o fotosintética) se encuentra inhibida: el oxígeno toma electrones de los complejos que transportan electrones formando  $O_2^-$ , luego se forma  $H_2O_2$  por la superóxido dismutasa y por la reacción de Fenton el radical  $OH^\cdot$ . En *T. cruzi*, la producción de EROs es del orden de los pmols/min  $\times 10^8$  x células, por lo que no podría justificar el consumo de oxígeno residual del orden de los nmols/min  $\times 10^8$  x células cuando se trata con cianuro (Silva *et al.*, 2011).

#### **I.4. Metabolismo de hemo en tripanosomátidos**

Los tripanosomátidos carecen total o parcialmente de la ruta de biosíntesis de hemo (hemo B) (figura 2 y 3) (Korený *et al.*, 2010). Si bien distintos estudios bioquímicos han mostrado la existencia de la actividad de ALAS y FeCH (la primer y última enzima de la ruta) en *T. cruzi* (Lombardo *et al.*, 2003; Salzman y Batlle, 1986; Salzman *et al.*, 1986; Salzman *et al.*, 1982) y de ALAS y FeCH en *Leishmania donovani* (Srivastava *et al.*, 1997), se cree que en estos estudios la actividad detectada podría ser resultado de contaminaciones con este tipo de enzimas provenientes del suero fetal bovino (SFB) utilizado en el medio de cultivo (Lubel *et al.*, 2008). Además, la actividad ALAS en *L. amazonensis* fue descartada en estudio genéticos donde se transfectó al parásito con las siguientes enzimas de la ruta y no se obtuvo producción de los intermediarios esperados de la vía de biosíntesis de hemo (Sah *et*

al., 2002). La ausencia de alguna ruta biosintética de hemo fue corroborado posteriormente, a excepción de *Leishmania* spp., cuando se reportaron las secuencias genómicas de las distintas especies. Es poco probable que las enzimas de la vía hayan divergido lo suficiente como para que no sean encontradas en las búsquedas por homología; incluso en parásitos del género de *Plasmodium*, que posee un genoma muy divergente, se conserva la vía clásica de biosíntesis de hemo reportada en células eucariotas no fotosintéticas (Korený *et al.*, 2010).

En el genoma de *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* se identificaron ortólogos a las últimas 3 enzimas de la vía: CPOX, PPOX y FeCH (Korený *et al.*, 2010) y se postula que los amastigotes intracelulares de *Leishmania* podrían acceder al intermediario COPRO de la célula hospedadora y convertirlo en hemo, si bien esto no ha sido aún demostrado experimentalmente (Korený *et al.*, 2013). Análisis filogenéticos realizados por Koreny y colaboradores agruparon a estas enzimas con las de las  $\gamma$ -proteobacterias y permitieron postular que la vía de biosíntesis de hemo se perdió durante la evolución de los Kinetoplástidos previo a la adaptación al parasitismo, pero luego se recuperó parcialmente por transferencia horizontal en las especies de *Leishmania*. Esto es avalado por el hecho que *Bodo saltans*, un organismo de vida libre del cual descienden los tripanosomátidos, carece de esta vía (Korený *et al.*, 2010).

De igual manera que se estudió la biosíntesis de hemo, se analizó la vía de degradación. La actividad hemooxigenasa (HO) o los productos de degradación biliverdina y verdohemo fueron detectados en extractos de *Leishmania donovani* (Srivastava *et al.*, 1997) y de *T. cruzi* (Cicarelli *et al.*, 2007; Cupello *et al.*, 2014); pero los resultados son controversiales ya que ninguno de estos ensayos muestra degradación de hemo y formación de biliverdina pasando por verdohemo en un mismo ensayo experimental. Podría tratarse, al igual que con los ensayos de biosíntesis de hemo antes mencionados, de contaminaciones o de otro mecanismo de degradación. No se encontraron secuencias génicas que codificarían para enzimas HO conocidas en estos organismos ni en otros tripanosomátidos.

#### **I.4.1. Transporte de hemo en tripanosomátidos**

Como se mencionó en la sección I.1, el hemo es esencial para múltiples funciones celulares como en la cadena respiratoria, la síntesis de AG y esteroides, y mecanismos de detoxificación; y dentro de los organismos eucariotas aeróbicos solo *Phytomonas* puede

crecer sin esta molécula. Siendo entonces los tripanosomátidos auxótrofos para el hemo, este debe ser incorporado desde el medio extracelular, ya sea el insecto vector o los hospedadores mamíferos. Una vez internalizado, el grupo hemo debe ser transportado y ensamblado en las apoproteínas correspondientes para dar lugar a hemoproteínas o podría ser también utilizado como fuente de hierro (Tong y Guo, 2009).

*T. brucei* en su forma sanguínea replicativa incorpora hemo de la hemoglobina por endocitosis desde el complejo haptoglobina-hemoglobina (HpHb) con su receptor TbHpHbR que se localiza cerca del en bolsillo flagelar. La presencia de este receptor también fue observada en *T. vivax* y *T. congolense* que, al igual que *T. brucei*, solo tienen estadios sanguíneos extracelulares en los hospedadores mamíferos. En cambio la forma procíclica de *T. brucei*, forma replicativa dentro del insecto, incorpora hemo a partir de su forma libre y no hemoglobina (Perez-Morga *et al.*, 2005; Vanhamme *et al.*, 2003; Vanhollebeke *et al.*, 2008; Vanhollebeke *et al.*, 2007). En cuanto al transporte de hierro, sólo la forma sanguínea 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).

Las formas replicativas de *Leishmania*, los amastigotes intracelulares en el hospedador mamífero y los promastigotes en el insecto, son capaces de unir hemo en su membrana y se sugiere que este sería incorporado mediante transportadores de manera más rápida que la incorporación de hemoglobina (Campos-Salinas *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2009; Galbraith y McElrath, 1988). La proteína LHR1, ortóloga a HGR-1 y HRG-4 de *C. elegans*, que se encuentra localizada en la membrana plasmática y en compartimentos endocíticos, estaría involucrada en la importación de hemo libre pero no se conoce si transporta el hemo o simplemente forma parte y acompaña al/los transportador/es. Esta proteína sería importante tanto para la replicación de promastigotes como para la infección y replicación de amastigotes (Huynh *et al.*, 2012; Miguel *et al.*, 2013; Renberg *et al.*, 2015). En distintos trabajos se determinó que la hemoglobina es tomada también por ambos estadios (amastigotes intracelulares y promastigotes) por endocitosis mediada por receptor (Carvalho *et al.*, 2009; Krishnamurthy *et al.*, 2005) y la proteína LABC5 localizada en vesículas internas facilitaría el tráfico intracelular hacia la mitocondria del hemo proveniente de la degradación de hemoglobina (Campos-Salinas *et al.*, 2011). *T. brucei* y *T. cruzi* también poseen ortólogos de esta proteína (Leprohon *et al.*, 2006). Por otro lado, se demostró que amastigotes de *Leishmania* en el interior de la vacuola parasitófora de los macrófagos

pueden tomar hierro; estas vacuolas son ricas en las diferentes formas de hierro (hierro libre, hemo libre y hemoglobina) que provienen del reciclado de la hemoglobina y la transferrina (Taylor y Kelly, 2010).

Dado el amplio rango de hospedadores es posible que *T. cruzi* utilice diferentes fuentes de hierro: la mioglobina de los músculos y el hemo en el estadio de amastigote; hemoglobina y transferrina en el estadio de tripomastigote sanguíneo; o transferrina, hemoglobina y hemo provenientes de la ingesta de sangre en los estadios de epimastigote en el insecto (Taylor y Kelly, 2010). Lara y colaboradores demostraron que los epimastigotes eran capaces de incorporar la hemoglobina por endocitosis y por otro lado al hemo mediante un transportador de membrana, siendo este último proceso más rápido que la internalización de hemoglobina; la importación de ambos compuestos procedería por el bolsillo flagelar y luego se produciría la acumulación de los mismos en la zona posterior del parásito, posiblemente en los reservosomas (Lara *et al.*, 2007). También se mostró en el mismo trabajo y en otro posterior (realizado en colaboración con nuestro laboratorio) que el sistema de transporte de hemo involucraba la actuación de un complejo proteico dependiente de energía y posiblemente del tipo ABC (Cupello *et al.*, 2011; Lara *et al.*, 2007). Si bien no se ha identificado aún el transportador, en nuestro laboratorio hemos identificado una proteína de *T. cruzi*, denominada TcHTE por *Heme Transport Enhancer*, que presenta homología de secuencia a la proteína LHR1 de *Leishmania* y a HGR-1 y HRG-4 de *C. elegans*; TcHTE localiza en el bolsillo flagelar y favorece la incorporación de hemo en el estadio de epimastigote. Por otro lado, nuestros resultados mostraron que solo los estadios replicativos de *T. cruzi* (epimastigote y amastigotes) son capaces de incorporar hemo libre, no así el estadio de tripomastigote sanguíneo (Merli *et al.*, 2016). Si bien se ha determinado *in vitro* la capacidad de los amastigotes y epimastigotes de unir transferrina, esto no sería relevante en el estadio de amastigote por la baja presencia de esta proteína en el citosol celular (Taylor y Kelly, 2010).

#### **I.4.2. Relevancia del estudio del metabolismo de hemo en *Trypanosoma cruzi***

Como se mencionó en la sección I.1.3, el hemo libre junto a la hemoglobina y la mioglobina son las mayores fuentes de hierro en el cuerpo humano. Además se controlan los niveles de estas fuentes como estrategia para disminuir el efecto tóxico (del hemo libre) y como respuesta de inmunidad nutricional contra patógenos (Haley y Skaar, 2012; Hamza y

Dailey, 2012). Es por esto que el estudio del transporte, la distribución intracelular y la utilización de estas fuentes de hierro son de importancia e incluso son considerados actualmente como un nuevo blanco quimioterapéutico antibacteriano (Wilks y Burkhard, 2007). Los organismos eucariotas no fotosintéticos que son capaces de sintetizar hemo terminan la síntesis en la mitocondria y desde allí el hemo debe ser transportado a los demás compartimentos subcelulares: RE, núcleo, peroxisomas y espacio intermembrana de la mitocondria (figura 3). En este último compartimento es donde el hemo es utilizado para el ensamblado de citocromos y por las HOS y HAS para la biosíntesis de hemo A y el ensamblado de este en la CcO. Los tripanosomátidos que son auxótrofos para esta molécula (Korený *et al.*, 2010), deben incorporarla del medio y transportarla a los diferentes compartimentos subcelulares incluida la mitocondria (matriz y espacio intermembrana), y al mismo tiempo controlar los niveles de esta para evitar su citotoxicidad. En tripanosomátidos, como la obtención de hemo es diferente a la de otros eucariotas, es razonable pensar que las proteínas involucradas en su transporte y distribución diferirían de las de otros organismos, especialmente de especies como el humano, haciéndolas interesantes como posibles blancos de drogas. Además, el estudio de los mecanismos de transporte en la mayoría de los organismos modelo se ve dificultado por la biosíntesis de hemo endógeno, no siendo posible diferenciar el hemo que se sintetiza intracelularmente del incorporado del medio extracelular. Es por esto que *T. cruzi* resulta interesante para el estudio de los mecanismos de transporte de hemo: por ser una ruta esencial en el parásito y como modelo de estudio de los mecanismos de transporte en general.

### **I.5. Objetivos**

Por lo expuesto, para este trabajo de Tesis nos proponemos como objetivos generales, en primer lugar, estudiar aspectos generales del transporte de hemo en epimastigotes de *T. cruzi*:

1- estudiar la dependencia a la disponibilidad de hemo en el medio que presentan diferentes cepas con el objetivo de entender las necesidades del parásito por esta molécula y poder analizar cómo puede afectarlo su toxicidad;

2- estudiar el efecto que causa en el crecimiento y en el transporte de hemo la presencia de diferentes análogos de hemo con el objetivo de utilizarlos como herramientas para el estudio del transporte de hemo y poder determinar su especificidad.

En segundo lugar y debido a que *T. cruzi* dependería de una CcO del tipo  $\alpha\alpha 3$  durante todo su ciclo de vida, planteamos que la síntesis, distribución y ensamblado del cofactor hemo A en la CcO también serían esenciales. Para profundizar su estudio, proponemos para este trabajo:

3- generar herramientas para el estudio de la HAS del parásito denominada TcCox15: obtención de anticuerpos específicos contra la enzima para verificar la expresión de la enzima en todos los estadios del parásito y su localización;

4- generar mutantes puntuales de residuos conservados en esta proteína y posteriormente analizar la relevancia de los mismos en la actividad de la enzima TcCox15;

5- comprobar que TcCox15 es la responsable de la biosíntesis de hemo A en epimastigotes y la esencialidad de esta ruta como forma indirecta de comprobar la relevancia de la CcO del tipo  $\alpha\alpha 3$ ;

6- estudiar la importancia de TcCox15 durante la infección por tripomastigotes y en la replicación de amastigotes.

## II- MATERIALES Y MÉTODOS

## **II.1. Análisis bioinformático**

### **II.1.1. Análisis predictivo**

Las secuencias genómicas se obtuvieron de las bases de datos de tripanosomátidos TritypDB (<http://tritypdb.org/tritypdb/>) (Aslett *et al.*, 2010), de *Saccharomyces genome database* (<http://www.yeastgenome.org/>) y de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 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 *Ident and Sim* ([http://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)). Los dominios conservados se identificaron con el programa CDART del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>) (Geer *et al.*, 2002)

Las secuencias proteicas se analizaron con el programa CCTOP (*Constrained Consensus TOPology prediction server*, <http://cctop.enzim.ttk.mta.hu>) (Dobson *et al.*, 2015) para determinar las probables regiones transmembrana. Los péptidos señal y la probabilidad de localización mitocondrial fueron predichos con el programa MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) (Claros y Vincens, 1996) y Targetp (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson *et al.*, 2000). Para determinar regiones de mayor antigenicidad se utilizó el programa Preditop (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) (Kolaskar y Tongaonkar, 1990).

La masa molecular de las proteínas se calculó a partir de sus secuencias primarias con el programa Compute pI/MW ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)).

### **II.1.2. Análisis de secuencias**

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 fueron 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/>).

## **II.2. Cepas bacterianas, levaduras y líneas celulares**

### **II.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<sup>r</sup>** (*F' ompT (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>+</sup>) dcm gal (DE3) pLys<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup>*).

### **II.2.2. Cepas de levaduras utilizadas**

Para los estudios de la funcionalidad de las proteínas estudiadas se utilizaron las siguientes cepas de *S. 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.).
- **cox15 $\Delta$** , derivada de DY5113 (W303): MATa *ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1 $\Delta$  ura3-1 cox15::KanMX4* (Buchensky *et al.*, 2010).

### **II.2.3. Líneas celulares utilizadas**

Para el estudio de la biosíntesis de hemo A se utilizó la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* y en el estudio del transporte de hemo se utilizaron las cepas Dm28c (Tcl, aislado en Carabobo – Venezuela, de *Didelphis marsupialis*) y CL Brener (TcVI, aislado en Rio Grande do Sul – Brasil, de *Triatoma infestans* (Zingales *et al.*, 2009).

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.

## **II.3. Técnicas de cultivo**

### **II.3.1. 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). En su forma sólida, este medio incluye 1,5% p/v agar-agar. Se emplearon los siguientes antibióticos: 50  $\mu$ g/ml kanamicina, 30  $\mu$ g/ml cloranfenicol y 150  $\mu$ g/ml ampicilina, según el plásmido a seleccionar.

A menos que se indique lo contrario, los cultivos fueron incubados a 37 °C.

### **II.3.2. 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  $\text{CaCl}_2$  (Sambrook *et al.*, 1989) con las modificaciones que se detallan a continuación. A partir de un cultivo bacteriano saturado (crecido ON) se realizó una dilución 1/100 en medio LB fresco (ver sección II.3.1) y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una  $\text{DO}^{600\text{nm}} \sim 0,5$  (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 2500 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  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_d$  (agua destilada) estéril en lugar de ADN. Una vez descartado el sobrenadante, las células se lavaron con 500  $\mu\text{l}$  de 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  frío y estéril, y se centrifugaron nuevamente. Se volvió a descartar el sobrenadante y las células se pusieron en suspensión utilizando 100  $\mu\text{l}$  de 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  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  $\mu\text{l}$ ) 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 (ver sección II.3.1).

### **II.3.3. Medios de cultivo para levadura**

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

Para el cultivo de *S. cerevisiae* transformadas se utilizó el medio de cultivo sintético selectivo (SCDO) que contiene: 1,7 g/l YNB (*Yeast Nitrogen Base*), 5 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 1,1 g/l *Drop Out mix* (*Drop Out mix*: 2,5 g adenina; 1,2 g argininaHCl; 6 g aspártico; 6 g glutámico, 1,8 g lisinaHCl; 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), 2% p/v galactosa (SCDO Gal) o 3% v/v glicerol con 3% v/v etanol (SCDO Gly/EtOH).

Ambos medios en su versión sólida contienen 1,5 % p/v agar-agar y en todos los casos los cultivos fueron mantenidos a 30 °C.

Las levaduras *cox15Δ* en medio SCDO Glu fueron incubadas ON para alcanzar la fase exponencial tardía de crecimiento ( $DO^{600nm}$  de 8 - 9) y durante más de 24 h para llegar a saturación ( $DO^{600nm}$  mayor a 10).

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 (sección II.6.1). Esto es importante en los ensayos de complementación de función, pero no es esencial si las levaduras crecen en condiciones permisivas (en glucosa para el caso de nuestras levaduras deficientes respiratorias). Aún en condiciones permisivas de crecimiento en medio suplementado con glucosa, el agregado de metionina permite igual la expresión del gen que se encuentra bajo el promotor *MET25* (Mumberg *et al.*, 1994).

#### **II.3.4. 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 (sección II.3.3). 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 2500 x g durante 5 minutos 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 minutos 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 minutos. 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 las sometió a un choque térmico durante 15 minutos a 42 °C seguida de la transferencia de las células a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron y se pusieron en suspensión utilizando 200 µl de YPD. Por último, las células se sembraron en el medio selectivo correspondiente y se incubaron a 30 °C por 2 - 3 días. Para el caso de levaduras transformadas con el vector pRS426M25 se utilizó SCDO Glu sin el aminoácido correspondiente para la selección por auxotrofia (ver sección II.3.3).

### **II.3.5. Cultivo de *Trypanosoma cruzi***

Para realizar las infecciones con *T. cruzi* se utilizaron células Vero que eran mantenidas de rutina en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, de Gibco) suplementado con 0,15% p/v NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 10% v/v de suero fetal bovino inactivado por calor (DMEM 10% SFB) a 37 °C en atmosfera húmeda conteniendo 5% CO<sub>2</sub>. Durante infecciones con *T. cruzi*, las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 0,15% p/v NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina 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>. 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. 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 200 a 400 x 10<sup>3</sup> células por botella de cultivo.

Los epimastigotes de *T. cruzi* (Dm28c o CL Brener) 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 20 µM hemina (Camargo, 1964) 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. 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 20  $\mu$ M hemina a 28 °C. Amastigotes y tripomastigotes derivados de células se obtuvieron después de infectar una monocapa de células Vero con tripomastigotes (metacíclicos o derivados de células). Después de dos rondas de infección, los tripomastigotes derivados de células fueron usados para ensayos de infección a una MOI de 10 a 40 (*Multiplicity of infection*, número de tripomastigotes por célula Vero): a las 48 - 72 h post-infección se observan células con amastigotes intracelulares y a los 5 días se obtienen tripomastigotes en el medio extracelular. La pureza de todos los estadios se evaluó por microscopía óptica. Para los mantenimientos de rutina de amastigotes y tripomastigotes derivados de células se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie con un volumen de 5 ml de DMEM 2% SFB y se sembraron unas 200 a 600 x 10<sup>3</sup> células Vero por botella de cultivo con 1 ml de cultivo de tripomastigotes provenientes de una infección anterior.

Para el mantenimiento de epimastigotes transfectantes, se suplementó el medio con 200  $\mu$ g/ml higromicina B (Hyg) o 250  $\mu$ g/ml de geneticina (G418). Las células Vero no son resistentes a estos antibióticos, por lo que los parásitos transfectantes en los estadios de amastigotes y tripomastigotes se mantuvieron sin el agregado del antibiótico de selección. Solo en el caso de los tripomastigotes obtenidos de células para los ensayos de infección, estos fueron colectados de infecciones mantenidas con 50  $\mu$ g/ml higromicina B (Hyg). Periódicamente se rediferenciaron tripomastigotes a epimastigotes colocando a estos en medio LIT 10% SFB y 20  $\mu$ M hemina a 28 °C, y se comprobó que estos mantenían la capacidad de expresar el gen introducido en el vector pTcINDEX (sección II.6.1) ante el agregado del inductor tetraciclina, se verificó también que se mantuviera el efecto en el crecimiento siguiendo el número de parásitos a lo largo de varios días y la sobreexpresión de la proteína mediante las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta o Western blot (secciones II.8.2, II.9.3 y II.7.6.2).

La solución *stock* de hemina (sal de cloruro de hierro(III)protopofirina IX, forma comercial) se preparó a partir de droga sólida (Frontier Scientific) disolviendo la misma en una mezcla 50% v/v etanol con 0,01 NaOH a una concentración final de 1 mM. Se esterilizó por filtración en filtros de membrana con tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m, se fraccionó y almacenó a -80 °C hasta su utilización.

### **II.3.6. Recuento de parásitos**

Para el recuento de parásitos, se tomaron 20 µl de cada cultivo de epimastigotes y se adicionaron a 180 µl de 3,7% p/v formaldehído en PBS. Se colocaron 10 µl de la mezcla en cámaras de Neubauer (Boeco) de 1/10 mm de espesor y se contó el número de parásitos. Se calculó la cantidad de parásitos por ml de cultivo considerando la dilución realizada, la cantidad de cuadrantes contados y el espesor de la cámara utilizada.

### **II.3.7. 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 20 µM hemina y 250 µg/ml G418 a 28 °C a una densidad de cultivo de aproximadamente  $3 \times 10^7$  células/ml (sección II.3.5). 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 buffer de electroporación (PBS junto a 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>) y luego las células se transfirieron a una cubeta de 0,2 cm de paso. El buffer de transfección fue preparado con 150 - 300 µl de las purificaciones de ADN plasmídico (15 - 30 µg total de plásmido derivado de pTcINDEX) utilizando el kit comercial *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), 40 µl de PBS 10X, 4 µl de 50 mM MgCl<sub>2</sub> y 4 µl de 10 mM CaCl<sub>2</sub> y completado con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> hasta un volumen de 400 µl. Una muestra de epimastigotes se resuspendió con buffer 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 µF usando un electroporador GenePulser II (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.). Luego, las células se transfirieron a una botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie con 3 ml de LIT 10% SFB suplementado con 20 µM y 250 µg/ml G418 hemina, y se incubaron a 28 °C. A las 48 h, se agregó higromicina B (Hyg) a una concentración inicial de 50 µg/ml. Luego de 72 - 96 h, los cultivos se mantuvieron por diluciones periódicas y se llevó gradualmente a una concentración final de 200 µg/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 24 - 36 h) y el control negativo dejó de crecer.

## **II.4. Estudios de transporte de hemo**

### **II.4.1. Crecimiento de epimastigotes a distintas concentraciones de hemo**

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 ( $1,9 \text{ cm}^2$  de superficie por pocillo). Se ensayaron distintas concentraciones de hemina: 0, 2, 5, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Como la solución *stock* de hemina se prepara en 50% v/v etanol y 0,01 NaOH, como control se tuvo en cuenta el volumen total de etanol y NaOH agregados. Entonces en todos los casos se agregó el volumen de hemina correspondiente desde el *stock* (1 mM) y se completó con solución de 50% v/v etanol y 0,01 NaOH hasta un volumen total de 75  $\mu\text{l}$  (volumen de la solución 1 mM hemina necesaria para completar el medio suplementado con 50  $\mu\text{M}$  hemina). Para la preparación del medio suplementado con 100  $\mu\text{M}$  hemina se agregó 75  $\mu\text{l}$  de una solución *stock* de concentración 2 mM. Previo a los ensayos, los parásitos fueron mantenidos durante al menos los 10 días en medio LIT 10% SFB con 20  $\mu\text{M}$  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.

El crecimiento de los parásitos se monitoreó tomando muestras periódicamente y contando la cantidad de parásitos en cámaras de Neubauer (sección II.3.6) hasta que el cultivo llegó a fase estacionaria. En algunos ensayos (que será indicado) los cultivos se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento, por medio de diluciones periódicas 1/2 manteniendo el volumen constante.

### **II.4.2. Análogos de hemo**

Las soluciones *stock* de los análogos de hemo (AHs) -protoporfirina IX (PP), 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  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso. Para su utilización en los ensayos, previamente se diluyeron en 0,01 M NaOH alcanzando una concentración final de 1 mM.

La PP fue gentilmente cedida por el Dr. Eric Hegg (Universidad de Utah, EE.UU.). El GaPP fue donado por el Dr. Iqbal Hamza (Universidad de Maryland, EE.UU.). El ZnPP, ZnMP y SnMP fueron adquiridos en Frontier Scientific (Logan, UT, EE.UU.).

### **II.4.3. Crecimiento de epimastigotes en medio LIT suplementado con análogos de hemo**

Para ensayar el efecto de los AHs sobre el crecimiento de los epimastigotes, se realizó el siguiente protocolo. Se utilizaron epimastigotes de las cepas CL Brener y Dm28c que fueron mantenidos en medio estándar (LIT 10% SFB 20  $\mu$ M hemina). Las células se colectaron por centrifugación a 2000 x g por 5 min, se lavaron dos veces con PBS y se suspendieron a razón de  $5 \times 10^6$  células/ml en 1,5 ml de LIT 10% SFB suplementado con 5  $\mu$ M hemina, 20  $\mu$ M hemina o 5  $\mu$ M hemina más 15  $\mu$ M de cada uno de los AHs (ZnMP, ZnPP, SnMP, GaPP o PP), en microplacas de 24 pocillos (1,9 cm<sup>2</sup> de superficie por pocillo). Las células se mantuvieron hasta 2 semanas en fase exponencial de crecimiento por diluciones periódicas cada 2 días. El crecimiento de los parásitos se monitoreó por recuento de parásitos en cámaras de Neubauer a partir de muestras colectadas periódicamente (sección II.3.6). En el caso de los ensayos realizados en medio suplementado con PP, no se realizaron diluciones periódicas.

Posteriormente, para completar el estudio del efecto de SnMP sobre el crecimiento de epimastigotes se hicieron las siguientes modificaciones al ensayo. Los cultivos de epimastigotes se mantuvieron al menos los 10 días previos al ensayo en medio LIT 10% SFB sin agregado de hemina (condición de hambreado de hemo), y luego en el medio suplementado con SnMP se monitoreó el número de parásitos hasta que llegaron a fase exponencial de crecimiento sin realizar las diluciones periódicas del cultivo.

### **II.4.4. Ensayos de transporte de análogos de hemo en epimastigotes**

Epimastigotes de las cepas CL Brener y Dm28c fueron mantenidos en LIT 10% SFB suplementado con 20  $\mu$ M hemina. Las células se colectaron por centrifugación a 2000 x g por 5 min, se lavaron dos veces con PBS y se suspendieron a  $20 \times 10^6$  células cada 100  $\mu$ l de PBS. Luego, se agregó igual volumen de los diferentes análogos a una concentración inicial de 200  $\mu$ M en PBS (quedando a una concentración de 100  $\mu$ M en el volumen final de 200  $\mu$ l). Las suspensiones de epimastigotes se incubaron de 0 a 5 minutos a 28 °C y luego la incorporación de los AHs se detuvo con el agregado de 800  $\mu$ 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 AH y la solución de hemina concentrada fría. Luego las muestras se mantuvieron en baño de agua-hielo durante todo el proceso de lavado y lisis. Las células se lavaron 3 veces mediante centrifugación a 4 °C a 10000 x g y su posterior suspensión en 800

µl de PBS frío. Finalmente, las muestras se suspendieron en 500 µl de PBS frío y luego fueron procesadas para medir la incorporación de hemo por mediciones directas de fluorescencia (sección II.4.5) y por microscopía de fluorescencia (sección II.9.1).

Como control de viabilidad del tratamiento con los AHs, luego de incubar los epimastigotes por de 5 min con los análogos, se lavaron 3 veces con PBS y fueron suspendidos en 1,5 ml of LIT 10% SFB suplementado con 20 µM hemina. El crecimiento de los parásitos se siguió tomando muestras periódicamente y contando la cantidad de parásitos con cámaras de Neubauer (sección II.3.6).

#### **II.4.5. Detección de la incorporación de los análogos de hemo en epimastigotes**

Los epimastigotes de *T. cruzi* ( $20 \times 10^6$  células) se suspendieron con 500 µl de buffer de lisis (0,5% v/v Tritón X-100 en PBS) y las células fueron disgregadas por ciclos de congelado y descongelado. La suspensión de células disgregadas se centrifugó a 10000 x g por 5 min y el sobrenadante fue utilizado para medir la intensidad de fluorescencia (IF). Las lecturas de IF se realizaron en un espectrofluorómetro Varian Eclipse, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico en un volumen de 2 ml de PBS al cual se agregaron alícuotas de los sobrenadantes obtenidos. Para cada muestra se registraron al menos 2 lecturas que correspondieron a 2 agregados, lo que permitió verificar que las medidas obtenidas estuvieran dentro de la zona lineal de la relación IF vs concentración. En todos los casos se registraron los espectros de emisión entre 450 y 700 nm, excitando las muestras a 405 nm. La presencia de cada análogo se determinó mediante las medidas de IF a los máximos de emisión de cada uno (583 nm para el GaPP, 578 nm para el ZnMP, 588 nm para el ZnPP y 574 nm para el SnMP) y luego normalizadas en función del número de parásitos por unidad de volumen.

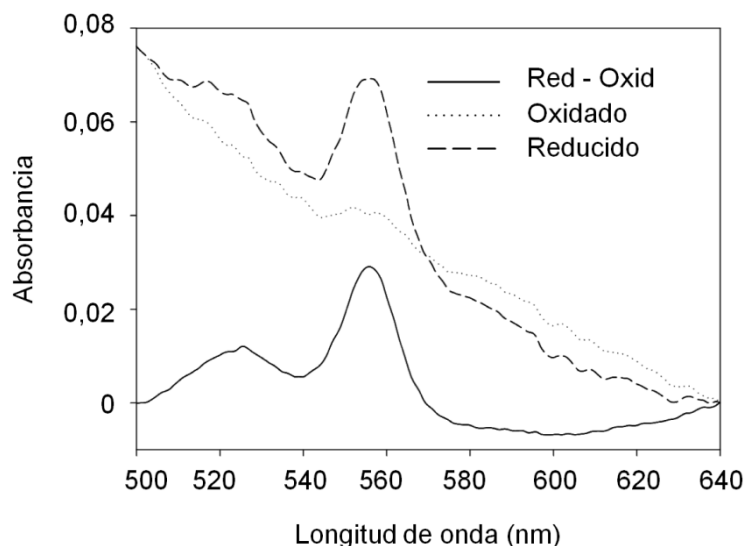
#### **II.5. Determinaciones de hemos (B y A) en epimastigotes**

##### **II.5.1. 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  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). La concentración de hemo B se calcula a partir del valor de absorbancia a 557 nm del espectro diferencial ( $\epsilon=23,98 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y el hemo A a 588nm ( $\epsilon=25,02 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

En nuestro caso, esta técnica se utilizó para cuantificar el contenido de hemo B total en epimastigotes. Prácticamente,  $50 - 250 \times 10^6$  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. Luego, se resuspendieron en  $500 \mu\text{L}$  de PBS y se combinaron con  $500 \mu\text{L}$  de una solución que contiene  $0,2 \text{ M NaOH}$  y  $40\% \text{ v/v}$  piridina. La mezcla se agitó vigorosamente mediante *vortex*, se centrifugó a  $16000 \times g$  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. Se calculó el espectro diferencial (reducido - oxidado) y de este se identificó el máximo de absorción a 557 nm que se corresponde con la absorbancia del complejo hemocromo B. En la figura 16 se muestra un ejemplo de los espectros registrados y el espectro diferencial de una muestra de epimastigotes. La concentración de hemo total se cuantificó usando el coeficiente de extinción molar del complejo hemocromo B ( $23,98 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 16. Espectros del método de la piridina básica.** Espectro oxidado, reducido y espectro diferencial (reducido – oxidado) registrados por el método de la piridina básica utilizando  $250 \times 10^6$  células de epimastigotes Dm28c crecidos en medio LIT 10% SFB con  $20 \mu\text{M}$  hemina. La banda de absorción a 557 nm es del complejo hemo B-piridina (coeficiente de absorción de  $23,98 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El complejo hemo C-piridina presente en la muestra contribuye a la misma banda de absorción ya que posee un  $\lambda$  y un coeficiente de absorción similar ( $23,97 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 550 nm).

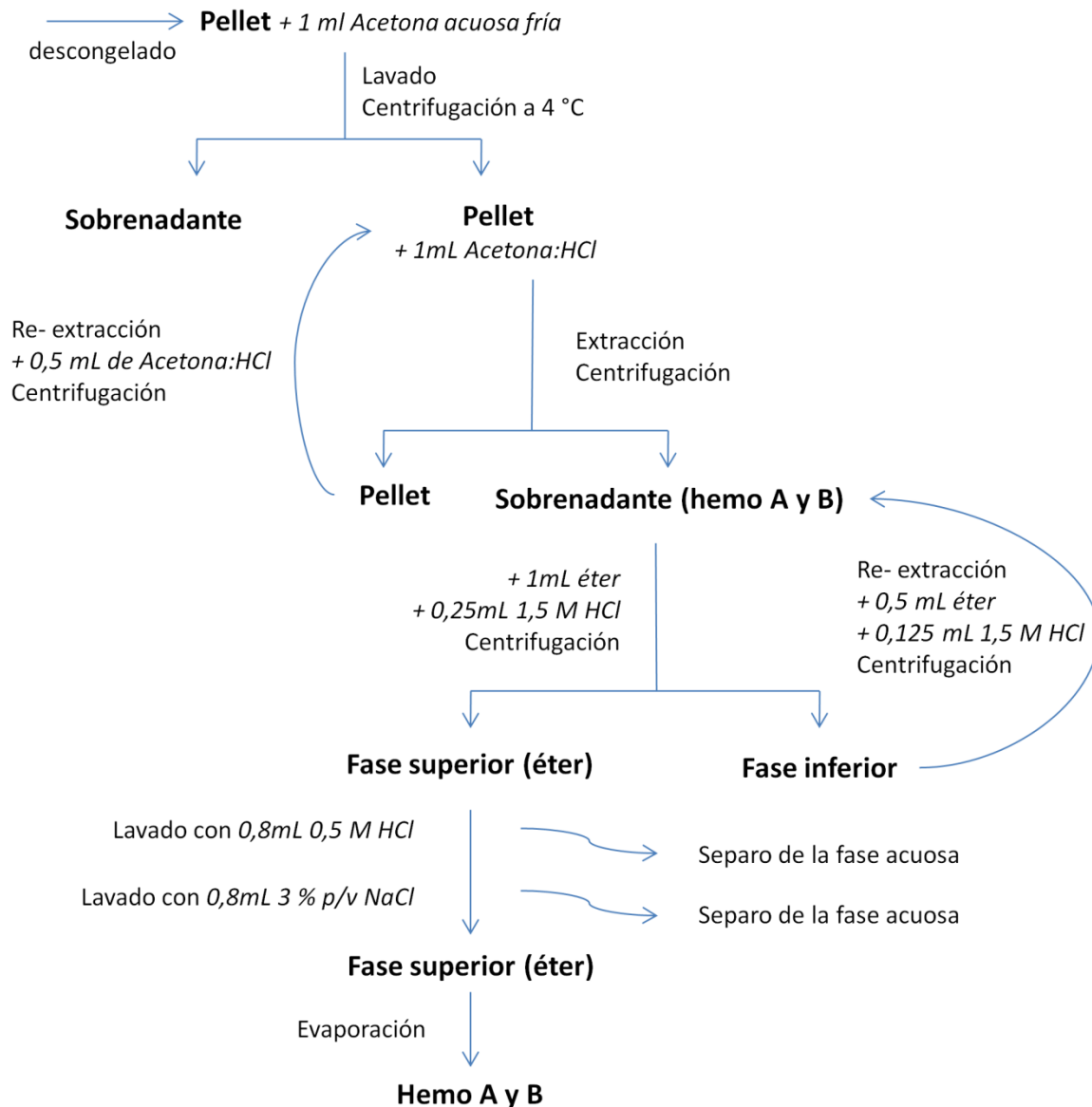
El límite de detección del método corresponde a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  hemo, esta concentración corresponde a 0,4 a 2 nmoles hemo/ $10^9$  parásitos cuando se usan de 50 a  $250 \times 10^6$  parásitos procesados en un volumen de 1 ml.

### **II.5.2. Extracción de hemos con acetona ácida**

Debido a la baja concentración de hemo A en células (en relación al hemo B), optimizamos la técnica de extracción de hemos en acetona ácida, que es más laboriosa pero permite un mejor rendimiento y pureza en la extracción de hemos en general y nos permitió detectar el hemo A. Esta técnica se utilizó para realizar las extracciones a partir de epimastigotes que fueron transfectados con el plásmido pTcINDEX conteniendo distintas versiones del gen *TcCOX15.HIS* (salvaje y mutantes). Básicamente, para cada determinación se colectaron 2 -  $4 \times 10^9$  epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento luego de 3 - 4 días de inducción con tetraciclina. Luego se lavaron 2 veces con PBS y se congeló el pellet celular hasta realizar la purificación del hemo total por método de extracción con acetona ácida que se esquematiza en la figura 17 (Prescott, 1975; Rawlinson y Hale, 1949).

Para ello, una vez descongelado el pellet se agregó 1 ml de acetona acuosa fría (80% v/v acetona, 20% v/v agua), se mezcló y centrifugó a  $16000 \times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se descartó y el pellet se mezcló con 1 ml de acetona:HCl (4 volúmenes de acetona y 1,5 volúmenes de 1,5 M HCl). Se volvió a centrifugar a  $16000 \times g$  por 5 min y se separó el pellet del sobrenadante. El sobrenadante está enriquecido con la fracción de hemos solubles (hemo B y A) y en el pellet queda la fracción de hemo unido a proteínas (hemo C). El pellet se volvió a mezclar con 0,5 ml de acetona:HCl para extraer la fracción de hemo soluble remanente. Luego de centrifugar, se juntaron ambos sobrenadantes y se agregó 1 ml de éter y 0,25 ml de 1,5 M HCl para extraer la fracción hemínica de la mezcla acetona:HCl. La solución se agitó vigorosamente mediante *vortex* y luego se centrifugó a  $16000 \times g$  por 5 min. Se retiró y guardó la fase superior – fase etérea - y la fase inferior se mezcló nuevamente con 0,5 ml de éter y 0,125 ml 1,5 M HCl para realizar una nueva extracción del hemo remanente. Ambas fracciones etéreas se juntaron, curiosamente esta fase presenta un color rojizo por los componentes que fueron extraídos por la acetona. Luego se procedió a lavar la fase etérea: se agregó 0,8 ml de 0,5 M HCl, se mezcló vigorosamente mediante *vortex*, se centrifugó a  $16000 \times g$  por 5 min y se retiró la fase etérea (fase superior) que contiene la fracción hemínica. Se repitió el lavado con 0,8 ml de 3% p/v

NaCl. Si bien en todas las etapas es importante no perder parte de las fases que contienen hemo, y por ello pueden quedar restos de fase acuosa, en el último paso es crucial eliminar por completo la fase acuosa. Entonces, para optimizar el proceso de extracción se agregó 0,5 ml de éter a la fase acuosa remanente, se mezcló, se retiró la fase etérea y se juntó con la anterior. Luego, se dejó evaporar el éter, quedando el contenido hemínico extraído precipitado en el tubo.

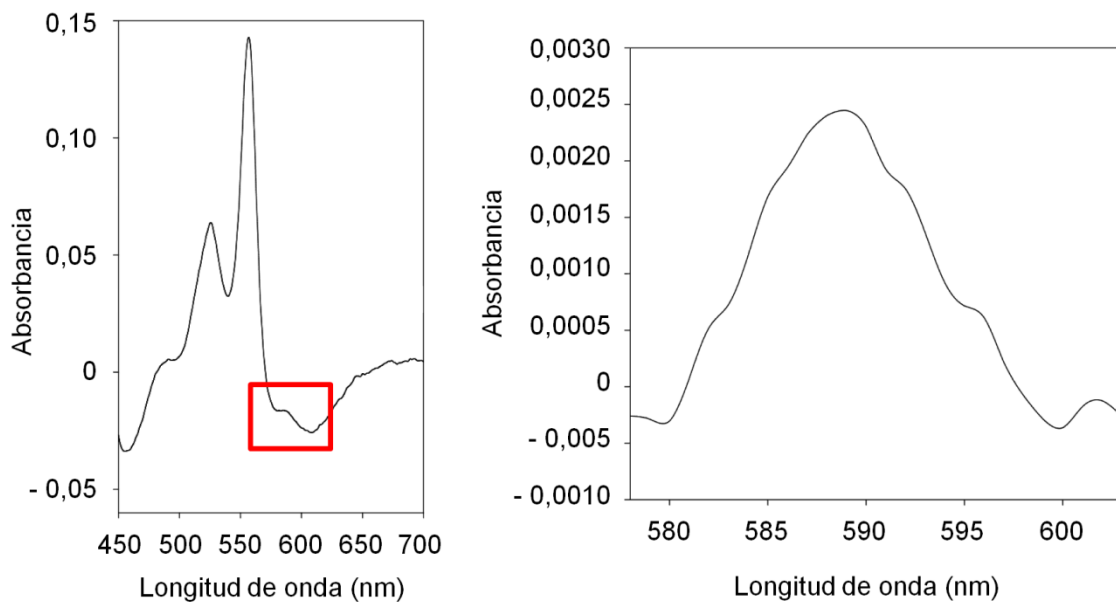


**Figura 17. Extracción de hemo con acetona ácida.** Esquema de extracción de hemo total desde un pellet de células hasta la obtención del precipitado de hemo. Acetona acuosa fría: 80% v/v acetona y 20% v/v agua. Acetona:HCl: 4 volúmenes de acetona y 1,5 volúmenes de 1,5 M HCl.

### II.5.3. Cuantificación de hemo A

El contenido de hemo A y B fue cuantificado por el método de piridina básica (Berry y Trumpower, 1987). Como la cantidad de hemo A es muy baja en el parásito, las extracciones

de hemos se realizaron como se indica en el apartado anterior (II.5.2.). Una vez obtenido el precipitado del contenido hemínico, estos se resuspendieron con una mezcla de 500  $\mu\text{L}$  de PBS y 500  $\mu\text{L}$  de solución de 0,2 M NaOH y 40% v/v piridina y se registraron los espectros como se indica en la sección II.5.1. En la figura 18 se muestra un ejemplo del espectro diferencial de una muestra de hemo purificado de epimastigotes medido por este método. La concentración de hemo B se cuantificó usando el coeficiente de extinción molar de 23,98  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  a 557 nm y el hemo A con un coeficiente de 25,02  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  a 588 nm.



**Figura 18. Espectro diferencial para la cuantificación de hemo A.** Espectro diferencial obtenido por el método de piridina básica (espectro reducido menos oxidado) de hemo extraído con acetona:HCl de epimastigotes. La banda a 557 nm corresponde al complejo hemo B-piridina y la banda a 588 nm que se muestra en el recuadro y se muestra ampliada corresponde al complejo hemo A-piridina. El hemo O forma un complejo con la piridina que absorbe a 553 nm, quedando superpuesto por la banda de absorción del complejo hemo B-piridina.

#### **II.5.4. Ensayo de degradación de hemo *in vitro***

Epimastigotes mantenidos en LIT 10% SFB suplementado con 20  $\mu\text{M}$  hemina se colectaron por centrifugación ( $1 \times 10^8$  células), se lavaron con 0,32 M sacarosa fría y luego se suspendieron en buffer K frío (90 mM fosfato pH 7,4 con 0,1% v/v Tritón X-100). Luego, se centrifugaron a 600 x g por 10 min y el sobrenadante fue utilizado para el ensayo de degradación de hemo siguiendo el protocolo descrito por Srivastava y colaboradores para determinar la actividad hemooxigenasa en *Leishmania donovani* (Srivastava *et al.*, 1997). El medio de reacción fue complementado con 1,4 mM NADP<sup>+</sup>, 4 mM glucosa6P, 6,6 mM MgCl<sub>2</sub>

y finalmente 18  $\mu$ M hemo. La reacción se siguió espectrofotométricamente registrando los espectros de absorbancia entre 300 y 750 nm a temperatura ambiente, 30 °C o 37 °C.

### **II.5.5. Ensayo de degradación de hemo *in vivo***

Epimastigotes mantenidos en LIT 10% SFB sin hemo durante 10 días fueron colectados por centrifugación a 2000 x g, lavados con PBS y suspendidos a una razón de  $1 \times 10^7$  células/ml en 10 ml de PBS con 10  $\mu$ M hemo y 20 mM glucosa. Se mantuvieron los epimastigotes a 28 °C durante 10 días. Se tomaron muestras periódicamente del medio con células y se midió el contenido de hemo total por el método de la piridina básica descrito en la sección II.5.1. Se usaron como control el mismo preparado pero sin el agregado de epimastigotes y otro sin el agregado de glucosa.

## **II.6. Manipulación de ácidos nucleicos**

### **II.6.1. Plásmidos**

En la tabla 1 se detallan los plásmidos utilizados en este trabajo de Tesis:

Vectores	Características
pET-Term (Gonzalez <i>et al.</i> , 2012)	Este vector deriva del vector pETGEXCT (Sharrocks, 1994), y permite el clonado de las secuencias de interés como fusión C-terminal a la enzima glutatión S-transferasa (GST) de <i>S. japonicus</i> . Esto facilita la posterior purificación de la proteína recombinante al someter un extracto celular total a una cromatografía de afinidad. AmpR.
pET-Term.P1TcCOX15 y pET-Term.P2TcCOX15 (en este trabajo II.6.3.1)	Se utilizó para expresar los péptidos P1TcCox15 y P2TcCox15 como fusión a GST en <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS'. Fragmentos clonados entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III. AmpR.
pKS.TcCOX15.HIS (Buchensky <i>et al.</i> , 2010)	Secuencia del gen <i>TcCOX15</i> de la cepa Dm28c de <i>T. cruzi</i> clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I del vector pBluescriptII KS(-) (Stratagene). Secuencia con una fusión que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas. AmpR.

pKS.TcCOX15H129A.HIS,  
pKS.C.TcCOX15H206A.HIS y  
pKS.TcCOX15H307A.HIS  
(en este trabajo II.6.3.4)

Contiene los genes de *TcCOX15* de *T. cruzi* con las mutaciones H129A, H206A y H307A, clonados entre los sitios *Bam*HI y *Xho*I en el vector pBluescriptII KS(-) (Stratagene). Todos como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas. AmpR.

---

pTEX.55aaTcCOX8-GFP

Plásmido obtenido del laboratorio del Dr. Claudio A. Pereira (Instituto de Investigaciones Medicas Alfredo Lanari; IDIM-CONICET), que contiene la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) con la señal de localización mitocondrial de la proteína TcCox8 clonada como fusión N-terminal en el plásmido pTEX. Resistencia a geneticina para la selección en *T. cruzi*.

---

pYX142-*mtGFP*  
(Westermann y Neupert, 2000)

Plásmido obtenido del laboratorio del Dr. Paul A. Cobine (Universidad de Auburn, Alabama, EE.UU.), que consiste en el péptido de localización mitocondrial preSu9 como fusión N-terminal a la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*, alelo S65T). Posee gen de resistencia a ampicilina para su manipulación en *E. coli* y gen *Leu2* para su selección por auxotrofia en *S. cerevisiae*.

---

pTcGFPN  
(Batista *et al.*, 2010)

Secuencia sintética que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) sin los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción internos. Resistencia a geneticina para la selección en *T. cruzi*. ClmR y AmpR.

---

pENTR3C  
de la serie Gateway® pENTR™  
Vectors (Invitrogen)

Contiene secuencias de terminación de la transcripción *rrnB* que previenen la expresión basal del inserto de interés en *E. coli* y los sitios *attL1* y *attL2* 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 *ccdB*

localizado entre los dos sitios *attL* para la selección negativa y el gen de resistencia a kanamicina para la selección en *E. coli*. Tiene un origen de replicación pUC de alto número de copias.

pENTR3C.*TcCOX15.HIS.noStop*  
(construidos en este trabajo  
II.6.3.2)

Contiene el gen *TcCOX15* de *T. cruzi* (secuencia salvaje) pero sin codón de terminación luego de la secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas, clonado entre los sitios *BamHI* y *XhoI*. KanR.

pENTR3C.*TcCOX15.HIS.GFP*  
(construido en este trabajo  
II.6.3.3)

Contiene el gen de *TcCOX15* 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*). Fragmento clonado entre los sitios *BamHI* y *XbaI*. KanR.

pENTR3C.*TcCOX15.HIS*,  
pENTR3C.*TcCOX15H129A.HIS*,  
pENTR3C.*TcCOX1.H206A.HIS* y  
pENTR3C.*TcCOX15H307A.HIS*  
(construidos en este trabajo  
II.6.3.4)

Contiene el gen *TcCOX15* de *T. cruzi* (secuencia salvaje) y las secuencias con las mutaciones H129A, H206A y H307A, clonados entre los sitios *BamHI* y *XhoI*. Todos como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas. KanR.

---

pRS426M25  
(Buchensky *et al.*, 2010)

Plásmido derivado del vector de expresión en levaduras pRS426 (Mumberg *et al.*, 1994) y puede replicarse tanto en *S. cerevisiae*, donde la selección es por reversión de la auxotrofia para uracilo (marcador de selección *URA3*), como en *E. coli* (selección por resistencia a ampicilina). Además, posee un casete de expresión constituido por el promotor regulable del gen *MET25*, un sitio de múltiple clonado (SMC) y la secuencia terminadora del gen *CYC1* (citocromo *c1*).

pRS426M25.*COX15.HIS*  
(Buchensky *et al.*, 2010)

Contiene el gen *COX15* de *S. cerevisiae* como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas. AmpR.

pRS426M25.*TcCOX15.HIS*  
(Buchensky *et al.*, 2010)

Contiene el gen *TcCOX15* de *T. cruzi* como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas, clonado entre los sitios *Bam*HI y *Xho*I. AmpR.

pRS426M25.*TcCOX15.HIS.GFP*  
(construido en este trabajo  
II.6.3.3)

Contiene el gen de *TcCOX15* 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*). Fragmento clonado entre los sitios *Bam*HI y *Sal*I. AmpR.

pRS426M25.*TcCOX15H129A.HIS*,  
pRS426M25.*TcCOX15H206A.HIS*  
y  
pRS426M25.*TcCOX15H307A.HIS*  
(construidos en este trabajo  
II.6.3.4)

Contiene los genes de *TcCOX15* de *T. cruzi* con las mutaciones H129A, H206A y H307A, clonados entre los sitios *Bam*HI y *Xho*I. Todos como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas. AmpR.

---

pLEW13  
(Taylor y Kelly, 2006)

Posee el gen de la *ARN polimerasa T7*, el gen *tetR* que reprime la expresión del promotor del vector pTcINDEX en ausencia de tetraciclina y el gen *neo* para la selección por geneticina (G418). El vector se mantiene episomalmente.

---

pTcINDEX  
(Taylor y Kelly, 2006)

Vector integrativo en las zonas espaciadoras entre los genes ARN ribosomales del genoma de *T. cruzi*, zonas transcripcionalmente silentes. Posee el gen higromicina B fosfotransferasa (*hyg*) 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 3' un operador *TetO* que lo hace reprimible en ausencia de tetraciclina. Flanqueando el SMC posee secuencias intergénicas de actina de *T. cruzi* para proveer sitios de poliadenilación, sitio aceptor del *transsplicing* de la proteína

ribosomal P2 $\beta$  y terminador de la ARN polimerasa de T7. Para la manipulación en *E. coli* posee gen de resistencia a ampicilina.

pTcINDEX.*TcCOX15.HIS.GFP*  
(construidos en este trabajo II.6.3.3)

Contiene el gen de *TcCOX15* 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*). Fragmento clonado entre el sitio *Bam*HI y el extremo romo del sitio *Nru*I del vector. HygR. AmpR.

pTcINDEX.*TcCOX15.HIS*,  
pTcINDEX.*TcCOX15H129A.HIS*,  
pTcINDEX.*TcCOX15H206A.HIS* y  
pTcINDEX.*TcCOX15H307A.HIS*  
(construidos en este trabajo II.6.3.4)

Contiene los genes de *TcCOX15* de *T. cruzi* (secuencia salvaje) y las secuencias con las mutaciones H129A, H206A y H307A, clonados entre el sitio *Bam*HI y el extremo romo del sitio *Nru*I del vector. Todos como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas. HygR. AmpR.

**Tabla 1. Plásmidos empleados**

**II.6.2. Oligonucleótidos**

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

Inserto amplificado	Oligonucleótidos	Secuencias 5´-3´
<i>P1TcCOX15</i> <sup>5</sup> (197 pb)	FP_ <i>P1TcCOX15</i> RP_ <i>P1TcCOX15</i>	CGCGGATCCCGCCTGACTGAGAGTGG <i>Bam</i> HI ATCCCAAGCTTCTACTCCCAGAAGAAAATAAAC <i>Hind</i> III
<i>P2TcCOX15</i> <sup>5</sup> (149 pb)	FP_ <i>P2TcCOX15</i> RP_ <i>P2TcCOX15</i>	CGCGGATCCATGTACAACAACGAGTTCC <i>Bam</i> HI ATCCCAAGCTTCTAGCGGTGCCATGTTTGC <i>Hind</i> III
<i>TcCox15_sec</i> (881 pb)	FP_ <i>TcCOX15</i> Sec_ <i>TcCOX15</i>	GCGGATCCATGTTGCGATTTCAGGCCGC <i>Bam</i> HI TGGCTCCACCACAAG

<sup>5</sup> Oligonucleotidos diseñados en la tesina de grado de Simón Menéndez Bravo, titulada “Estudio de proteínas mitocondriales de *Trypanosoma cruzi* involucradas en el metabolismo de hemo”. Directora: Dra. Julia A. Cricco.

<i>TcCOX15.HIS.</i> <i>noStop</i>	FP_ <i>TcCOX15</i>	GCGGATCCATGTTGCGATTGAGGCCGC <i>BamHI</i>
(1226 pb)	RP_ <i>noStop</i>	CGCCTCGAGATGATGATGATGATGATGACC <i>XhoI</i>
<i>GFP</i>	FP_ <i>GFP</i>	TACCTCGAGATGAGCAAGGGCGAGGAGCTG <i>XhoI</i>
(747 pb)	RP_ <i>GFP</i>	CCTCTAGATATCGTCGACTCAGACTTGTACAGCTCGTCC <i>Sall EcoRV XbaI</i>
<i>pTcCOX15H129A.HIS</i>	FP_ <i>TcCOX15H129A</i>	CTTCTGGGAGTGGGCCgCTCGAGTACTGGCGCGCAGTATAG <i>XhoI</i>
(1224 pb)*	RP_ <i>TcCOX15H129A</i>	CTATACTGCGCGCCAGTACTCGAgcGGCCCACTCCCAGAAG <i>XhoI</i>
<i>pTcCOX15H206A.HIS</i>	FP_ <i>TcCOX15H206A</i>	CGTACCGCCTTGcAGCtgcTTTGGTTTTGGCCTTTAC <i>PvuII</i>
(1224 pb)*	RP_ <i>TcCOX15H206A</i>	GTAAAGGCCAAAACCAAAgcaGCTGCAAGGCGGTACG <i>PvuII</i>
<i>pTcCOX15H307A.HIS</i>	FP_ <i>TcCOX15H307A</i>	CGCAAACATGGgCccGCCTGATGGCTGCATTTAGCAC <i>ApaI</i>
(1224 pb)*	RP_ <i>TcCOX15H307A</i>	GTGCTAAATGCAGCCATCAGGCGGgCCATGTTTGCG <i>ApaI</i>

**Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos.** Los codones dentro de los recuadros corresponden a codones de iniciación o terminación, en letra minúscula se indican los nucleótidos a ser modificados por la técnica de mutagénesis, subrayados los sitios de reconocimientos para endonucleasas de restricción y en negrita se indica el codón mutado.

\*tamaño del inserto clonado con los sitios *BamHI* y *XhoI*. Los oligonucleótidos descritos sintetizan el plásmido completo donde se encuentra clonada la secuencia.

### **II.6.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

#### **II.6.3.1. Amplificación de las secuencias codificantes P1TcCOX15 y P2TcCox15**

Las reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa) se realizaron utilizando como molde el plásmido pKS.*TcCOX15.HIS*. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl conteniendo aproximadamente 50 ng de ADN plasmídico, los cebadores FP\_*P1TcCOX15*, RP\_*P1TcCOX15*, FP\_*P2TcCOX15* y RP\_*P2TcCOX15* de tabla 2 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 2,5 U de *Pfx* platinum ADN Polimerasa (Invitrogen) 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: 45 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 50 °C
- 4- Elongación: 20 s a 68 °C
- 5- Elongación final: 3 min a 68 °C

Los sitios *Bam*HI y *Hind*III introducidos con los cebadores empleados se utilizaron para el posterior clonado del inserto amplificado en el vector de expresión pET-Term.

### **II.6.3.2. Amplificación de la secuencia codificante *TcCOX15.HIS.noStop***

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como molde el plásmido pENTR3C.*TcCOX15.HIS*. El mismo se genera al subclonar la secuencia *TcCOX15.HIS* clonada en el vector pBluescriptII KS(-) (Buchensky *et al.*, 2010) en el vector pENTR3C también 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\_*TcCOX15* y RP\_*noStop* de tabla 2 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) 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 había 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 traducido como un único polipéptido por la maquinaria traduccional, en este caso se agregó una secuencia codificante de la proteína GFP.

### **II.6.3.3. 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  $\mu$ l conteniendo además los cebadores FP\_GFP y RP\_GFP de tabla 2 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 1 U de Pfx platinum ADN Polimerasa (Invitrogen) con su correspondiente solución amortiguadora. Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

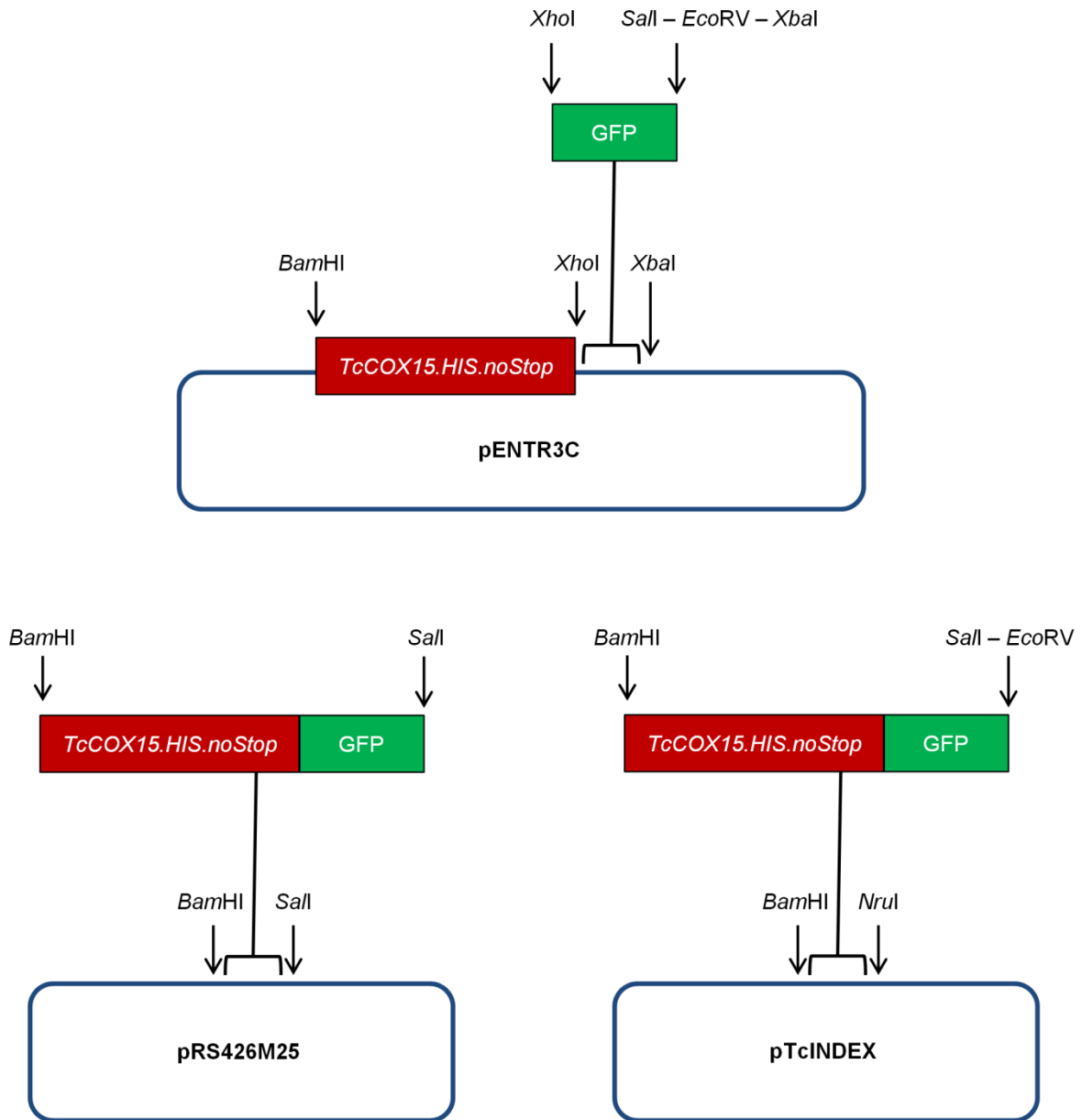
- 1- Desnaturalización inicial: 2 min a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 25 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 58 °C
- 4- Elongación: 90 s a 68 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 68 °C

Los sitios *Xho*I y *Xba*I introducidos con los cebadores se utilizaron para el posterior clonado del inserto amplificado en el vector pENTR3C.*TcCOX15.HIS.noStop*. En el extremo 3' de la secuencia *TcCOX15.HIS.noStop* se encuentra el sitio *Xho*I y luego un sitio *Xba*I, que pertenece a la secuencia del vector. Además de estos sitios, 3' de la secuencia de la GFP se agregaron los sitios *Eco*RV y *Sal*I codificados en el cebador reverso (entre el codón de terminación de la secuencia de la GFP y el sitio *Xba*I). Los sitios *Eco*RV y *Sal*I (junto al sitio *Bam*HI) permitieron el posterior clonado de la secuencia resultante (*TcCOX15.HIS.GFP*) en el vector pTcINDEX y en el vector pRS426M25, respectivamente. En el caso del pTcINDEX se clonó entre los sitios *Bam*HI y *Nru*I del vector, ya que este último al igual que el sitio *Eco*RV genera un extremo romo al ser digerido (figura 19).

### **II.6.3.4. Obtención de las secuencias mutantes de TcCOX15.HIS**

Los distintos eventos de mutagénesis sitio dirigida se llevaron a cabo a través de la elongación de cebadores mutagénicos a lo largo de toda la extensión del plásmido molde siguiendo el protocolo descrito por Odded Edelheit, pero con algunas modificaciones (Edelheit *et al.*, 2009). Los cebadores empleados son complementarios entre si y cada uno de ellos complementario a hebras opuestas del ADN molde excepto en las posiciones donde se introducirían las sustituciones. Los mismos además introdujeron mediante mutaciones silenciosas un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción. Esto permitió corroborar la mutagénesis mediante la digestión con dicha enzima. La ADN polimerasa

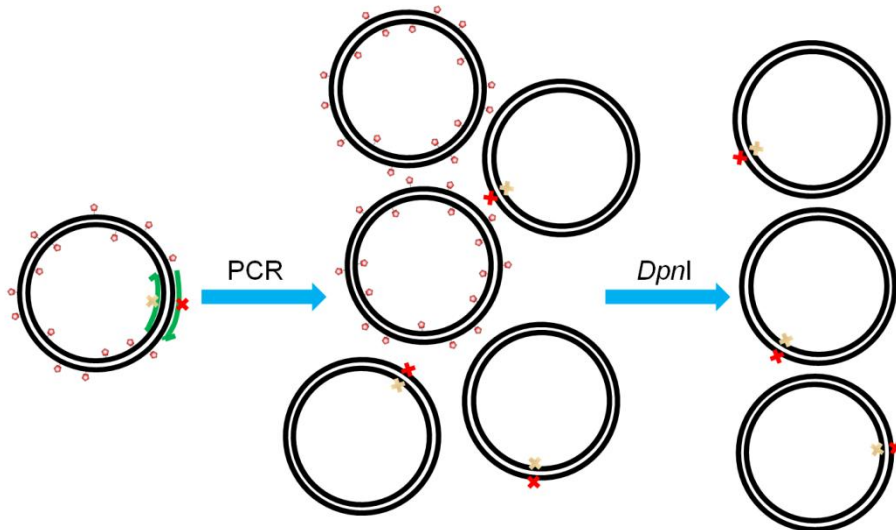
utilizada no posee actividad exonucleasa 5' → 3' por lo que no fue capaz de desplazar los cebadores en el proceso de síntesis.



**Figura 19. Estrategia de clonado de la secuencia *TcCOX15.HIS.GFP*.** La secuencia de la *GFP* fue clonada 3' de la secuencia de *TcCOX15.HIS.noStop* clonada en el vector de clonado pENTR3C. Posteriormente la fusión fue clonada en los vectores de expresión de levaduras pRS426M25 y de expresión en *T. cruzi* pTcINDEX entre los sitios indicados en la figura.

La estrategia para eliminar el ADN molde consistió en aislar plásmido de una cepa de *E. coli* con genotipo *dam*<sup>+</sup> (*DNA adenine methyltransferase*). De esta forma las hebras de ADN molde tenían metiladas las adeninas en la secuencia GATC. Dicha secuencia, en estado metilado o hemimetilado, fue reconocida y escindida por la endonucleasa de restricción *DpnI* (figura 20). Al introducir un paso de digestión con *DpnI* posterior a la etapa de síntesis,

se eliminó el ADN parental, obteniéndose una baja tasa de colonias transformadas con el plásmido molde original. Se usó gran cantidad de molde y pocos ciclos para evitar expansión clonal de otras mutaciones, aún así se obtuvo una cantidad alta de ADN.



**Figura 20. Estrategia de mutagénesis sitio dirigida.** Inicialmente todos los plásmidos parentales están metilados. Luego de la PCR, se introducen las mutaciones con los cebadores en las secuencias del gen *TcCOX15.HIS*; los plásmidos sintetizados por la ADN polimerasa no se encuentran metilados. Estos últimos no son susceptibles a la acción de la enzima *DpnI*, como si lo son los plásmidos parentales.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como molde el plásmido pKS.*TcCOX15.HIS* aislado de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 100  $\mu$ l conteniendo aproximadamente 400 ng de ADN plasmídico, los cebadores FP\_*TcCOX15H129A*, RP\_*TcCOX15H129A*, FP\_*TcCOX15H206A*, RP\_*TcCOX15H206A*, FP\_*TcCOX15H307A* y RP\_*TcCOX15H307A* de tabla 2 en concentraciones 0,2  $\mu$ M cada uno; 0,3 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 mM de MgSO $_4$  y 2,5 U de *Pfx* platinum ADN Polimerasa (Invitrogen) con su correspondiente solución amortiguadora. En cada caso se realizaron los correspondientes controles negativos sin el agregado de ADN molde. Se siguió el siguiente programa realizando 18 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 30 s a 95 °C
- 2- Desnaturalización: 30 s a 95 °C
- 3- Anillado: 1 min a 55 °C
- 4- Elongación: 5 min a 68 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 68 °C

Posteriormente, se agregaron 20 U de la enzima *DpnI* (Fermentas) directamente a los productos de la reacción de síntesis y se incubó durante 2 h a 37 °C. Se reservaron 5 µl antes y después del tratamiento con *DpnI* para verificar la digestión del ADN molde mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (sección II.6.4). Los 90 µL restantes de la reacción se completaron con 10 µL de 1 M CaCl<sub>2</sub> y se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH5α por el método químico (sección II.3.2). Luego, se obtuvo ADN plasmídico a partir de colonias transformantes aisladas (sección II.6.8) y se verificó la presencia de la mutagénesis mediante digestión con enzimas de restricción. En los casos en que se obtuvieron resultados consistentes con la introducción de la mutación buscada se procedió a resolver la secuencia del nuevo gen generado.

Las secuencias generadas ya se encontraban clonadas entre los sitios *Bam*HI y *Xho*I, estos mismos sitios se utilizaron para el subclonado en los vectores pENTR3C y pRS426M25. Los sitios *Bam*HI y el sitio *Eco*RV, que se encuentra en el sitio de múltiple clonado del vector pENTR3C, permitieron el posterior clonado de las secuencias *TcCOX15.HIS* salvajes y mutantes en el vector pTcINDEX. Para esto se utilizaron los sitios *Bam*HI y *Nru*I del vector, ya que este último al igual que el sitio *Eco*RV genera un extremo romo al ser digerido.

#### **II.6.3.5. 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 tubos eppendorf individuales conteniendo 150 µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> 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 µl de estas se usaron como molde en una reacción de PCR. Los cebadores fueron utilizados en una concentración 0,5 µM cada uno. Además se utilizó: 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2,5 U de *Taq* ADN Polimerasa (Invitrogen) con su correspondiente solución amortiguadora, en un volumen final de reacción de 25 µl. 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.

En el caso de verificar la presencia del inserto *TcCOX15* en alguna de sus versiones, se utilizaron los cebadores *FP\_TcCOX15* y *Sec\_TcCOX15* (tabla 2). Este último hibrida con una secuencia interna del inserto. Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 3 min a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 45 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 50 °C
- 4- Elongación: 1 min a 72 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 72 °C

#### **II.6.4. 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<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) diluido 1/10000 para la posterior visualización de las bandas en el transiluminador de luz azul Safe Imager (Invitrogen). El marcador de masa molecular empleado fue ADN de fago  $\lambda$  digerido con *HindIII* (Productos Bio-Lógicos). Las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por azul de 0,25% p/v 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 80 V.

#### **II.6.5. 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 and PCR clean-up system* (Promega) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante.

#### **II.6.6. 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. En general, las digestiones se llevaron a cabo durante 2 horas a 37 °C siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

### **II.6.7. 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 µl, 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).

### **II.6.8. Purificación de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli***

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

Alternativamente se utilizó la técnica de extracción de plásmidos por lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Para esto se tomaron 3 ml de cultivo de *E. coli* transformante crecido ON a 37 °C en agitación en medio LB suplementado con antibiótico apropiado (ver sección II.3.1) y se centrifugó 5 min a 2500 x g. El pellet celular se puso en suspensión en 200 µl de solución I (25 mM Tris:HCl pH 8 y 10 mM EDTA). Luego se adicionó 300 µl de solución II (0,2 M NaOH y 1% p/v SDS), se mezcló suavemente por inversión 5 veces y se dejó a temperatura ambiente 5 min. Se agregaron 300 µl de solución III fría (3 M acetato de potasio pH 4,8), se mezcló por inversión 5 veces suavemente y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 16000 x g durante 15 min a 4 °C y se tomó el sobrenadante. Se recuperaron aproximadamente 700 µl de sobrenadante, los cuales se transfirieron a un tubo conteniendo 400 µl de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó vigorosamente y se centrifugó 10 min a 16000 x g. Se transfirió la fase acuosa que contiene los ácidos nucleicos a un tubo nuevo donde se le agregó 1 ml de etanol absoluto frío (preservado a -20 °C). Se mezcló por inversión y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se centrifugó 15 min a 16000 x g y 4 °C. El pellet se lavó con 500 µl de 70% v/v etanol frío y se centrifugó 1 min. Luego de descartar el sobrenadante, el precipitado

conteniendo ADN plasmídico y ARN se dejó secar completamente incubando a 37 °C para eliminar los restos de etanol. Por último se solubilizó el precipitado en un volumen de 20 µl de solución TE (10 mM Tris:HCl pH 8 y 1 mM EDTA) y se guardó a -20 °C hasta su uso.

### **II.6.9. Secuenciación de fragmentos de ADN**

La resolución de las secuencias de ADN fueron realizadas 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 a concentración 5 µM. Se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos detallados en la tabla 3 que hibridan sobre regiones que flanquean a los insertos según el plásmido utilizado.

<b>Vectores</b>	<b>Oligonucleótidos</b>
pET-Term	FP_pET-Term: CCACAAATTGATAAGTACTTGAAATC
pBluescriptII KS(-)	M13 Universal Primer (-20): GTAAAACGACGGCCAGT M13 Reverse Primer (-24): GGAAACAGCTATGACCATG
pENTR3C	ext-attL1: TAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGC ext-attL2: CAGAGCTGCAGCTGGATGGC
pTcINDEX	FP_HX1: CTTTCCAACCTCTTTTATGATG RP_Ig.Act: CAAGGACAGAAAACGGTAAG

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para secuenciación.**

### **II.6.10. 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.

## **II.7. Manipulación de Proteínas**

### **II.7.1. Purificación de GST-P1/P2TcCox15 y obtención de anticuerpos policlonales anti-TcCox15**

#### **II.7.1.1. Ensayos de inducción de la expresión de P1/P2TcCOX15**

Con el objetivo de evaluar la expresión de las proteínas recombinantes GST-P1TcCox15 y GST-P2TcCox15 en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS', se llevó a cabo el protocolo que se detalla a continuación. Se creció un cultivo de *E. coli* BL21(DE3)pLysS' transformado con los plásmidos pET-Term.P1TcCOX15 y pET-Term.P2TcCOX15 (sección II.6.1 y II.3.2) en medio líquido LB (ver sección II.3.1) con 100 µg/ml ampicilina y 35 µg/ml cloranfenicol durante toda la noche a 37 °C con agitación constante. Luego se realizó una dilución 1/50 en 10 ml de medio líquido fresco de igual composición que el anterior y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una  $DO^{600} \sim 0,8$  (aproximadamente 2 horas). Una vez que se alcanzó dicha  $DO^{600}$  se agregó IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido; stock 1 M) al cultivo, el cual funciona como inductor de la expresión de proteína recombinante a una concentración de 0,05 mM o 0,5 mM. Una vez agregado el IPTG, la expresión de la proteína recombinante se evaluó incubando los cultivos bajo 2 condiciones distintas: 3 horas a 37 °C y ON a 16 °C (siempre con agitación constante). Una vez cumplido el período de inducción, se colectaron las células centrifugando 10 min a 3000 x g en frío. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en solución de lisis (50 mM Tris:HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µg/ml DNasa) en un volumen final de 1/10 del volumen inicial del cultivo. Esa suspensión de células se congeló a -20 °C para facilitar la ruptura celular y una vez descongelada se completó la ruptura aplicando 4 pulsos de sonicación de 10 s con 20% de potencia, con intervalos de 1 min en hielo entre cada pulso (Sonicador SONIFIER 250, Branson). Luego se centrifugó a 10000 x g durante 20 min en frío y se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo. El pellet se resuspendió en solución de lisis en un volumen igual a 1/10 del volumen inicial del cultivo. Se tomaron alícuotas de igual volumen del sobrenadante y del pellet resuspendido (fracción soluble y fracción insoluble del extracto celular total, respectivamente) y se resolvieron por SDS-PAGE al 12% p/v de acrilamida para analizar la presencia de la proteína sobreexpresada y determinar las condiciones óptimas de inducción.

**II.7.1.2. Purificación de GST-P1TcCox15 por medio de cromatografía de afinidad empleando resina de glutatión agarosa**

Para la purificación de las proteínas de fusión GST-P1TcCox15 se realizó una cromatografía de afinidad empleando una resina de glutatión-agarosa. Se pesaron 280 mg de resina glutatión-agarosa Sigma<sup>®</sup> que se hidrató con 56 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> incubándose toda la noche a 4 °C. Una vez hidratada, la resina se equilibró realizando 4 lavados de 20 min con 15 ml de buffer 50 mM Tris:HCl pH 8 y 150 mM NaCl y se resuspendió con el mismo buffer en un volumen final de 5 ml.

Se creció un cultivo de *E. coli* BL21(DE3)pLysS' transformado con el plásmido pET-Term.P1TcCOX15 (sección II.6.1 y II.3.2) en medio líquido LB (sección II.3.1) con 100 µg/ml ampicilina y 35 µg/ml cloranfenicol durante toda la noche a 37 °C con agitación constante. Luego se realizó una dilución 1/50 en 500 ml contenidos en erlenmeyer de 2 l a partir de un cultivo saturado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS' transformado con el plásmido pET-Term.P1TcCOX15 y se indujo 24 h a 16 °C con 0,05 mM de IPTG. El cultivo se colectó mediante centrifugación a 3000 x g y se resuspendió en 20 ml de buffer de lisis (50 mM Tris:HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µg/ml DNasa). Se congelaron las muestras. Se descongelaron y se agregó Tritón X-100 a concentración final de 0,5% v/v. Las células en suspensión se rompieron mediante sonicación con 4 pulsos de 20 s a 40% de potencia con un intervalo de 1 min en hielo entre cada pulso (Sonicador SONIFIER 250, Branson). Luego se centrifugó 30 min a 20000 x g a 4 °C, se descartó el pellet, y el sobrenadante se incubó 1 hora a 4 °C con la resina hidratada en agitación. Se tomó una fracción para el análisis por SDS-PAGE. Luego se empaquetó la resina en una columna. Se lavó la resina 5 veces con 8 ml de buffer 50 mM Tris:HCl pH 8 y 150 mM NaCl cada vez y se guardó una alícuota del último lavado para analizarla luego por SDS-PAGE. La elución se realizó pasando por la columna 10 ml del buffer de elución (50 mM Tris:HCl pH 9,5 y 10 mM glutatión reducido) y colectando fracciones de 1,5 ml. Se congelaron a -80 °C las distintas fracciones hasta su utilización. Finalmente se lavó la resina con 2 volúmenes de 50 mM Tris:HCl pH 9,5 y con 2 volúmenes de 2 M NaCl, y se la almacenó, disponible para un uso futuro, a 4 °C en 2 M NaCl con una punta de espátula de azida de sodio.

### **II.7.1.3. Obtención de anticuerpos policlonales contra P1TcCox15**

Para la obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína de fusión P1TcCox15, se utilizaron conejos *New Zeland* y se procedió según se detalla a continuación. El protocolo de inmunización (Albert Clark, 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 P1TcCox15 (aproximadamente de 6,4 kDa), por eso se utilizan aproximadamente 1 mg de la fusión GST-P1TcCox15 (aproximadamente de 31,4 kDa) en cada inoculación.

La primera inoculación se realizó de manera subcutánea con la muestra correspondiente. Para la obtención de anticuerpos anti-TcCox15 se utilizó una mezcla de 1 mg GST-P1TcCox15 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 3000 x g para separar el suero. Se reservó una fracción para ensayar mediante un ensayo de Western blot (ver sección II.7.6.2) la actividad del suero contra la proteína recombinante que se utilizó para inocular y un control negativo de extracto total de BL21(DE3)pLysS'.

A los 6 meses de la primera inoculación, se realizó una re-inoculación con 1 mg de la fusión GST-P1TcCox15 en 400 µL llevado a volumen con PBS y 400 µL de adyuvante de Freud completo. Luego de esta reinoculación, se realizaron dos extracciones más de sangre (a las 2 semanas y a las 7 semanas), con el mismo procedimiento anterior para separar el suero y se comprobó la reactividad mediante un ensayo de Western blot (ver sección II.7.6.2).

#### **II.7.1.4. Purificación de anticuerpos anti-P1TcCox15 a partir de suero inmune**

Para obtener anticuerpos policlonales anti-P1TcCox15 purificado a partir del suero inmune, se utilizó el péptido P1TcCox15 (aproximadamente de 6,4 kDa) adherido por electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa (aproximadamente 50 µg del péptido). Para esto, se digirió la fusión GST-P1TcCox15 con trombina durante 2 h a 26 °C en buffer 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> en una relación 1 µg trombina por cada 100 µg de proteína a digerir. Se corrió la proteína de fusión digerida en un SDS-PAGE con 14% p/v de acrilamida, se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa (ver sección II.7.6.2), se visualizaron las proteínas mediante tinción reversible con el colorante Rojo Ponceau y se cortó el área de la membrana correspondiente al péptido P1TcCox15. Esta se lavó 4 veces con PBS, se la incubó con PBS-T leche (PBS con 0,1% v/v Tween 20 y 5% p/v leche descremada en polvo de origen comercial) durante una hora a temperatura ambiente y se la lavó 4 veces con PBS.

La membrana conteniendo el péptido se incubó con 500 µl de suero inmune durante 1 hora a 37 °C en agitación suave. Luego, se lavó la membrana 3 veces con PBS y se incubó con 0,5 ml de la solución de elución de anticuerpos (100 mM glicina, 100 mM NaCl, pH 3) durante 1 min a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Esto último se repitió 3 veces. Finalmente, la membrana se lavó 3 veces con PBS y se repitió el procedimiento sucesivas veces. Las fracciones de elución conteniendo los anticuerpos purificados se neutralizaron inmediatamente por medio del agregado de una solución de 1 M Tris:HCl pH 8 equivalente a 1/10 del volumen total. El resultado de la purificación se evaluó por medio de un ensayo de Western blot (ver sección II.7.6.2) en el que fueron sembrados: un extracto de *E. coli* DH5α, un extracto de *E. coli* BL21(DE3)pLysS' que sobreexpresa la proteína GST (ambos como controles negativos) y un extracto de *E. coli* BL21(DE3)pLysS' que sobreexpresa GST-P1TcCox15 como control positivo, disponibles en el laboratorio. Como anticuerpo primario se utilizaron diferentes diluciones de la solución de anticuerpos anti-P1TcCox15 purificados de conejo. Las fracciones de anticuerpos purificados se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para concentrar las soluciones de anticuerpos purificados se utilizaron dispositivos centrífugos Amicon Ultra® con un valor de corte de 10 KDa, en su versión de 15 ml. La solución de anticuerpos se colocó en el compartimiento superior del dispositivo, se concentró mediante centrifugación a 2000 x g y a 4°C en una centrifuga refrigerada y se

descartó la solución filtrada del compartimiento inferior. Se recuperó un volumen de anticuerpos unas 15 veces menor al volumen inicial y se almacenó a -20 °C hasta su uso

La membrana conteniendo el péptido P1TcCox15 se lavó con PBS y se guardó en 30% v/v de etanol a 4 °C para su posterior reutilización. Para ser reutilizada, la misma se debe lavar con PBS y bloquear con PBS-T 5% p/v leche.

### **II.7.2. Preparación de extractos mitocondriales crudos de *Saccharomyces cerevisiae***

Para la obtención de extractos mitocondriales crudos, se siguió el protocolo propuesto por Diekert y colaboradores (Diekert *et al.*, 2001) con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Las levaduras se crecieron a 30 °C con agitación en medio sintético selectivo SCDO Glu (con los aminoácidos correspondientes) durante toda la noche (ver sección II.3.3). Luego, se hizo una dilución del cultivo ON saturado en 200 ml de medio sintético selectivo (SCDO Glu o Gal, con los aminoácidos correspondientes, utilizando diferentes concentraciones de metionina) tal que la  $DO^{600nm}$  sea aproximadamente 0,15 - 0,3 y se incubó durante 16 - 24 h en agitación hasta alcanzar una  $DO^{600nm}$  ~8 - 9. Se recolectaron las células por centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos a 8 °C. Se lavaron las células con  $H_2O_d$  y se volvieron a centrifugar. El pellet se lavó nuevamente y se transvasó a tubos descartables de 50 ml. Finalmente, se realizó una última centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos a 8 °C, se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo del pellet de células obtenido (normalmente se obtuvieron aproximadamente 2 g).

Las células se pusieron en suspensión utilizando la solución amortiguadora SHP fría (0,6 M manitol, 20 mM Tris:HCl pH 7,5 y 1 mM PMSF), en una densidad aproximadamente de 0,2 g células/ml. A cada tubo se le agregaron esferas de vidrio (0,4 - 0,5 mm de diámetro, previamente lavadas con una solución diluida de ácido nítrico al 5% v/v, enjuagadas con abundante  $H_2O_d$  y luego secadas) hasta ocupar un volumen final de 3 ml. Luego, se realizó la ruptura mecánica de las células por agitación vigorosa en *vortex* durante 1 minuto a máxima velocidad. Esto se repitió 5 veces incubando en hielo entre cada paso de ruptura. La suspensión resultante se centrifugó a baja velocidad (600 x g) durante 5 minutos. El sobrenadante -que contiene mitocondrias, membranas celulares y citosol- fue transferido a un tubo limpio. El pellet remanente (células enteras) fue sometido nuevamente a ruptura mecánica y centrifugación a baja velocidad, y el sobrenadante resultante se colocó junto con la fracción anterior. Luego, cada muestra se centrifugó a 1200 x g por 10 minutos y el

sobrenadante se pasó a un nuevo tubo. Con este sobrenadante se repitió la centrifugación a 1200 x g por 10 minutos y el sobrenadante obtenido, que posee la fracción citosólica y mitocondrial, se colocó en tubos apropiados para centrifuga de alta velocidad. Seguidamente, se centrifugó a 16100 x g durante 45 minutos a 8 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet -que contiene mitocondrias- se puso en suspensión utilizando 200 µl de solución amortiguadora SHP. Estas se conservaron a -80 °C en fracciones de 40 µl hasta su utilización.

### **II.7.3. Obtención de extractos celulares totales de epimastigotes**

Epimastigotes de *T. cruzi* salvajes o transfectados con construcciones de pTcINDEX (secciones II.6.1 y II.3.7) mantenidos en fase exponencial de crecimiento en LIT 10% SFB suplementados con 20 µM hemina a 28 °C (ver sección II.3.5), fueron colectados mediante centrifugación a 2000 x g durante 5 min. En el caso de los transfectantes, se agregó además 200 µg/ml Hyg e inducidos con tetraciclina (Tet - concentraciones de 0,05 a 0,5 µg/ml). Luego fueron lavados 2 veces con PBS y resuspendidos en buffer de lisis a razón de 0,5 - 1 x 10<sup>6</sup> parásitos/µl (50 mM Tris:HCl pH 7,5; 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% v/v Tritón X-100, 1 mM PMSF y mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma)). Se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

### **II.7.4. Obtención de extractos celulares totales de los distintos estadios de *T. cruzi***

Epimastigotes de *T. cruzi* salvajes o transfectados con plásmidos derivados del pTcINDEX (secciones II.6.1 y II.3.7) mantenidos en LIT 10% SFB suplementado con 20 µM hemina a 28 °C (ver sección II.3.5) en fase exponencial de crecimiento se colectaron por centrifugación a 2000 x g, se lavaron 2 veces con PBS y se suspendieron en buffer de lisis con urea (8 M urea, 20 mM Hepes pH 8) a razón de 0,5 - 1 x 10<sup>6</sup> parásitos/µl. Los tripomastigotes derivados de células se obtuvieron como se detalla en la sección II.3.5 y se colectaron por centrifugación a 6000 x g por 10 min, se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en buffer de lisis con urea a razón de 0,5 - 1 x 10<sup>6</sup> parásitos/µl. Los amastigotes se obtuvieron de células Vero infectadas mantenidas en DMEM 2% SFB (ver sección II.3.5). 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 1500 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 (27G). Los amastigotes se colectaron por centrifugación a 1500 x g por 8 min y luego fueron suspendidas en buffer de lisis con urea a razón de 0,5 - 1 x 10<sup>6</sup> parásitos/ $\mu$ l.

Los distintos extractos se fraccionaron y congelaron a -80 °C hasta su utilización.

#### **II.7.5. Obtención de extractos mitocondriales de epimastigotes**

Epimastigotes de *T. cruzi* (1,5 x 10<sup>9</sup> células) mantenidos en LIT 10% SFB suplementado con 20  $\mu$ M hemina a 28 °C (ver sección II.3.5) en fase exponencial de crecimiento se colectaron por centrifugación a 2000 x g durante 5 min, se lavaron 2 veces con 8 ml de buffer A (20 mM Tris:HCl pH 7,2; 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,225 M sacarosa; 20 mM KCl y 5 mM MgCl<sub>2</sub>) y se suspendieron en 2 ml de buffer B frío (25 mM Tris:HCl pH 7,6; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,250 M sacarosa; 1 mM PMSF y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma). La suspensión se transfirió a mortero previamente enfriado y se agregaron aproximadamente 1 a 2 ml de esferas de vidrio (0,4 - 0,5 mm de diámetro, previamente lavadas con una solución diluida de ácido nítrico al 5% v/v, enjuagadas con abundante H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y luego secadas). Se mortereó enérgicamente durante 10 min, verificando la lisis celular completa mediante observación al microscopio. Se transfirió el lisado a un tubo y se lavó el mortero y el pilón con 5 ml de buffer B. Se centrifugó a 600 x g durante 5 min y se recuperó el sobrenadante que contiene el citoplasma celular. Se centrifugó a 1000 x g durante 15 min y se recuperó el sobrenadante que contiene el contenido citoplasmático a excepción a restos de membrana y núcleo que quedaron en el pellet. Se centrifugó a 13500 x g durante 20 min para recuperar las mitocondrias en el pellet. Se resuspendieron en 800  $\mu$ l de buffer B para un último lavado y se volvieron a centrifugar a 13500 x g durante 20 min. Se resuspendió el pellet en 300  $\mu$ l de buffer B y se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

#### **II.7.6. Análisis de extractos proteicos**

##### **II.7.6.1. 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 (12 - 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 (poliacrilamida 4% p/v en 0,126 M Tris:HCl pH 6,8 y 0,1% p/v SDS) seguido por un gel de separación (12 - 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. Como iniciador de la reacción de polimerización se utilizó TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador de esta 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  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,5 mg/ml azul de bromofenol) en una proporción 4:1. Dependiendo el origen de las muestras se hicieron distintos tratamientos: extractos proteicos bacterianos (sección II.7.1) se hirvieron durante 5 min, extractos mitocondriales de levadura (sección II.7.2) se calentaron 30 min a 50 °C, extractos totales de *T. cruzi* (secciones II.7.3 y II.7.4) se calentaron 15 min a 42 °C. En el caso de fracciones enriquecidas en mitocondrias de epimastigotes de *T. cruzi* (sección II.7.5) se calentaron 15 min a 42 °C, pero se utilizó una solución de siembra sin  $\beta$ -mercaptoetanol. De forma general, la cantidad de muestra sembrada en cada calle fue: a igual volumen de extracto por calle (10-20  $\mu$ L) en el caso de los extractos proteicos bacterianos para verificar la expresión de la sobreexpresión de proteínas recombinantes, a igual cantidad de proteínas por calle (15-60  $\mu$ g) en el caso de extractos mitocondriales de levadura o de epimastigotes (ver sección II.7.7) y a igual cantidad de células por calle (5 - 15 x 10<sup>6</sup> células) en el caso de extractos totales de parásitos.

El marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas®) 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 25 mA por gel de 1 mm de espesor. En todos los casos se empleó el equipo Mini-PROTEAN III® (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 (ver sección II.7.6.2). 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.

### **II.7.6.2. Western blot**

Las proteínas separadas por SDS-PAGE (ver sección II.7.6.1) se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) utilizando el sistema Mini-Trans-Blot transfer (Bio-Rad). La transferencia se realizó con agitación permanente en baño de agua-hielo durante 90 min a 350 mA, o alternativamente durante toda la noche a 14 V y 4 °C. La solución de transferencia empleada consistió en 25 mM Tris:HCl pH 8, 192 mM glicina y 20% v/v metanol. Concluida la transferencia, se verificó la correcta transferencia de las proteínas por tinción reversible con el colorante Rojo Ponceau. 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 60 min con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se incubó toda la noche a 4°C en agitación suave (o 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, 100 µg/ml, obtenidos de ratón) en una dilución 1/200, anticuerpos policlonales de conejo anti-TcCox15 purificados y concentrados (sección II.7.1.4) en una dilución 1/500, anticuerpos de conejo anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1/1000, anticuerpos monoclonales de ratón anti-tubulina clon TAT-1 en una dilución 1/1000 (donado por K. Gull, Universidad de Oxford, Inglaterra), anticuerpos de conejo anti-triparredoxina peroxidasa mitocondrial de *T. cruzi* (TcmPx) (Nogueira *et al.*, 2009) en una dilución 1/5000 (donado por Sergio Guerrero, UNL, Argentina), anticuerpos policlonales de conejo anti-subunidad β del complejo F1 de la ATPasa mitocondrial de *S. cerevisiae* en una dilución 1/3500 (donado por A. Tzagoloff, Universidad de Columbia, EE.UU.) y anticuerpos anti-hemoperoxidasa ascorbato dependiente (TcAPX) de retículo endoplasmático (Wilkinson *et al.*, 2002) en una dilución 1/5000. Posteriormente se realizaron 4 lavados de 5 min con PBS-T leche 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, 133 µg/ml, obtenidos de cabra) diluidos 1/3500 en buffer PBS-T o anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa HRP (Calbiochem,

133 µg/ml, obtenidos de cabra) en una dilución 1/10000. Seguidamente, se efectuaron 4 lavados de 5 min con la solución de lavado (PBS-T o PBS).

La detección de las señales correspondientes a las proteínas de interés se realizó mediante el método quimioluminiscente. Se emplearon los *kits* comerciales ECL Prime Western Blotting Detection kit (GE Healthcare) o SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate de Pierce, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. 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. Alternativamente, se empleó un sistema quimioluminiscente preparado en el laboratorio en el que la solución de reacción estaba compuesta por: 0,24% v/v luminol (desde *stock* 92 µg/µl en DMSO), solución de 0,04% v/v ácido cumárico (desde *stock* 28 µg/µl en DMSO) y 0,032 vol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (desde *stock* 100 vol) en 100 mM Tris:HCl pH 8,6. Se utilizaron 2 ml de esta solución para incubar la membrana durante 2 min. En todos los casos se siguió el mismo procedimiento de revelado después de exponer frente a la placa autorradiográfica: la placa se incubó 2 min en la solución de revelado (Kodak) y luego de lavar con agua, se incubó 2 min en la solución fijadora. Finalmente se enjuagó la placa autorradiográfica con agua y se dejó secar.

Las imágenes fueron procesadas y la intensidad de las bandas obtenidas cuantificada con el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Para estimar la masa molecular de las proteínas detectadas se utilizó el macro *MolWt* (<http://www.phase-hl.com/imagej.htm>).

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 utilizaron dos tratamientos alternativos: una incubación de 30-60 min a temperatura ambiente u ON a 4 °C con una solución con 100 mM glicina, 100 mM NaCl, pH 3 (tratamiento suave), o 30 min a 50 °C con una solución conteniendo 100 mM β-mercaptoetanol, 2% SDS y 62,5 mM Tris:HCl pH 6,7 (tratamiento fuerte). En ambos casos, luego del tratamiento con las respectivas soluciones, se procedió a lavar la membrana con PBS-T y se bloqueó la misma utilizando PBS-T-leche. Finalmente se incubó con los anticuerpos alternativos y se realizó el resto de la técnica de Western blot.

### **II.7.6.3. Actividad peroxidasa de hemoproteínas**

El ensayo para cuantificar la actividad peroxidasa de hemoproteínas electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa, las muestras inmediatamente después de

ser electrotransferidas fueron reveladas utilizando el reactivo quimioluminiscente como se indica a continuación. Las muestras de proteínas se calentaron 15 min a 42 °C en solución de siembra sin  $\beta$ -mercaptoetanol, entonces el grupo hemo de los citocromos c permanece unido covalentemente y estos tienen actividad peroxidasa intrínseca que puede detectarse mediante el revelado quimioluminiscente convencional (Vargas *et al.*, 1993). Entonces, luego de separar las muestras por SDS-PAGE (sección II.7.6.1) y electrotransferirlas a membrana de nitrocelulosa (Amersham) utilizando el sistema Mini-Trans-Blot transfer (Bio-Rad) como se indica la sección II.7.6.2, la membrana se lavó con PBS y se incubó con el reactivo quimioluminiscente ECL Prime Western Blotting Detection kit (GE Healthcare) o SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate de Pierce, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las membranas se incubaron 5 min con los reactivos comerciales mencionados y luego fueron expuestas 20 - 30 min frente a una placa autorradiográfica. Esta última se incubó 2 min en la solución de revelado (Kodak) y luego de lavar con agua, se incubó 2 min en la solución fijadora. Finalmente se enjuagó la placa autorradiográfica con agua y se dejó secar.

#### **II.7.7. Cuantificación de proteínas**

Las concentraciones proteicas de los extractos se estimaron utilizando el método colorimétrico Protein Assay (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la curva patrón se utilizaron diluciones de una albúmina sérica bovina 1 mg/ml.

#### **II.8. Estudio de expresión de genes recombinantes de *Trypanosoma cruzi***

##### **II.8.1. Ensayo de complementación en el sistema heterólogo *Saccharomyces cerevisiae***

Para este ensayo se prepararon placas con 20 ml de medio SCDO sólido (sección II.3.3), con diferentes fuentes de carbono y el correspondiente agregado de aminoácidos.

Se cultivaron células de *S. cerevisiae* transformadas con las diferentes construcciones (secciones II.6.1 y II.3.4) en 5 ml de medio SCDO Glu sin el aminoácido correspondiente para la selección por auxotrofia (descrito en la sección II.3.3) 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 sea 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.

En el caso de las placas con medio SCDO Glu, se observó crecimiento de las levaduras después de 1 día de incubación, mientras que con las placas con medio SCDO Gly/EtOH se necesitaron normalmente al menos 3 días. 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.

### **II.8.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de proteínas recombinantes en el crecimiento de epimastigotes**

Los epimastigotes transfectados como se describe en la sección II.3.7 con las construcciones clonadas en el vector pTcINDEX, mantenidos en medio LIT 10% SFB con 20  $\mu$ M hemina y 200  $\mu$ g/ml Hyg a 28 °C, se colectaron por centrifugación a 2000 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 agregó tetraciclina a diferentes concentraciones (0,05; 0,15; 0,25 y 0,5  $\mu$ g/ml). Las células fueron mantenidas durante 7 - 10 días 28 °C en fase exponencial de crecimiento realizando diluciones 1/2 cada 2 o 3 días (manteniendo el volumen y la concentración de tetraciclina constantes). El crecimiento de las células se monitoreó contando los parásitos en cámara de Neubauer (sección II.3.6).

### **II.8.3. Mediciones de consumo de oxígeno (como evaluación de la actividad CcO)**

Para evaluar la capacidad respiratoria de cultivos celulares de *S. cerevisiae* y de epimastigotes de *T. cruzi*, se realizaron mediciones del consumo de oxígeno de estas células utilizando un electrodo de Clark conectado a un oxígrafo YSI *model 5300 Biological Oxygen Monitor* y se registró la disminución de oxígeno del medio mediante el sistema de registrador REC 111 Amersham Pharmacia Biotech conectado al mismo. La cámara de reacción posee una conexión a un baño de agua termostático para mantener constante la temperatura.

En el caso de las levaduras transformadas con las construcciones de pRS425M25 (secciones II.6.1 y II.3.4), las muestras se prepararon a partir de 8 ml de cultivos crecidos ON

a 30 °C en SCDO Glu suplementado con 10 mg/L metionina y sin el aminoácido correspondiente para la selección por auxotrofia (sección II.3.3). Se centrifugaron 10 min a 3000 x g, se lavaron con 3 ml glicerol 3% v/v y finalmente se resuspendieron con 1 ml de la misma solución. En este punto se tomó una muestra para medir la DO a 600 nm de la suspensión a utilizar. En la cámara de reacción del oxígrafo se colocó 1,9 ml de solución de glicerol 3% y se registró el 100% de oxígeno. Luego se agregó 50 - 100 µl de la muestra preparada y se registró el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio a 30 °C durante 2 - 5 min. Se hicieron al menos 2 agregados más de la muestra y se registró nuevamente el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio también durante 2 - 5 min. Se verificó el proceso de respiración mediante la inhibición del consumo de oxígeno con el agregado de 2 µl de azida de sodio 1 M (inhibidor de la enzima citocromo c oxidasa).

En el caso de los epimastigotes transfectantes con las construcciones de pTcINDEX (secciones II.6.1 y II.3.7), se determinó el consumo de oxígeno siguiendo un protocolo adaptado de Vercesi y colaboradores (Vercesi *et al.*, 1991). Después de 3 - 4 días de crecimiento en 8 - 10 ml de medio LIT 10% SFB suplementado con 20 µM hemina y 200 µg/ml Hyg a 28 °C (sección II.3.5) e inducidos con tetraciclina, las células se colectaron a 2000 x g por 5 min, se lavaron con PBS y se resuspendieron a razón de 50 x 10<sup>6</sup> células/100 µL en TSB-EGTA (125 mM sacarosa, 65 mM KCl, 10 mM Tris:HCl pH 7,5; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 333 µM EGTA) y mantenidas en hielo. En la cámara de reacción del oxígrafo se colocó 1,9 ml TSB-EGTA con 5 mM succinato y se registró el 100% de oxígeno. A cada muestra se le agregó 5 mM succinato y 50 µM digitonina, y luego se procedió a registrar el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio a 28 °C haciendo al menos 3 agregados de 50 - 100 µl de cada muestra durante 3 - 5 min. A cada muestra se le contó la cantidad de parásitos presentes en la misma con cámara de Neubauer.

Las velocidades de consumo de oxígeno se calcularon a partir de los valores de las pendientes de las rectas obtenidas al graficar porcentaje de oxígeno disuelto en función del tiempo y multiplicado por un factor que incluye la concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con el aire a la temperatura de trabajo: 237 nmoles O<sub>2</sub>/ml a 28 °C y 230 nmoles O<sub>2</sub>/ml a 30 °C (datos de Walker, 1987). Los valores calculados se normalizaron en el caso de levaduras por las medidas de DO a 600 nm de cada cultivo celular y en el caso de los parásitos por el número de parásitos de la muestra.

#### **II.8.4. Análisis de la sobreexpresión de proteínas recombinantes sobre la infección de *Trypanosoma cruzi* en células Vero**

El ensayo consiste en evaluar el efecto de la inducción de la expresión del gen TcCOX15 recombinante (salvaje y mutantes) durante la infección de células Vero con tripomastigotes y durante la replicación intracelular de amastigotes.

Para el ensayo, se obtuvieron tripomastigotes derivados de células como se detalla en la sección II.3.5 a partir de epimastigotes transfectados con las construcciones del vector pTcINDEX (secciones II.6.1 y II.3.7). Se colectaron por centrifugación a 6000 x g por 10 min tripomastigotes del medio de cultivo de células previamente infectadas y se agregaron  $30 - 90 \times 10^3$  a pocillos de microplaca de 24 pocillos ( $1,9 \text{ cm}^2$  de superficie por pocillo) con  $3 \times 10^3$  células Vero sembradas el día anterior sobre cubreobjetos de vidrio (que equivale a un MOI de 10 - 30), en medio DMEM 2% SFB a 37 °C. En el caso de demostrar un posible efecto durante la infección, los tripomastigotes se pre-incubaron durante 30 min en medio DMEM 2% SFB con 0,15 - 0,25 µg/ml tetraciclina y luego fueron usados para infectar la monocapa de células manteniendo el mismo medio. Luego de 1 - 16 h a 37 °C, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con DMEM 2% SFB con o sin 0,15 - 0,25 µg/ml tetraciclina durante dos días. Luego las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con metanol durante 15 min. Se lavaron nuevamente con PBS, se tiñeron con colorante Giemsa (dilución 1/20 en agua estabilizada) durante 30 min y se montaron con Bálsamo de Canadá (Biopack). Se contaron la cantidad de amastigotes presentes por células por microscopía óptica, 200 células por muestra, y se determinaron con ellos el porcentaje de células infectadas y el número promedio de amastigotes por célula infectada.

Alternativamente para visualizar los tripomastigotes recién internalizados se incubaron 10 min con 1 µM DAPI al abrigo de la luz, se lavaron 3 veces con PBS y finalmente se montaron utilizando glicerol 3%. Se contaron las células por microscopía utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse NiU E300.

### **II.9. Microscopía**

#### **II.9.1. Epimastigotes incubados con análogos de hemo**

Los epimastigotes tratados con los AHs (secciones II.4.3 o II.4.4) fueron fijados con 500 µl 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 (pretratados con polilisina)

durante 20 min, se lavaron 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 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.

### **II.9.2. Tinción mitocondrial en epimastigotes**

Los epimastigotes fueron mantenidos en fase exponencial de crecimiento en LIT 10% SFB suplementado con 20  $\mu$ M hemina a 28 °C (sección II.3.5) y en el caso de parásitos transfectantes (sección II.3.7) se los indujo con tetraciclina (Tet - concentraciones de 0,05 a 0,5  $\mu$ g/ml). Estos fueron colectados por centrifugación a 2000 x g, lavados dos veces con PBS y suspendidos en 100  $\mu$ L de PBS con 1  $\mu$ M MitoTracker (Invitrogen) por cada  $10 \times 10^6$  células. Después de 60 min a 28 °C, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 500  $\mu$ l de 3,7% p/v formaldehído en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. Se lavaron nuevamente con PBS. Las células se adhirieron a portaobjetos (pretratados con polilisina) durante 20 min, se lavaron 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 utilizando el programa Nikon EZ-C1. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). A cada imagen se le corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y contraste.

Se utilizó el MitoTracker Orange CMTMRos (M7510 de Invitrogen). Tiene una longitud de onda de excitación de 554 nm y una longitud de onda de emisión de 576 nm. El *stock* se preparó 1 mM en DMSO y se guardó al abrigo de la luz a -20 °C.

### **II.9.3. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en epimastigotes**

Epimastigotes marcados con Mitotracker como se describe en la sección anterior se utilizaron para este ensayo. Luego de ser adheridas las células a los 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 lavaron con Buffer 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), se incubaron con este buffer durante 30 min y luego se

incubó con anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-TcCox15 purificados y concentrados (dilución 1/40) (sección II.7.1.4) en UIB con 1% p/v BSA durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos no unidos se lavaron 3 veces 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) y con 1  $\mu$ M DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) en UIB durante 1 hora a temperatura ambiente al abrigo de la luz. 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 utilizando el programa Nikon EZ-C1. Las imágenes se procesaron y se realizó el análisis cuantitativo de colocalización de las señales con el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). A cada imagen se corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y el contraste, y para el análisis de colocalización las imágenes fueron previamente deconvolucionadas.

#### **II.9.4. Microscopía de células de levaduras que contienen GFP recombinante**

Para observar por microscopía muestras de levaduras transformadas con las construcciones p4RS26M25.*TcCOX15.HIS.GFP* o pYX142-*mtGFP* (secciones II.6.1 y II.3.4), se procedió de la siguiente manera. Se tomó 1 ml de cultivo ON de las levaduras crecidas en medio SCDO suplementado con las distintas fuentes de carbono, 20 mg/L metionina y sin el aminoácido correspondiente para la selección por auxotrofia a 30 °C (sección II.3.3), se lavó con PBS, se dejó adherir en portaobjetos cubiertos 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 utilizando el programa Nikon EZ-C1. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). A cada imagen se corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y el contraste.

#### **II.10. Estadística**

Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada ensayo descrito y en cada uno se realizó por triplicado cada condición en estudio. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism version 6.0. En cada caso se detalla el análisis realizado.

## III- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

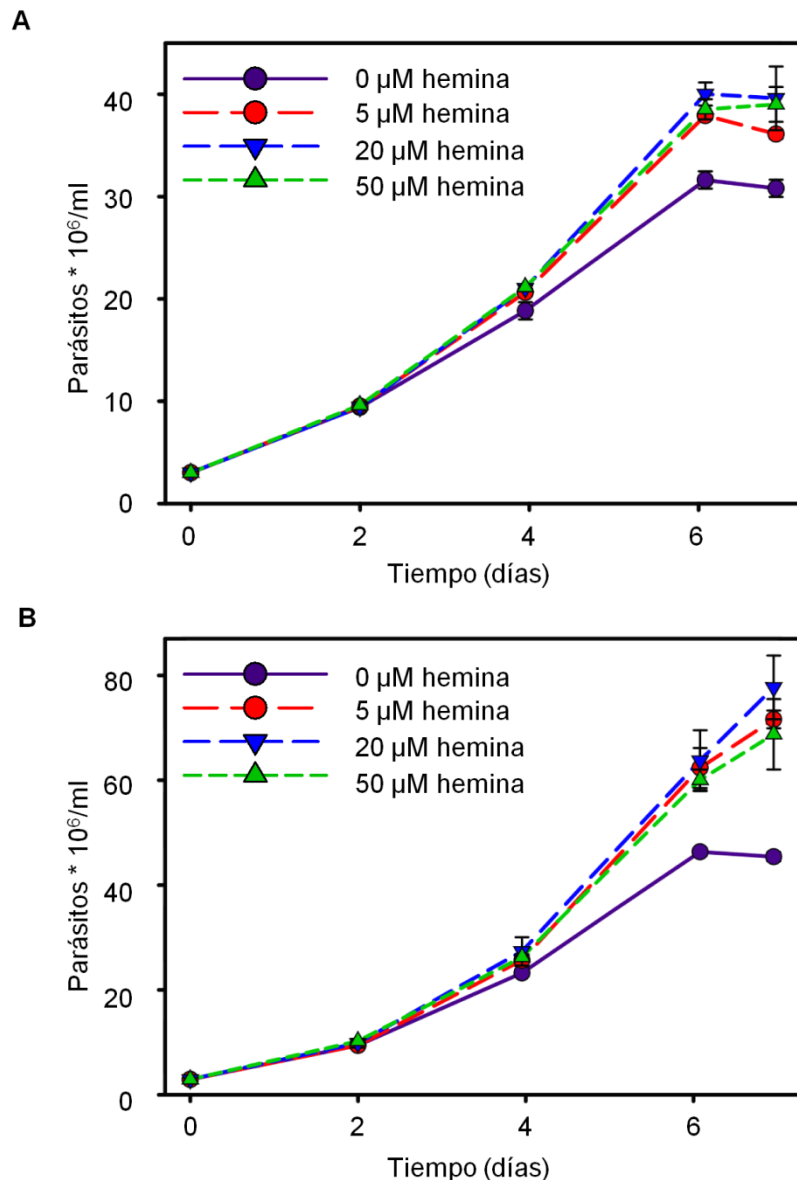
### **III.1. Transporte de hemo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* es auxótrofo para el grupo hemo por lo que debe incorporarlo desde el medio externo, transportarlo a los diferentes compartimentos subcelulares y al mismo tiempo controlar la concentración y el tráfico intracelular para evitar los posibles efectos citotóxicos (Korený *et al.*, 2010). El hemo no puede atravesar libremente las membranas biológicas, por ello está ampliamente aceptado que deben existir transportadores proteicos que se encarguen de este trabajo (Cupello *et al.*, 2011; Lara *et al.*, 2007).

#### **III.1.1. Efecto de la disponibilidad de hemo en el medio de cultivo sobre el crecimiento de epimastigotes**

Los epimastigotes de *T. cruzi* se mantienen de rutina en medios de cultivo indefinidos siendo los más utilizados el medio LIT (*Liver Infusión Tryptose*) y el medio BHI (*Brain Heart Infusión*). Estos deben ser suplementados con suero fetal bovino (SFB) y alguna fuente de hemo donde la más usada es la hemina (forma comercial donde el hierro del anillo de protoporfirina se encuentra oxidado como ión férrico) o hemoglobina (Camargo, 1964; Schuster y Sullivan, 2002; Warren, 1960). El rango de concentraciones de hemina frecuentemente utilizado para estos medios es de 20  $\mu\text{M}$  a 30  $\mu\text{M}$  (13 a 20 mg/l).

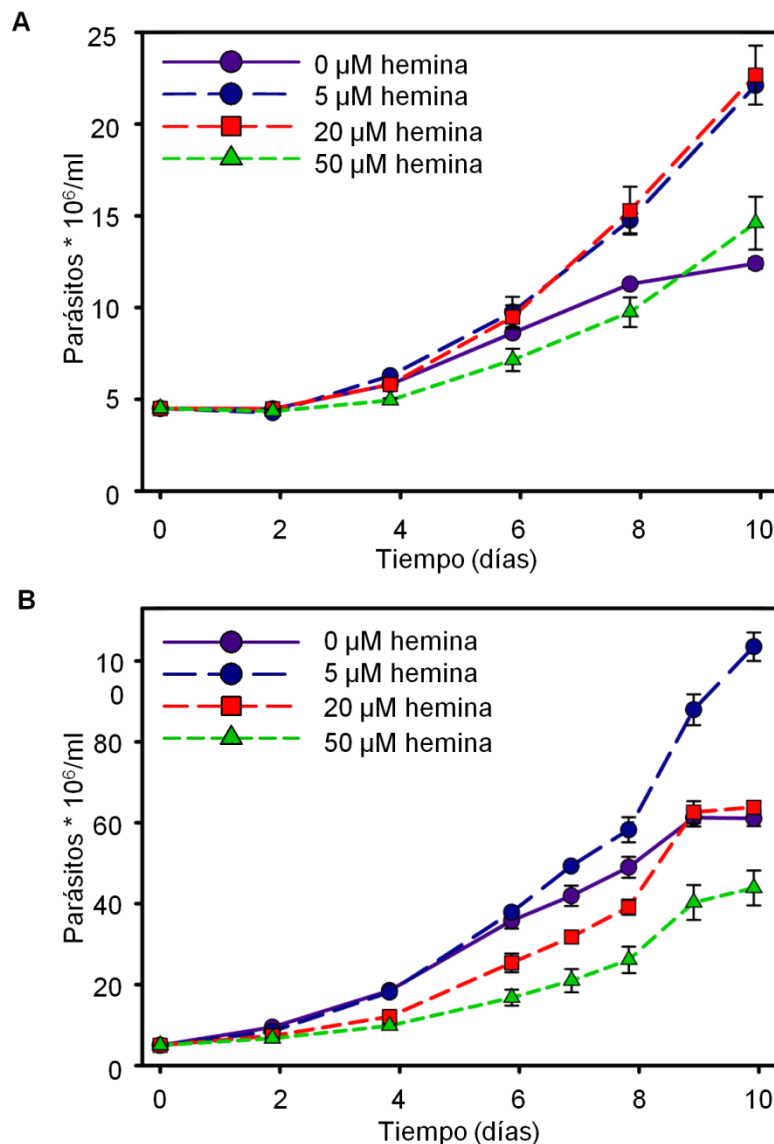
En la primera parte de este trabajo se evaluó el comportamiento de dos cepas de *T. cruzi* correspondientes a dos DTUs distintas disponibles en el laboratorio - Dm28c (TcI) y CL Brener (TcVI) - ante el agregado de distintas concentraciones de hemina al medio de cultivo. Para esto se tomaron epimastigotes mantenidos en medio LIT 10% SFB con 20  $\mu\text{M}$  hemina (condición normal de crecimiento utilizada en el laboratorio) y se los desafió a crecer en el mismo medio suplementado con distintas concentraciones de hemina (0, 2, 5, 20 y 50  $\mu\text{M}$ , en algunos ensayos también se analizó el efecto a 100  $\mu\text{M}$ ) como se detalla en la sección II.4.1 de Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 21, los parásitos siguieron el mismo patrón de crecimiento en las condiciones ensayadas, solo se observó una disminución leve en el número de parásitos cuando el medio no fue suplementado con hemina (0  $\mu\text{M}$ ), y este efecto fue más marcado en la cepa Dm28c que alcanzó un número menor de parásitos en la fase estacionaria.



**Figura 21. Los epimastigotes se adaptan a un cambio repentino en la concentración de hemina del medio de cultivo.** El crecimiento de los epimastigotes de las cepas CL Brener (A) y Dm28c (B) en LIT 10% SFB suplementado con 0, 5, 20 o 50  $\mu\text{M}$  hemina fue controlado por 7 días. Los cultivos se mantuvieron sin diluciones periódicas hasta llegar a fase exponencial tardía/estacionaria de crecimiento. Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada.

Los epimastigotes toleraron el aumento de la concentración de hemina de 20 a 50  $\mu\text{M}$  pero fueron afectados cuando la concentración de hemina se redujo de 20 a 0  $\mu\text{M}$ . En este ensayo observamos que los epimastigotes de ambas cepas mantienen un patrón de crecimiento normal durante los primeros días, probablemente porque contaban con reservas de hemo intracelular. Para probar esta hipótesis, los parásitos fueron mantenidos en medio LIT 10 % SFB sin el agregado de hemina durante 15 días (condición de hambreado de hemo) y luego fueron desafiados ante las mismas condiciones de crecimiento que en el ensayo anterior como se muestra en la figura 22. En ambas cepas se observó un efecto negativo en el crecimiento cuando fueron desafiadas a crecer en

medio LIT 10% SFB sin el agregado de hemina, y ante el agregado de 5  $\mu\text{M}$  hemina mostraron una recuperación del crecimiento. El agregado de 50  $\mu\text{M}$  hemina inicialmente afectó negativamente el crecimiento de ambas cepas, sin embargo CL Brener mostró una adaptación que permitió la recuperación del patrón de crecimiento que no fue observado en los epimastigotes de la cepa Dm28c. Por otro lado, ambas cepas mostraron un fenotipo diferente ante el desafío con 20  $\mu\text{M}$  hemina: los epimastigotes CL Brener mostraron el mismo patrón de crecimiento que en 5  $\mu\text{M}$  hemina, mientras que los epimastigotes de la cepa Dm28c mostraron un retraso inicial en el crecimiento que luego se recuperó, aunque el número de parásitos por ml resultante fue menor que el obtenido en 5  $\mu\text{M}$  hemina.



**Figura 22. Los epimastigotes de distintas cepas de *T. cruzi* responden de forma diferencial al estrés causado por la falta de hemina en el medio de cultivo.** El crecimiento de epimastigotes de las cepas CL Brener (A) y Dm28c (B) mantenidos en LIT 10% SFB suplementado con 0, 5, 20 o 50  $\mu\text{M}$  hemina fue seguido durante 10 días realizando diluciones periódicas del cultivo inicial. Previamente los parásitos se mantuvieron durante 15 días en LIT 10% SFB sin hemina (hambreado). Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada.

Con el objetivo de determinar si la variación en la disponibilidad de hemina en el medio de cultivo altera el contenido intracelular de hemo en epimastigotes, se optimizó el protocolo de cuantificación espectrofotométrica de hemo para medir el contenido intracelular en epimastigotes. Para esto se colectaron entre  $50 - 250 \times 10^6$  epimastigotes crecidos por 3 días en las condiciones que se detallan en la figura 22, se determinó el contenido intracelular de hemo por el método de la piridina básica (sección II.5.1 de Materiales y Métodos) que fue expresado en nmol de hemo/ $10^9$  células y se detalla en la tabla 4. No se pudo detectar hemo intracelular en las muestras que corresponden a los epimastigotes crecidos en ausencia de hemina aún procesando mayor cantidad de células ( $900 \times 10^6$  parásitos). Considerando el límite de detección del método (aproximadamente  $0,1 \mu\text{M}$  de hemo) y el número de parásitos procesados ( $900 \times 10^6$  células) en un volumen de 1 ml, estimamos que en los epimastigotes mantenidos en el medio de cultivo sin hemina, el contenido de hemo intracelular fue menor a  $0,12$  nmol de hemo/ $10^9$  parásitos. Por otro lado, se determinó el contenido de hemo intracelular en epimastigotes mantenidos en el medio que fue suplementado con  $5 \mu\text{M}$  de hemina, siendo de  $3,4$  y  $4,6$  nmoles de hemo/ $10^9$  parásitos para las cepas CL Brener y Dm28c, respectivamente. Los parásitos mantenidos con  $20$  y  $50 \mu\text{M}$  hemina mostraron un mayor contenido de hemo que los anteriores, si bien no se mantuvo una relación lineal entre el incremento de hemina en el medio de cultivo y el contenido de hemo intracelular, sugiriendo que los epimastigotes limitarían la cantidad de hemo intracelular.

Condición de crecimiento	CL Brener nmoles hemo/ $10^9$ parásitos $\pm$ DS	Dm28c nmoles hemo/ $10^9$ parásitos $\pm$ DS
$0 \mu\text{M}$ hemina	ND	ND
$5 \mu\text{M}$ hemina	$3,4 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,3$
$20 \mu\text{M}$ hemina	$10,7 \pm 1,6$ **	$8,4 \pm 1,1$ *
$50 \mu\text{M}$ hemina	$10,4 \pm 1,2$ **	$11,8 \pm 1,5$ **

**Tabla 4. La concentración de hemina en el medio de cultivo modula el contenido intracelular 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 correspondientes a los 3 días de crecimiento en las condiciones detalladas en la figura 22. Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada una de las condiciones ensayadas. \* $p < 0,1$  y \*\* $p < 0,05$  comparado con los parásitos crecidos en  $5 \mu\text{M}$  hemina (análisis de varianza ANOVA de un factor seguido por post-test de comparaciones múltiples de Tukey). ND: no determinado.

Un análisis exhaustivo del comportamiento de los epimastigotes que fueron sometidos al hambre de hemo y luego desafiados a crecer en un medio suplementado con 20 o 50  $\mu\text{M}$  hemina - como se muestra en la figura 22 - sugiere que el cambio en las condiciones de cultivo afectó negativamente su patrón de crecimiento, mediante inspección visual por microscopía óptica observamos que también se afectó su morfología (dato no mostrado) y los valores de hemo intracelular fueron mayores que los observados en parásitos crecidos en 5  $\mu\text{M}$  hemina (tabla 4). Sin embargo, luego de este efecto inicial negativo, los epimastigotes mostraron una recuperación, tanto en el crecimiento como en la morfología. Este fenómeno negativo en un principio y luego la recuperación o adaptación, podría deberse a que cuando los epimastigotes después del hambre son transferidos a un medio con alta disponibilidad de hemina (20 o 50  $\mu\text{M}$ ), podrían incorporar rápidamente este cofactor sobrepasando su capacidad de almacenamiento y distribución, generando el efecto negativo inmediato. Pero luego, este exceso de hemo intracelular podría activar algún mecanismo de protección o respuesta que le permitiría al parásito adaptarse a esta nueva situación. Entre las posibles opciones podría desencadenarse un mecanismo que disminuya la incorporación del hemo desde el medio (inhibición del transporte), que se desencadene algún mecanismo de resistencia a los efectos nocivos del hemo (degradación de hemo intracelular en exceso o algún sistema de almacenamiento), o bien que el hemo disponible en el medio disminuyó – ya sea por aumento del número de parásitos en el medio o por un sistema de degradación.

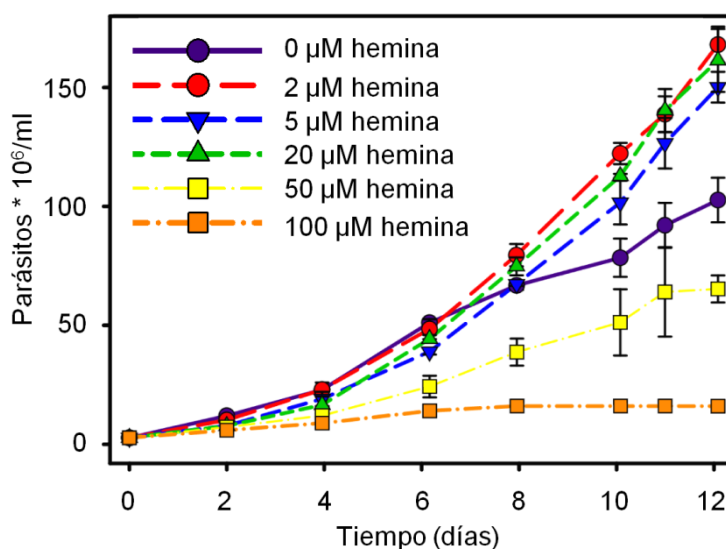
Para tratar de distinguir entre las posibles causas, se determinó el contenido de hemo intracelular en muestras de epimastigotes que fueron mantenidas 10 días en las condiciones de crecimiento mencionados en la figura 22: hambre de 15 días y luego mantenidos durante 10 días en LIT 10% SFB suplementado con 20  $\mu\text{M}$  hemina (condición que causó un efecto negativo menor sobre el crecimiento respecto a la condición de 50  $\mu\text{M}$  hemina). Los valores obtenidos fueron de  $4,8 \pm 0,6$  y  $3,3 \pm 0,2$  nmoles hemo/ $10^9$  parásitos correspondientes a las cepas CL Brener y Dm28c, respectivamente; valores cercanos a los detectados en los parásitos crecidos en 5  $\mu\text{M}$  hemina (condición que fue siempre la más favorable para el crecimiento de los parásitos). Esta observación sugiere que los epimastigotes han podido adaptarse a sobrevivir en un medio con mayor disponibilidad de hemo ya sea inhibiendo el transporte del exceso de hemo o mediante la activación de algún

mecanismo de degradación. Aunque estudios más complejos deberían realizarse para discriminar entre estas posibilidades.

A pesar de que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar hemo, las cepas de epimastigotes que estudiamos en el laboratorio lograron replicarse en el medio de cultivo sin el agregado de hemina, aunque no alcanzaron el mismo valor de número de parásitos por ml que los crecidos en las otras condiciones (figura 21 y 22) y esto fue más marcado en aquellos parásitos que habían sido previamente hambreados de hemo. Por ello decidimos evaluar el contenido de hemo en el medio utilizado. El medio LIT 10% SFB es un medio indefinido ya que posee componentes como infusión de hígado, triptosa y además SFB de composiciones indefinidas. El contenido de hemo en el medio LIT (sin suplementar con SFB) y en el SFB se determinó por el método de la piridina básica (sección II.5.1 de Materiales y Métodos). En el primero no se detectó presencia de hemo, aunque no se descarta que haya trazas de hemo por debajo del límite de detección del método. Pero en muestras de SFB de diferentes lotes de sueros se detectaron concentraciones en el rango de 0,6 a 6  $\mu\text{M}$  de hemo, por lo que al utilizarlo al 10% v/v la solución final de LIT 10% SFB quedaría con una concentración de hemo de 0,06 a 0,6  $\mu\text{M}$ . Esta evidencia nos lleva a postular que esta disponibilidad de hemo en el medio de cultivo, aunque mínima, sería suficiente para sostener el crecimiento de los parásitos.

Por último, para profundizar nuestros estudios sobre el efecto que causa la variación en la concentración de hemina en el crecimiento de los epimastigotes, se siguió el crecimiento de epimastigotes Dm28c en medio LIT 10% SFB con distintas concentraciones de hemina agregada pero, en este caso, se realizaron diluciones periódicas de los cultivos con medio fresco cada dos días. De esta forma nos independizamos de las variaciones que debidas a la transición por las diferentes fases de crecimiento (los cultivos se mantuvieron siempre en fase exponencial) y de la variación de la disponibilidad de hemina en el medio de cultivo que pudiera ocurrir por su consumo o por su degradación, ya que con el agregado de medio fresco también se repone hemina. Para esta experiencia se utilizó solo la cepa Dm28c que resultó ser más sensible a las variaciones en la concentración de hemina. En este ensayo incluimos las concentraciones de 2 y 100  $\mu\text{M}$  hemina para ampliar el rango de concentraciones utilizadas, esta última se logró con el agregado desde una solución *stock* 2 mM. La razón para esta elección fue que un agregado desde la solución de 1 mM implicaba un agregado excesivo de disolvente (50% v/v etanol y 0,01 NaOH) que afecta negativamente

el crecimiento. El perfil de crecimiento de los cultivos de epimastigotes se muestra en la figura 23 donde no se observan variaciones significativas cuando se empleó medio LIT 10% SFB suplementado con 2, 5 y 20  $\mu\text{M}$  hemina. Los epimastigotes desafiados a crecer en LIT 10% SFB sin agregado extra de hemina mostraron una disminución en el crecimiento luego del octavo día – similar a lo observado en la figura 21. Sin embargo, se observó que los epimastigotes en medio con el agregado de 50  $\mu\text{M}$  hemina mostraron una disminución marcada en su crecimiento a diferencia del comportamiento observado en el ensayo que se muestra en la figura 20 cuando se utilizó la misma concentración de hemina para suplementar el medio LIT 10% SFB. La comparación de los resultados de estos dos ensayos (con y sin dilución periódica en medio suplementado con 50  $\mu\text{M}$  de hemina) nos lleva a proponer que esta concentración - 50  $\mu\text{M}$  - es elevada y causaría efectos nocivos en epimastigotes, sin embargo cuando no se mantuvo la presión (al no renovar periódicamente el medio de cultivo) no se observó este efecto negativo en los parásitos. Posiblemente porque se produjo una disminución de la concentración de hemina en el medio (degradación, polimerización, etc.) y no porque el parásito logró adaptarse a esta concentración de hemina disponible. Por otro lado, cuando los epimastigotes fueron desafiados a crecer en LIT 10% SFB 100  $\mu\text{M}$  hemina prácticamente no se observó aumento del número de parásitos por ml, verificándose el efecto tóxico causado por la alta concentración de hemina.



**Figura 23. El crecimiento de los epimastigotes depende de la concentración de hemina en el medio de cultivo.** El crecimiento de epimastigotes de la cepa Dm28c en LIT 10% SFB suplementado con 0, 2, 5, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$  hemina fue controlado durante 12 días donde se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento por diluciones periódicas 1/2 cada 2 días. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada.

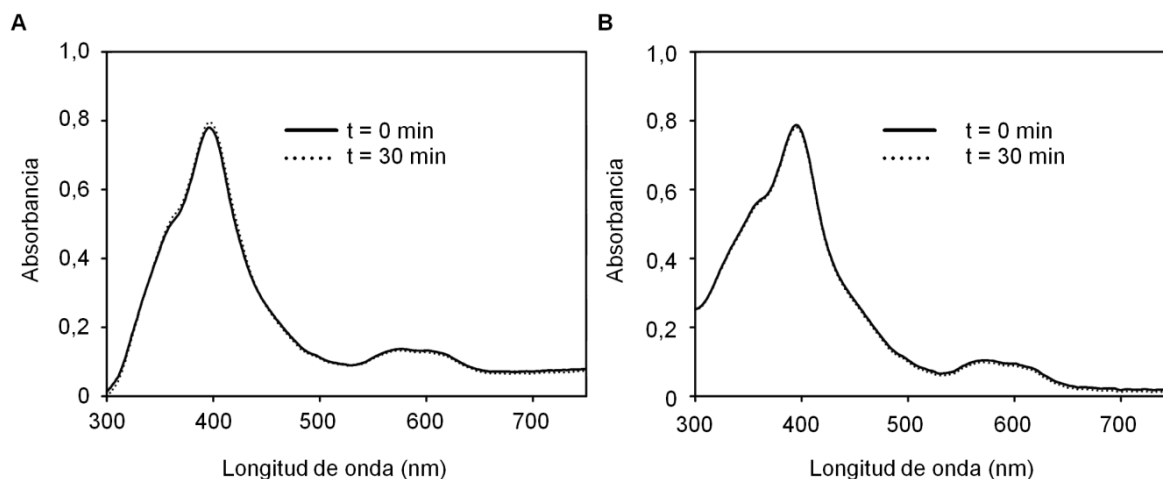
Los resultados hasta aquí presentados no muestran una diferencia significativa en el crecimiento y en el contenido de hemo intracelular cuando los epimastigotes se mantuvieron en medio de cultivo suplementado con hemina 5 y 20  $\mu\text{M}$ . Solo cuando fueron expuestos a crecer en medio con 20  $\mu\text{M}$  hemina posterior a un hambreado de hemina se observó un primer efecto negativo que luego se revirtió. Por otro lado la inspección visual reveló que los parásitos mantenidos a 5  $\mu\text{M}$  hemina mostraban una morfología más conservada. El análisis en conjunto de estas evidencias nos permite recomendar adaptar la preparación de los medios de cultivo para epimastigotes de manera de reducir la cantidad de hemina agregada, en base a nuestra experiencia sugerimos utilizar 5  $\mu\text{M}$  hemina.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que los epimastigotes de *T. cruzi* tomarían mayor cantidad de hemo que el necesario para sus funciones celulares normales, pudiendo almacenar ciertas cantidades de este cofactor. Esto le permitiría sobrevivir en condiciones de muy baja disponibilidad de hemo. Del mismo análisis surge que no pueden incorporar hemo indefinidamente, el exceso de disponibilidad de hemo en el medio resultó tóxico, como se evidenció ante el agregado de 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  hemina. Por último, podemos especular que los epimastigotes luego de crecer en condiciones de baja hemina, incrementarían el sistema de transporte de hemo para sobrevivir en esas condiciones; y ante un aumento repentino de la concentración de hemina, se produciría una incorporación de hemina mayor a la tolerable (tabla 4). Estas condiciones resultan entonces interesantes para futuros estudios de proteómica con el objetivo de identificar posibles proteínas transportadoras que aumenten su expresión con la disminución de hemina del medio.

### **III.1.2. Ensayos de degradación de hemo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Con el objetivo de estudiar los mecanismos que utilizan los epimastigotes de *T. cruzi* para regular su contenido de hemo intracelular y la causa por la cual son capaces de tolerar una alta concentración de hemina en el medio en alguna situación (medio suplementado con 50  $\mu\text{M}$  hemina sin renovación periódica), se realizaron ensayos que permitieron discernir si hay degradación de hemo y actividad tipo hemooxigenasa. Las hemooxigenasas (HO), como se detalló en la sección I.1.4, son enzimas generalmente asociadas a membrana que catalizan la degradación de hemo a biliverdina IX $\alpha$  pasando por distintos intermediarios, entre ellos el verdohemo. La biliverdina IX $\alpha$  es luego reducida a bilirrubina IX $\alpha$  por la biliverdina reductasa, que es una enzima citosólica.

En primer lugar, utilizando las secuencias proteicas de distintas hemooxigenasas - AtHO-4 de *A. thaliana* (AAK63007.1), HO-1 de humanos (P09601.1), HMX-1 de levadura (YLR205c) y HmuO de *Corynebacterium diphtheriae* (P71119.2) - se buscó en el genoma de *T. cruzi* secuencias que codifiquen para proteínas con homología a estas y además que mostraran alguna de las características de las hemooxigenasas descritas (sección I.1.4). Sin embargo, no identificamos secuencias que cumplan con estos requisitos. Debido a que las HO presentan baja similitud de secuencia entre ellas, no podemos descartar la existencia de alguna enzima con esta actividad en el parásito; por esta razón decidimos ensayar la actividad hemooxigenasa en extractos totales de epimastigotes. Los ensayos de actividad de hemooxigenasas reportados en la literatura son bastante variables (Kim *et al.*, 2006; Okada, 2009; Protchenko y Philpott, 2003), pero en general consisten en utilizar extractos celulares totales o la propia enzima purificada, agregar hemina, alguna fuente de poder reductor (ascorbato o NADPH) y algunos detergentes o quelantes. La reacción se sigue por medidas de absorbancia o fluorescencia viendo la desaparición de hemo o formación de los productos. Con estos antecedentes, se ensayó la degradación de hemo utilizando extractos celulares totales de epimastigotes siguiendo el protocolo descrito por Srivastava y colaboradores para determinar la actividad hemooxigenasa en extractos de *Leishmania donovani* (Srivastava *et al.*, 1997). Este utiliza el agregado de NADP<sup>+</sup> y glucosa-6P para generar el NADPH, que luego es utilizado por la hemooxigenasa para catalizar la reacción de degradación de hemo (sección II.5.4 de Materiales y Métodos). En nuestro ensayo seguimos la variación de la concentración de hemo por espectroscopia de absorción UV-Vis. El espectro de absorción del hemo presenta una banda intensa alrededor de 400 - 410 nm denominada banda de *Soret*, además de otras situadas a menor energía (mayor longitud de onda) cuyas posiciones son características de los distintos tipos de hemo. En la figura 24.A se muestran el registro a distintos tiempos de los espectros de una solución de hemina 18 µM que fue incubada con extractos celulares totales de epimastigotes cepa Dm28c a 30 °C. Al cabo de 30 min no se observó disminución de la banda de *Soret* a 400 - 410 nm ni aparición de una banda a 680 nm debido a producción de biliverdina. El mismo ensayo se repitió a temperatura ambiente y a 37 °C, y al cabo de una hora de incubación no se observaron cambios en los espectros. Por otro lado también se repitió el mismo ensayo (a temperatura ambiente, 30 °C y 37 °C) utilizando extractos celulares totales de epimastigotes de la cepa CL Brener y tampoco se observaron cambios en los espectros registrados.



**Figura 24. El hemo en solución resultó estable frente al tratamiento con extractos celulares de epimastigotes.** A) Espectros de absorbancia de una solución 18  $\mu$ M hemina en buffer K con 1,4 mM  $\text{NADP}^+$ , 4 mM glucosa-6P, 6,6 mM  $\text{MgCl}_2$  incubada con extractos celulares totales de  $20 \times 10^6$  epimastigotes de la cepa Dm28c a 30 °C. B) Control, sin el agregado de extractos de epimastigotes.

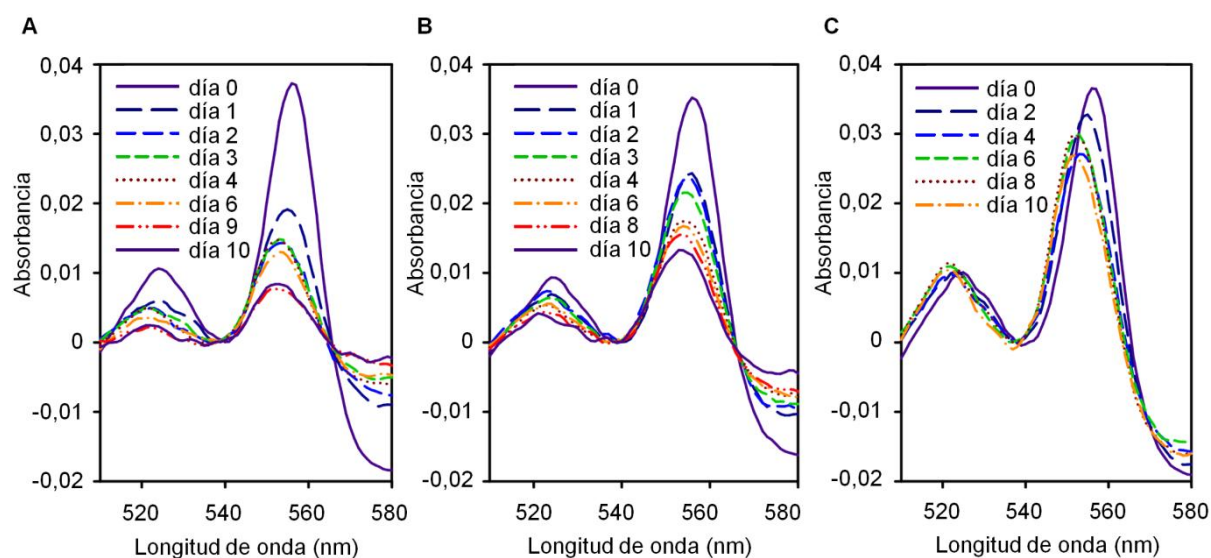
En resumen, utilizando condiciones de ensayos similares a las empleadas para evaluar la actividad hemoxygenasa en extractos de promastigotes de *Leishmania donovani*, no se observó variación en la concentración de hemo cuando utilizamos nuestros extractos de epimastigotes de *T. cruzi*. Esto sugiere que *T. cruzi* no tendría la capacidad de degradar hemo utilizando enzimas del tipo hemoxygenasas. Igualmente no se puede descartar que este organismo presente actividad hemoxygenasa en epimastigotes o en otros estadios, tal vez esta actividad dependa de otros cofactores o condiciones que pueden haberse perdido durante la preparación de los extractos. En ensayos *in vitro* realizados por Liu y Ortiz de Montellano se determinó que la liberación de la biliverdina desde la hemoxygenasa HO-1 humana es el paso limitante de la reacción y esto es favorecido por una interacción alostérica entre la hemoxygenasa y la biliverdina reductasa (Liu y Ortiz de Montellano, 2000). De ser necesaria este tipo de interacción entre las proteínas de *T. cruzi* para que la actividad HO sea apreciable, deberíamos asegurarnos que no se vea afectada durante la preparación de nuestros extractos.

Con el fin de evaluar si el parásito posee la capacidad de metabolizar la hemina del medio de cultivo, se determinó la variación del contenido de hemo en cultivos de epimastigotes durante su crecimiento. Las determinaciones (medidas de absorbancia por el método de la piridina básica, sección II.5.1) se realizaron a partir de muestras de medio de cultivo sin separar los parásitos del medio. De esta manera, procesando los parásitos enteros, se independiza de la necesidad de agregar los cofactores o el medio adecuado para

poder monitorear la reacción. Entonces, las muestras de epimastigotes mantenidos en LIT 10% SFB sin hemina fueron colectadas, lavadas y resuspendidas en PBS con 10  $\mu$ M hemina y 20 mM glucosa (sección II.5.5 de Materiales y Métodos). Como se mostró en la tabla 4, los parásitos en esas condiciones (15 días de hambreado de hemina) no aportan cantidades detectables de hemo determinadas por el método de la piridina básica, entonces podemos suponer que la cantidad inicial de hemo de la solución será 10  $\mu$ M (el agregado). Como se observa a partir de los datos presentados en la figura 25.A, la cantidad de hemo de la mezcla total (incluidos los parásitos) disminuyó un 79% como resultado de incubar  $10 \times 10^6$  parásitos/ml durante 10 días en PBS conteniendo 10  $\mu$ M de hemina y glucosa. En estas condiciones la mayor disminución ocurrió los primeros días, siendo de aproximadamente del 49% el primer día y aproximadamente de 61% para el segundo día. También se incubó la misma cantidad de parásitos en PBS con 10  $\mu$ M de hemina sin el agregado de glucosa y se registró la variación de la concentración de hemo total, que se muestra en la figura 25.B. En estas condiciones observamos un comportamiento similar, pero la magnitud de la disminución fue menor – disminuyó 32% el primer día y se llegó hasta una disminución total de 64% al día 10. Como control se mantuvo la solución de 10  $\mu$ M de hemina en PBS con glucosa sin el agregado de parásitos durante 10 días, observándose una caída del 25% al cabo de 10 días (figura 25.C). Como queda mostrado a partir de este control, existe una disminución en la concentración de hemina en el medio (PBS + glucosa), sin embargo la disminución es constante durante el tiempo que llevó el ensayo y menor a la observada en las muestras que contenían epimastigotes. Por otro lado en ninguna condición ensayada se observó la aparición de un pico de absorción a 680 nm debido a la formación del complejo verdohemo-piridina (dato no mostrado). Los cultivos en las distintas condiciones también fueron analizados por medidas de UV-VIS (sin el tratamiento con piridina) y no se observó la aparición de un pico de absorbancia a 680 nm correspondiente a la acumulación de biliverdina.

Sumado a estas cuantificaciones, realizamos una inspección ocular del estado de los epimastigotes a lo largo del ensayo (por microscopía óptica) y observamos que los epimastigotes incubados en PBS más glucosa se mantenían móviles hasta el día 4 y mientras que los incubados en PBS sin glucosa lo hicieron solo durante el día 1. Esta observación nos permite postular que la presencia de epimastigotes móviles (vital) concuerda en mayor medida con la mayor disminución del contenido de hemo. En resumen, aunque no pudimos

verificar que *T. cruzi* presente la actividad hemooxigenasa, nuestros resultados permiten proponer que este parásito es capaz de degradar el hemo presente en el medio por algún mecanismo - enzimático o no - y posiblemente este forme parte del mecanismo de adaptación a la variabilidad en la disponibilidad de hemo del medio o también intervenga en la regulación del contenido intracelular del cofactor (figura 21 y 22).



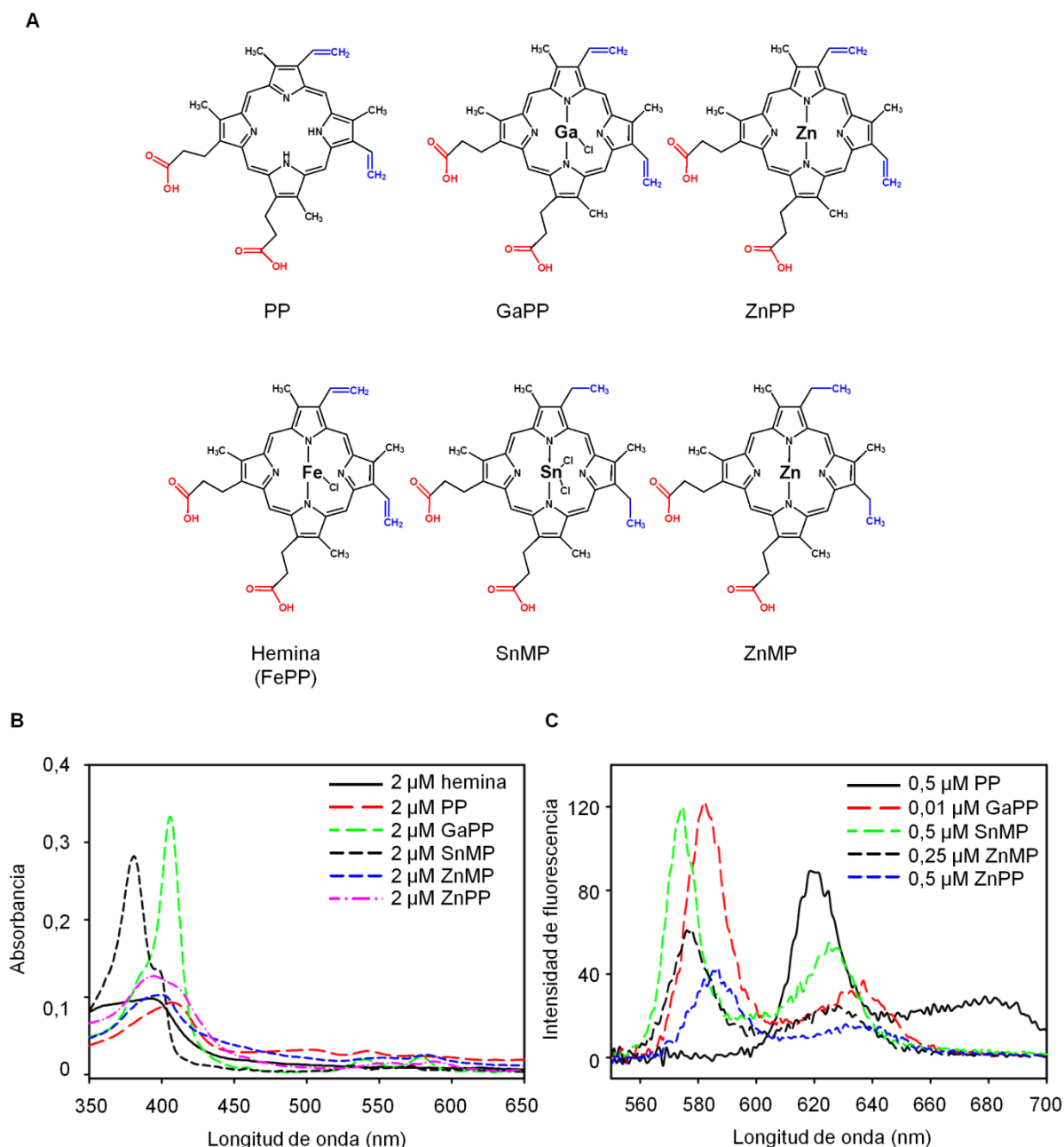
**Figura 25. La concentración de hemina del medio de cultivo disminuye en presencia de epimastigotes.** A) Espectros de absorbancia por el método de la piridina básica de una solución de 10  $\mu$ M hemina en PBS y 20 mM glucosa incubada con una suspensión de epimastigotes cepa Dm28c ( $10 \times 10^6$  células/ml) durante 10 días a 28 °C. B) Control sin glucosa. C) Control sin células.

Además de la actividad hemooxigenasa, se ha reportado en bacterias la degradación de hemo por hemooxigenasas no canónicas que poseen estructuras distintas a las hemooxigenasas y en algunos casos tampoco producen los mismos productos de degradación (ver sección I.1.4 y figura 5). Si bien no puede descartarse la presencia de alguna hemooxigenasa no canónica en *T. cruzi*, no encontramos en su genoma (ni de otro tripanosomátido) la presencia de alguna ortóloga a las reportadas en bacterias: IsdG de *B. anthracis* (AAP28473.1), IsdG y IsdI de *S. aureus* (CXM12593.1 y WP\_000670945.1), MhuD de *M. tuberculosis* (AFN51611.1), YfeX y EfeB de *E. coli* (AAC75484.2 y AAC74104.1).

### **III.1.3. Transporte de análogos de hemo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y análisis del efecto que producen sobre su crecimiento**

En la siguiente sección se discutirán los efectos observados en el crecimiento de epimastigotes y en el transporte de hemo cuando se trataron las células con los siguientes análogos fluorescentes de hemo (AHs): Ga(III)protoporfirina IX (GaPP), Zn(II)protoporfirina IX (ZnPP), Sn(IV)mesoporfirina IX (SnMP) y Zn(II)mesoporfirina IX (ZnMP). Estos compuestos mimetizan al grupo hemo en estructura como se muestra en la figura 26. Tienen un espectro de absorción similar al del grupo hemo: un máximo alrededor de los 405 nm (correspondiente a la banda de *Soret*) y otros dos picos de menor intensidad a 530 y 570 nm, pero a diferencia del hemo estos son compuestos fluorescentes, teniendo dos máximos de emisión alrededor de los 580 nm y a 630 nm cuando se los excita a 405 nm (figura 26). También se incluyó en estos ensayos a la protoporfirina IX (PP) que es el último precursor en la ruta de síntesis del hemo (figura 2 de Introducción). La PP tiene su máximo de absorción alrededor de 405 nm y es fluorescente pero los dos máximos de emisión están corridos a mayores longitudes de onda respecto a los máximos de los AHs: a 620 y 680 nm.

Para estudiar el transporte de hemo en epimastigote seguimos dos estrategias generales donde analizamos la fluorescencia de parásitos tratados con los diferentes AHs. En una de ellas se realizaron mediciones directas de la fluorescencia en extractos celulares totales como se describe en la sección II.4.5 de Materiales y Métodos y en la otra se analizaron las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia como se detalla en la sección II.9.1. Las mediciones directas de la fluorescencia sobre los extractos celulares se realizaron en un espectrofluorómetro donde se registraron los valores de intensidad de fluorescencia (IF) en los máximos de emisión de cada compuesto (583 nm para el GaPP, 578 nm para el ZnMP, 588 nm para el ZnPP y 574 nm para el SnMP) cuando las muestras se excitaron a 405 nm. Para coleccionar las imágenes de microscopía confocal, las muestras fueron excitadas a 405 nm y la señal de fluorescencia roja registrada con el uso del filtro correspondiente (605 - 675 nm), que comprende el rango de emisión de los picos de menor IF, excepto para la PP cuyo máximo de emisión está incluido en el rango de trabajo del filtro.



**Figura 26. Análogos fluorescentes de hemo.** A) 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). B) Espectros de absorción. C) Espectros de emisión de fluorescencia excitando a 405 nm. Los espectros fueron registrados sobre una dilución de la solución de trabajo (1 mM en 0,01 M NaOH) en 2 ml de PBS.

### III.1.3.1. Análisis de la incorporación de protoporfirina IX en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

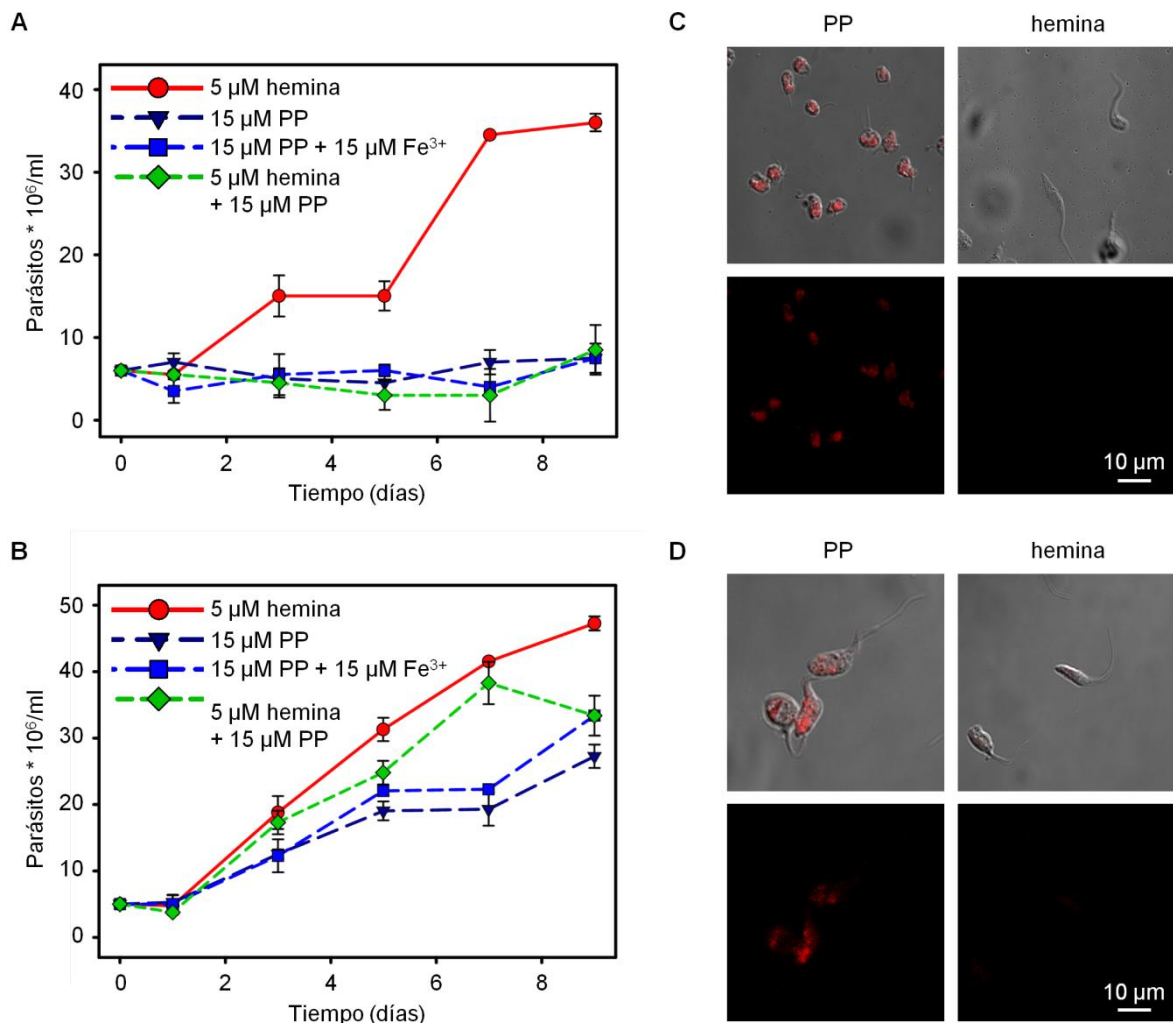
Como se mencionó en la sección I.4, no se han encontrado en el genoma de *T. cruzi* las enzimas responsables de la biosíntesis de hemo. Sin embargo hay trabajos controversiales donde se reportaron las actividades de la ALAS y la FeCH, la primera y última

enzima de la vía (Lombardo *et al.*, 2003; Salzman y Batlle, 1986; Salzman *et al.*, 1986; Salzman *et al.*, 1982). Teniendo en cuenta que la PP es el último precursor en la ruta de biosíntesis de hemo, se decidió ensayar si este podía ser incorporado por epimastigotes y luego convertido en hemo por la acción de la FeCH. Estudios utilizando levaduras *hem1Δ*, cepa *knockout* para la primer enzima de la síntesis de hemo, la ALAS, mostraron que las mismas crecen con el agregado de PP ya que tienen FeCH y sintetizan hemo a partir de PP si hay hierro disponible en el medio (Protchenko *et al.*, 2008). Incluso estos ensayos han sido reproducidos con éxito en nuestro laboratorio utilizando la cepa de *S. cerevisiae hem1Δ* (generosamente cedida por el laboratorio del profesor Dennis R. Winge de la Universidad de Utah, EE.UU.) y la PP preparada como se detalla en sección II.4.2 de Materiales y Métodos. El grupo de Kwang-Poo Chang llevó adelante un ensayo similar utilizando promastigotes de *L. amazonensis*, y reportaron que fueron capaces de mantener su crecimiento cuando el medio de cultivo fue suplementado tanto con el agregado de hemina como de PP ya que este tripanosomátido cuenta con las últimas 3 enzimas de la vía de síntesis de hemo (Sah *et al.*, 2002).

Para evaluar si *T. cruzi* presentaba una actividad tipo FeCH, se tomaron epimastigotes mantenidos en medio LIT 10% SFB con 20 μM hemina y se los enfrentó a crecer en el mismo medio pero suplementado con PP (sección II.4.3 de Materiales y Métodos). En el apartado III.1.1 se muestra que los epimastigotes de ambas cepas estudiadas en este trabajo de Tesis presentan patrones de crecimiento similares cuando son desafiados a crecer en medios suplementados con concentraciones de hemina entre 5 y 20 μM. Por ello en todos los ensayos donde evaluaremos el efecto de la PP y los AHs sobre el crecimiento de los parásitos trabajamos en este rango de concentraciones, para evitar sumar los efectos citotóxicos que producen este tipo de compuestos cuando están presentes a altas concentraciones.

Los datos experimentales de la evaluación del efecto de la PP en el crecimiento de epimastigotes se muestran en las figuras 27.A y B, evidenciando que la PP agregada al medio de cultivo no pudo ser aprovechada como precursor de hemo por los epimastigotes de ninguna de las cepas ensayadas, alterando negativamente el patrón de crecimiento. El agregado de hierro (Fe<sup>3+</sup>) a los medios suplementados con PP no provocó una reversión del efecto negativo, por lo que podemos postular que en *T. cruzi* no existiría una actividad tipo FeCH capaz de catalizar con eficiencia la formación de hemo a partir de PP y hierro. La cepa Dm28c resultó más tolerante al agregado de PP ya que se observó crecimiento débil en los

medios suplementados con PP, siempre menor que el que presenta el control (figura 27.B). Las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia muestran una señal de fluorescencia roja en el interior celular que indica que los parásitos fueron capaces de incorporar este compuesto (figura 27.D). Distinta fue la tolerancia mostrada por los epimastigotes CL Brener (figura 27.A) ya que el agregado de PP al medio de cultivo resultó letal, aún en presencia de 5  $\mu\text{M}$  hemina. También confirmamos la presencia de PP por microscopía confocal (figura 27.C), donde además observamos una morfología alterada de estos epimastigotes (sección II.9.1 de Materiales y Métodos).



**Figura 27. La protoporfirina IX suministrada en el medio de cultivo no es utilizada por los epimastigotes como precursor para sintetizar hemo.** Curvas de crecimiento de epimastigotes cepas CL Brener (A) y Dm28c (B) en medio LIT 10% SFB con el agregado de 5  $\mu\text{M}$  de hemina, 15  $\mu\text{M}$  PP y/o de 15  $\mu\text{M}$  FeCl<sub>3</sub>. Durante 8 días se monitoreó el crecimiento mediante el recuento de células sin realizar diluciones. Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de dos réplicas independientes de cada condición ensayada. Las imágenes de microscopía confocal corresponden a muestras tomadas al día 3 de la curva para CL Brener (C) y Dm28c (D). Las imágenes son representativas de diferentes campos tomados de al menos tres experimentos independientes.

En resumen, los resultados presentados en esta sección confirman que *T. cruzi* carecería de la capacidad de sintetizar hemo a partir de PP y Fe<sup>3+</sup> y que distintas cepas mostrarían diferentes tolerancia hacia la PP.

### **III.1.3.2. Efecto de la presencia de los análogos de hemo en el medio de cultivo sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

En una primera aproximación para evaluar el transporte de hemo en epimastigotes de *T. cruzi*, analizamos la incorporación de AHs fluorescentes mediante medidas de fluorescencia (por microscopía confocal o por fluorescencia directa a partir de extractos celulares totales) cuando los epimastigotes fueron desafiados a crecer en un medio de cultivo LIT 10% SFB conteniendo hemina y los distintos AHs. Los estudios reportados por el grupo de la Dra. Marcia Paes mostraron que algunos AHs afectaron el crecimiento de los epimastigotes cuando la hemina era reemplazada en el medio de cultivo por estos compuestos (Nogueira *et al.*, 2011), o bien en presencia de concentraciones de hemina elevadas además de los análogos (concentraciones finales de porfirinas de 60 a 130 µM) (Cupello *et al.*, 2011); pero según nuestros ensayos estas últimas condiciones mostraron no ser apropiadas para el crecimiento de epimastigotes. Teniendo en cuenta los resultados presentados en el apartado III.1.1, se decidió trabajar en el rango de 5 a 20 µM para la concentración total de porfirinas (hemina más AHs) ya que permite un crecimiento comparable sin causar efecto citotóxico. Los epimastigotes de las cepas CL Brener y Dm28c mantenidos en medio LIT 10% SFB con 20 µM hemina fueron transferidos a LIT 10% SFB con 5 µM hemina y el agregado de 15 µM de AHs (completando así una concentración de 20 µM final de porfirinas). El ensayo se realizó con ZnPP, ZnMP, GaPP y SnMP como se describe en la sección II.4.3 de Materiales y Métodos. Se siguió el crecimiento de los cultivos y se realizaron diluciones periódicas de manera de mantener constante las concentraciones de hemina y de los AHs en el medio.

En la figura 28.A se muestra el comportamiento de los epimastigotes de CL Brener en presencia de los distintos AHs, donde se observa que el agregado de SnMP o GaPP (15 µM) en presencia de 5 µM hemina no alteró el patrón de crecimiento mientras que la presencia de ZnMP (15 µM) causó un efecto moderadamente negativo y la presencia de ZnPP (15 µM) causó un efecto drástico. Para tratar de comprender a qué se debía la diferencia en el fenotipo causada por los distintos AHs, se tomaron muestras al día 3 de la curva de

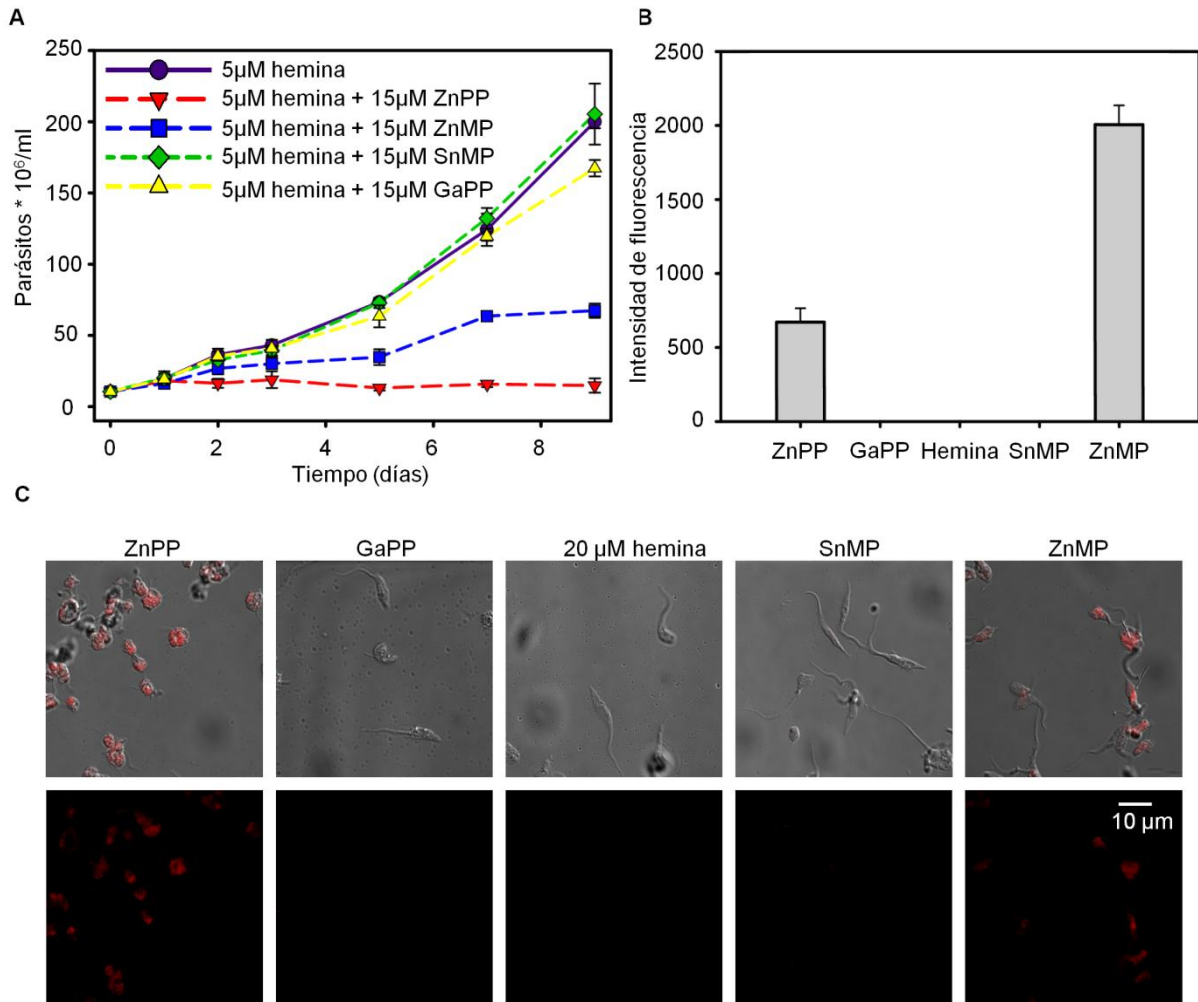
crecimiento y se analizó la incorporación de estos compuestos por medidas de fluorescencia directa a partir de extractos celulares totales (figura 28.B) y por microscopía confocal (figura 28.C) (secciones II.4.5 y II.9.1 de Materiales y Métodos). En ambos casos observamos que en los parásitos crecidos en presencia de GaPP y SnMP no se detectó señal de fluorescencia mientras que los tratados con ZnMP y ZnPP mostraron la señal de fluorescencia correspondiente a los AHs. Además las imágenes de los epimastigotes crecidos en presencia de ZnPP y en menor grado ZnMP mostraron marcados cambios en la morfología celular. Estos resultados sugieren que la diferencia de fenotipo observado debido a la presencia de los distintos AHs se debería, al menos en parte, a la capacidad del parásito de internalizarlos. Es decir, los AHs que son incorporados pueden causar un efecto tóxico en los epimastigotes. También estos resultados sugieren que el sistema de transporte de hemo de *T. cruzi* tendría la capacidad de discriminar entre compuestos de estructuras similares.

En la figura 29 se muestran los resultados de ensayos similares realizados con epimastigotes de la cepa Dm28c. Como lo observado con CL Brener, los epimastigotes Dm28c fueron insensibles a SnMP y sensibles a la presencia de ZnPP. Pero a diferencia de lo observado con CL Brener, la presencia de ZnMP causó un efecto severamente negativo y sorprendentemente la presencia de GaPP afectó drásticamente su crecimiento (figura 29.A). Cuando se analizó la incorporación de los AHs (figura 29.B y C), se observó señal fluorescente en las muestras provenientes de los cultivos cuyo crecimiento fue alterado por la presencia de estos compuestos; en este caso ZnPP, ZnMP y GaPP resultaron positivos mientras que no se observó señal debido a SnMP.

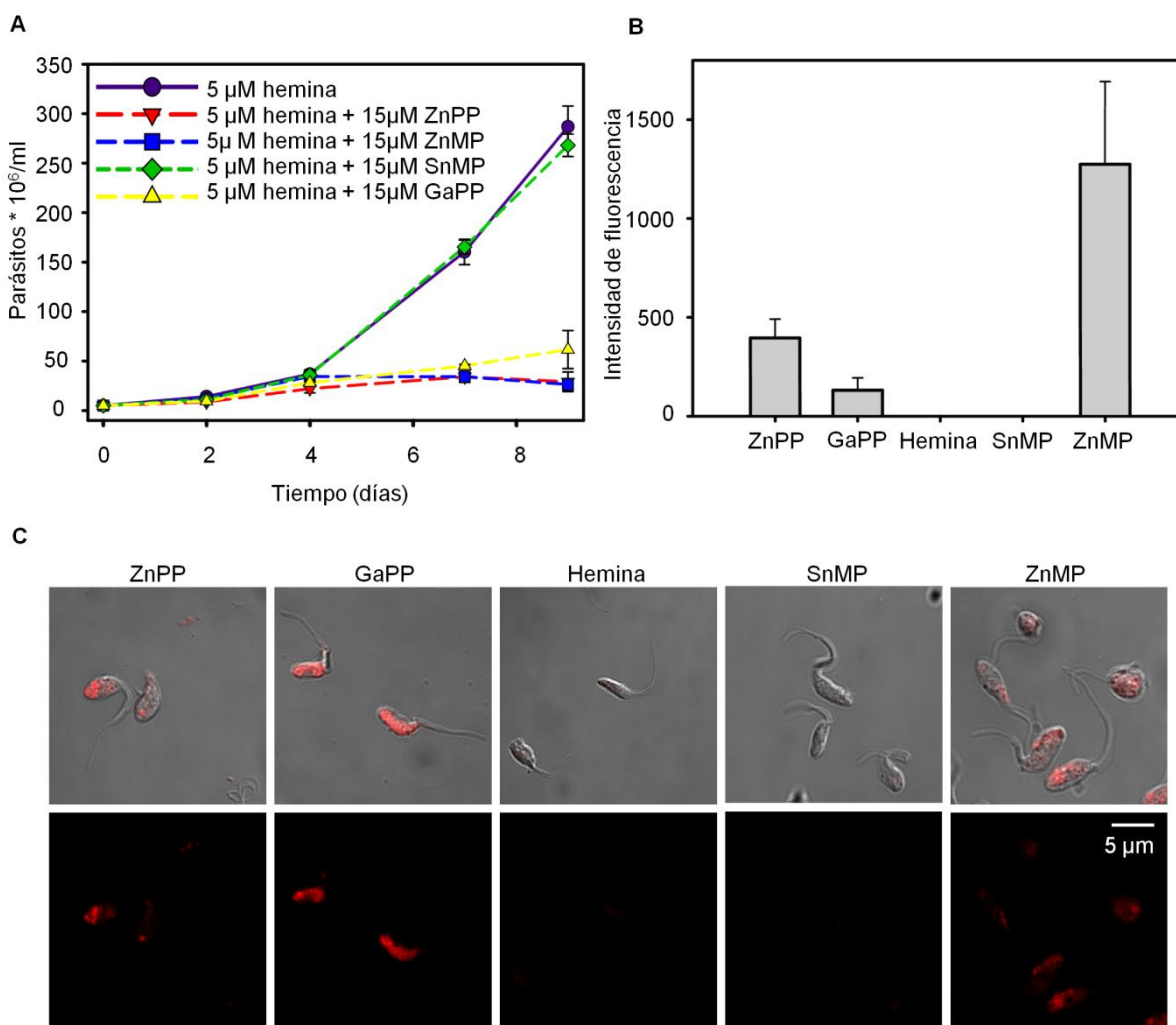
En resumen, los resultados presentados en esta sección muestran que en ambas cepas sólo los AHs que fueron incorporados afectaron negativamente el crecimiento de los epimastigotes, que el sistema de transporte de hemo sería selectivo pudiendo discriminar entre compuestos de estructura similar. Esto apoya la hipótesis donde se propone que el transporte de hemo estaría mediado por un complejo proteico especializado y probablemente su selectividad sería diferente en las distintas cepas ensayadas.

En estudios anteriores se determinó que los AHs causaban un efecto negativo sobre el crecimiento de epimastigotes ya sea reemplazando la hemina por AHs o en presencia de hemina y de los AHs (Cupello *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2011), estos ensayos se realizaron en rangos de concentraciones de porfirinas que son elevados y mostraron ser tóxicos para el parásito (sección III.1.1). En nuestros ensayos tuvimos especial cuidado en el rango de

concentraciones de trabajo de manera de evitar este tipo de efectos. Y son estos los primeros en verificar que el efecto tóxico causado por los AHs se debe a la incorporación de los AHs al interior celular de los epimastigotes.



**Figura 28.** La presencia de AHs en el medio afecta el crecimiento de epimastigotes CL Brener. Curvas de crecimiento de epimastigotes cepas CL Brener en medio LIT 10% SFB con el agregado de 5  $\mu$ M de hemina y/o de 15  $\mu$ M de un AH. Las células se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento por diluciones 1/2 cada 2 días. Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada (A). Medidas de IF en extractos celulares (B) y las imágenes de microscopía confocal (C) que corresponden muestras tomadas en el día 3 del cultivo. La señal de fluorescencia está expresada como el promedio  $\pm$  DS de dos réplicas independientes de cada condición ensayada, normalizada por la cantidad de parásitos y restado la señal correspondiente a las muestras tomadas el día 0 con el análogo correspondiente. Las imágenes de microscopía son representativas de diferentes campos tomados de al menos tres experimentos independientes.



**Figura 29. La presencia de AHs en el medio afecta el crecimiento de epimastigotes Dm28c.** Curvas de crecimiento de epimastigotes cepas Dm28c en medio LIT 10% SFB y con el agregado de 5  $\mu$ M de hemina y/o con 15  $\mu$ M de un AH de hemo. Las células se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento por diluciones 1/2 cada 2 días. Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada (A). Medidas de IF en extractos celulares totales (B) y las imágenes de microscopía confocal (C) que corresponden a muestras tomadas al día 3 del cultivo. La señal de fluorescencia está expresada como el promedio  $\pm$  DS de dos réplicas independientes de cada condición ensayada, normalizada por la cantidad de parásitos y restado la señal correspondiente a las muestras tomadas el día 0 con el AH correspondiente. Las imágenes de microscopía son representativas de diferentes campos tomados de al menos tres experimentos independientes.

### III.1.3.3. Transporte de análogos de hemo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con el objetivo de evaluar la incorporación intracelular de estos compuestos independizándonos del efecto que pudieran causar en el organismo y/o de la respuesta que pudieran activar, se realizaron ensayos de transporte incubando los epimastigotes durante tiempos cortos a alta concentración de los AHs. Para ello los epimastigotes de ambas cepas mantenidos en medio LIT 10% SFB con 20  $\mu$ M hemina fueron colectados, lavados e

incubados con 100  $\mu\text{M}$  de cada AH durante 5 minutos a 28 °C, condición que fue determinada previamente en el laboratorio como saturante para ZnMP, es decir que luego de 5 min de incubación no se observó aumento de señal fluorescente debido al ZnMP por determinaciones directa de la IF (los detalles de las condiciones experimentales se detallan en la sección II.4.4 de Materiales y Métodos). La incorporación de los análogos fluorescentes se detuvo por el agregado de una solución de hemina concentrada y fría, y luego durante todo el proceso de lavados, lisis y separación de fracción soluble de las muestras, estas se mantuvieron en hielo. Luego se realizaron las medidas de fluorescencia directa sobre los extractos totales y se normalizaron en función del número de parásitos procesados de manera de poder relacionar la IF medida en los extractos celulares totales solubles con el transporte intracelular del análogo fluorescente (sección II.4.5). Además, antes de proceder a efectuar la lisis y separación de fracción soluble, se separó una fracción para analizar la incorporación de los AHs mediante microscopía confocal como se detalla en la sección II.9.1 de Materiales y Métodos.

En la figura 30 se muestran los resultados de los ensayos realizados con epimastigotes de CL Brener. Sólo se observó señal fluorescente en las muestras incubadas con ZnPP y ZnMP (figura 30.A). Es importante recordar que en este caso no podemos utilizar las IF para comparar la incorporación de los distintos AHs ya que estos compuestos no poseen igual eficiencia cuántica, sino que la detección de señal fluorescente nos permite confirmar su presencia en el interior celular. Por otro lado, las imágenes de microscopía confocal (figura 30.B) corroboraron el resultado obtenido por medidas de IF directa, sólo se observó señal fluorescente en los epimastigotes tratados con ZnPP y ZnMP. Para evaluar si el tratamiento con concentraciones elevadas de AHs y luego hemina en frío afectaba la viabilidad de los epimastigotes, se separó en esterilidad una fracción de los epimastigotes tratados y se los incubó durante una semana en medio LIT 10% SFB 20  $\mu\text{M}$  de hemina que se muestra en la figura 30.C. En la misma puede observarse que el tratamiento de 5 minutos con 100  $\mu\text{M}$  de AHs, su posterior incubación con hemina en fría y lavados no afectó significativamente la viabilidad de los epimastigotes.

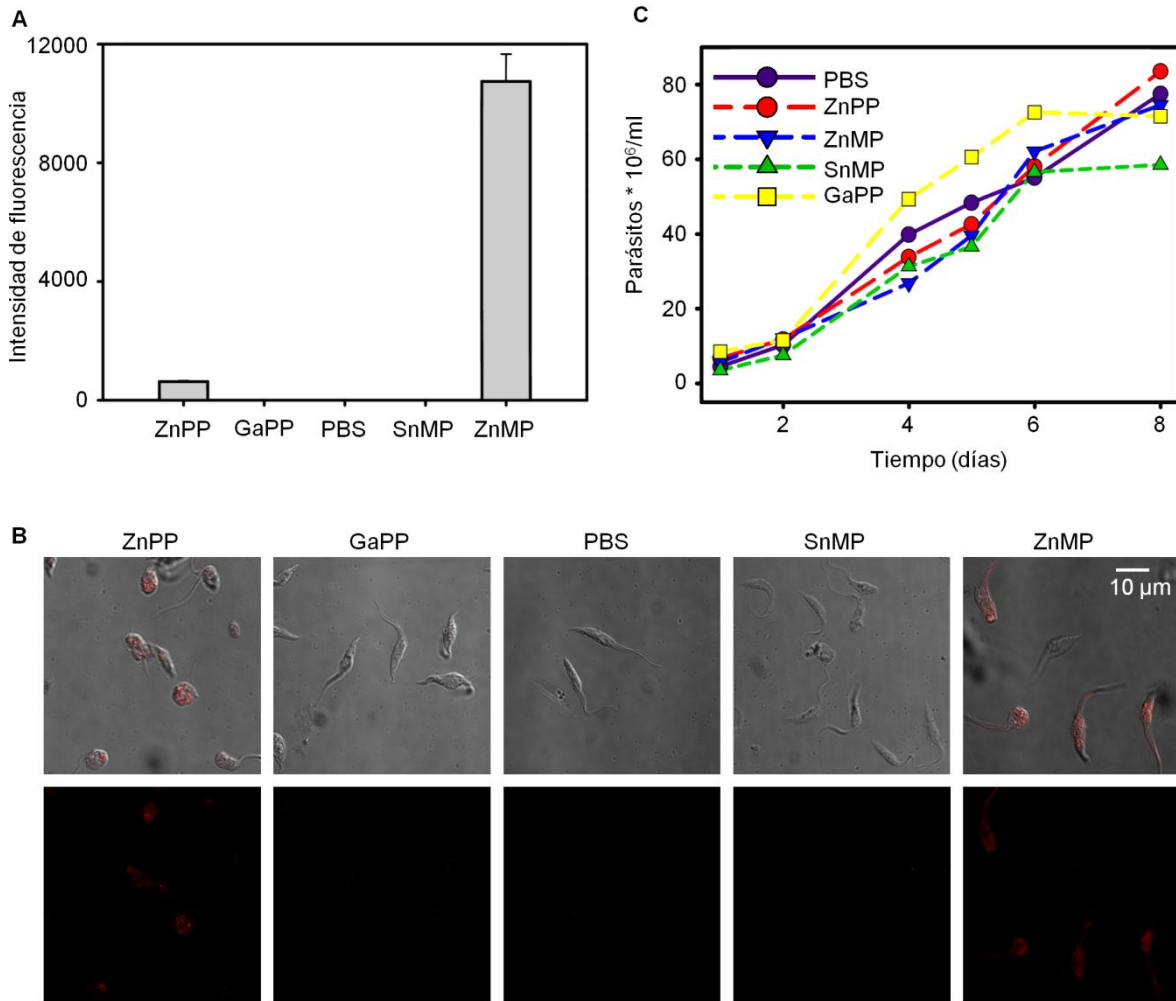
Ensayos similares se realizaron con epimastigotes de la cepa Dm28c y los resultados se muestran en la figura 31. Las determinaciones de IF muestran una señal intensa para los epimastigotes tratados con ZnMP y ZnPP y una señal muy débil para los tratados con GaPP. Esto sugiere que los tres AHs fueron incorporados durante el ensayo, mientras que no se

observa señal a partir de las muestras que fueron tratadas con SnMP (figura 31.A). Las imágenes de microscopía confocal permiten confirmar la incorporación de los análogos ZnPP y ZnMP, sin embargo no pudimos detectar señal fluorescente en los epimastigotes tratados con GaPP (figura 31.B). Tampoco se observó señal fluorescente debido a SnMP, como se esperaba de acuerdo a todos los resultados previos. También se realizaron los controles de viabilidad posterior a la incubación con los AHs y se muestran en la figura 31.C, observándose que los epimastigotes tratados con ZnPP y GaPP mostraron una recuperación más lenta.

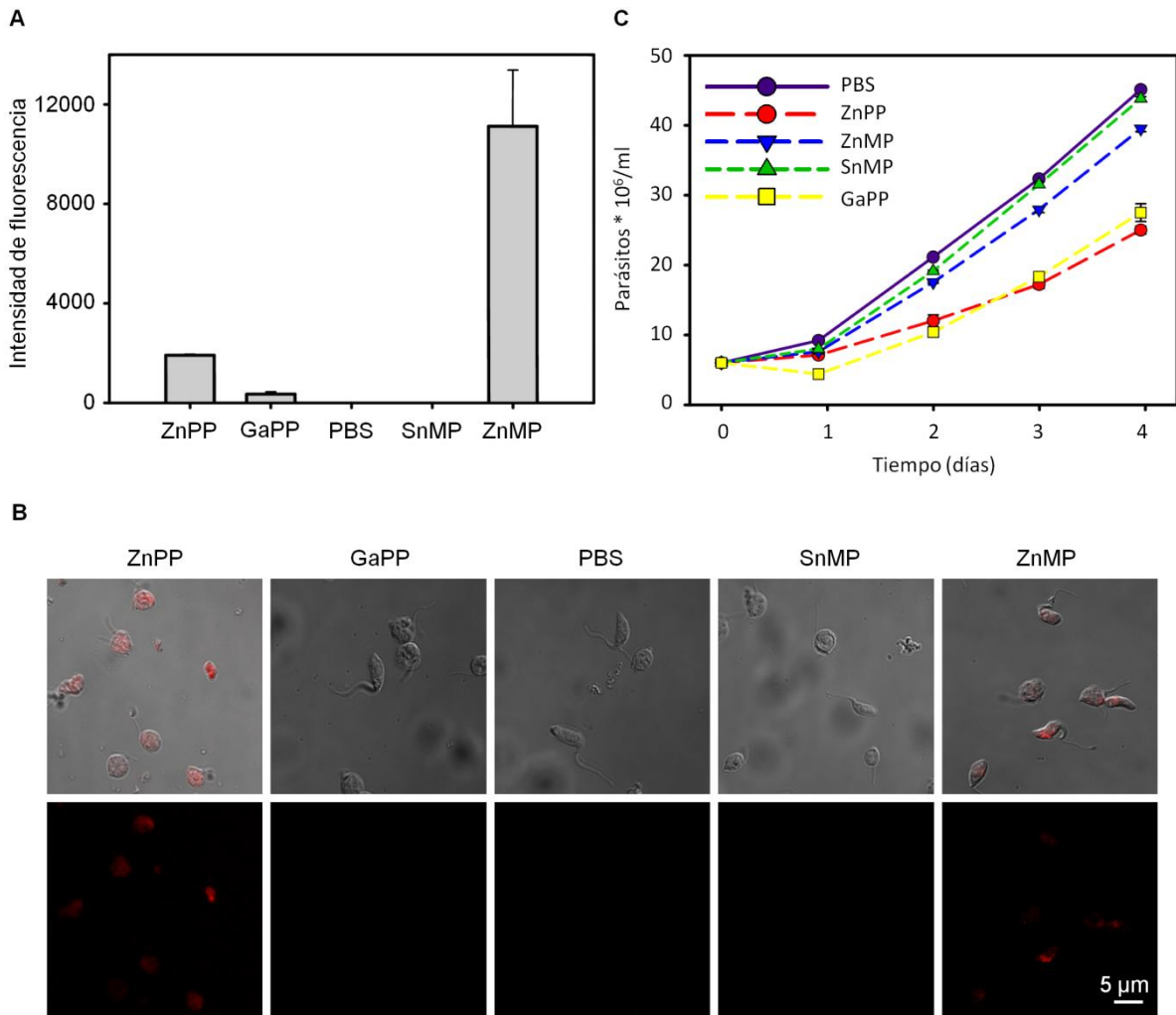
En resumen, los ensayos de transporte corroboran los resultados obtenidos a partir del seguimiento del crecimiento de epimastigotes en medio suplementado con los distintos AHs. Es decir, no se observó incorporación de SnMP por los epimastigotes de ambas cepas y si se observó señal fluorescente a partir del tratamiento con ZnPP y ZnMP en ambas cepas estudiadas, Dm28c (TcI) y CL Brener (TcVI). En los ensayos realizados con epimastigotes de la cepa CL Brener no se observó señal fluorescente debido al tratamiento con GaPP mientras que en la cepa Dm28c solo se detectó una señal muy débil en las medidas de IF directa y no en las imágenes de microscopía de fluorescencia. Esto nos permite postular que a diferencia de la cepa CL Brener, la cepa Dm28c es capaz de transportar al análogo fluorescente GaPP al interior celular pero tal vez en menor medida que los análogos ZnPP y ZnMP (transportados por ambas cepas).

En conjunto estos resultados y los descritos en el apartado III.1.3.2 (curvas de crecimiento de epimastigotes en presencia de AHs) apoyan la hipótesis de que *T. cruzi* presentaría un sistema de transporte de hemo específico constituido probablemente por un complejo proteico y este podría diferenciar entre compuestos que presentan estructuras similares. Teniendo en cuenta las diferencias observadas entre las cepas de dos DTU diferentes (CL Brener y Dm28c), se podría postular que habría proteínas (transportadores o proteínas accesorias al transportador) presentes en alguna de ellas que serían las responsables de estas diferencias de especificidad, o bien que esto se deba a una diferencia en la expresión o acumulación de estas proteínas. Una explicación probable que justifique la discriminación entre los compuestos ensayados podría deberse a la carga del ión central (2+ para el Zn, 3+ para el Ga y 4+ para el Sn) y/o los contra-iones que se asocian a estos ya que todos tienen radios iónicos similares. En el caso de los complejos porfirínicos de Zn, que

fueron transportados por ambas cepas, estos no poseen carga neta a diferencia de los compuestos con Ga y Sn por lo que no se le asocian contra-iones (figura 26.A).



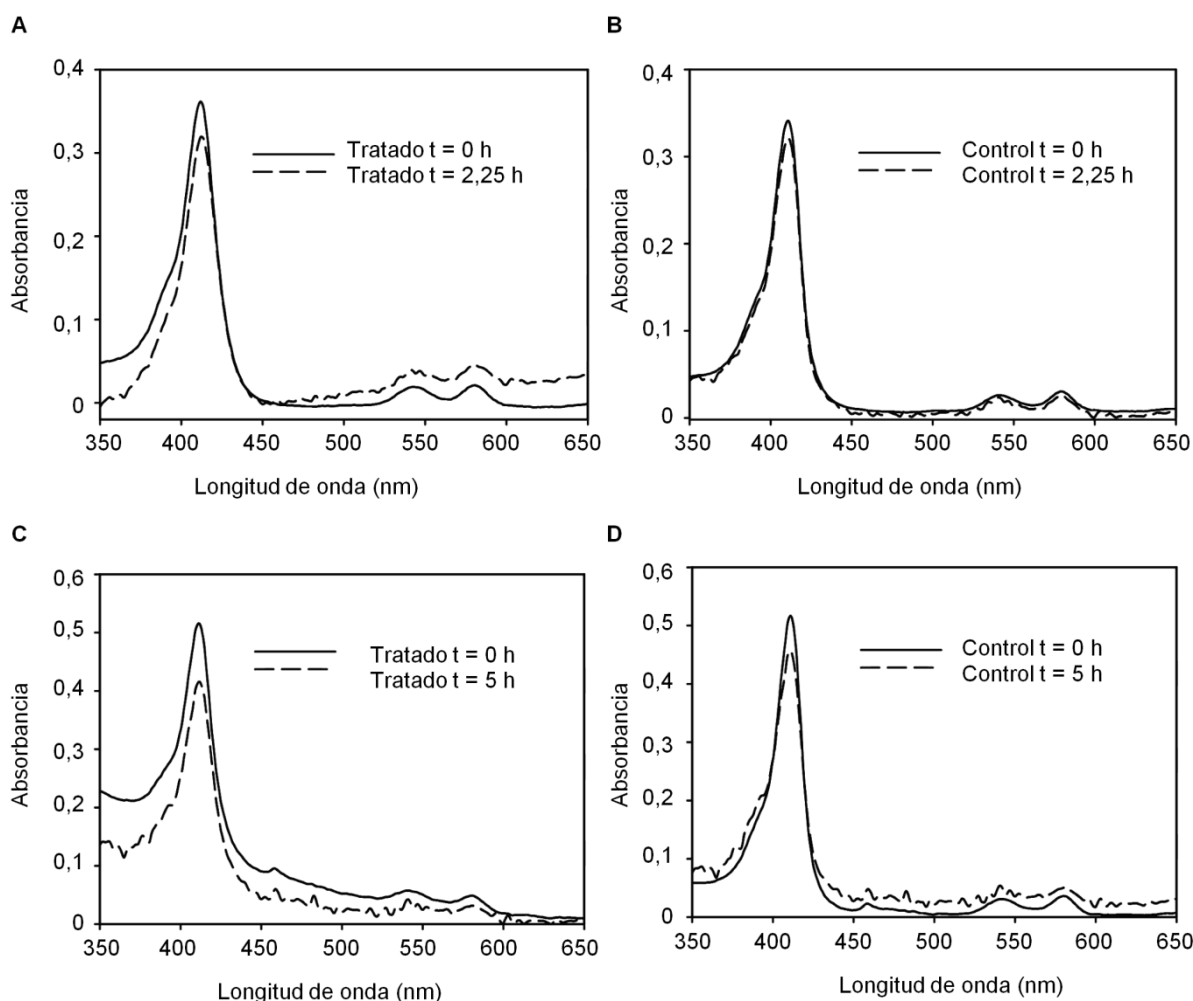
**Figura 30. Los análogos de hemo son incorporados selectivamente por epimastigotes de la cepa CL Brener.** Las medidas de IF determinadas en extractos celulares totales (A) y las imágenes de microscopía confocal (B) fueron obtenidas de epimastigotes de la cepa CL Brener incubados 5 min a 28 °C con 100  $\mu$ M de los diferentes AHs y un control con PBS. La señal de fluorescencia está expresada como el promedio  $\pm$  DS de dos réplicas independientes de cada condición ensayada, normalizada por la cantidad de parásitos y restado la señal correspondiente a las muestras incubadas a tiempo 0 min con el AH correspondiente. Las imágenes de microscopía son representativas de diferentes campos tomados de al menos tres experimentos independientes. Se tomó como señal cero a los parásitos incubados con los AHs a tiempo 0. Epimastigotes resuspendidos en medio LIT 10% SFB suplementado con 20  $\mu$ M de hemina luego del ensayo de transporte (C). Las células se mantuvieron sin realizar diluciones periódicas. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada.



**Figura 31. Los análogos de hemo son incorporados selectivamente por epimastigotes de la cepa Dm28c.** Las IF determinadas en extractos celulares totales (A) y las imágenes de microscopía confocal (B) fueron obtenidas de epimastigotes de la cepa Dm28c incubados 5 min a 28 °C con 100  $\mu\text{M}$  de los diferentes AHs y un control con PBS. La señal de fluorescencia está expresada como el promedio  $\pm$  DS de dos réplicas independientes de cada condición ensayada, normalizada por la cantidad de parásitos y restado la señal correspondiente a las muestras incubadas a tiempo 0 min con el AH correspondiente. Las imágenes de microscopía son representativas de diferentes campos tomados de al menos tres experimentos independientes. Se tomó como señal cero a los parásitos incubados con los AHs a tiempo 0. Epimastigotes resuspendidos en medio LIT 10% SFB suplementado con 20  $\mu\text{M}$  de hemina luego del ensayo de transporte (C). Las células se mantuvieron sin realizar diluciones periódicas. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada.

La señal fluorescente del GaPP detectada en epimastigotes de Dm28c es baja comparada a los otros compuestos fluorescentes (ver figura 26.C), lo que haría suponer que la concentración intracelular sería menor en este caso, pero aún así el efecto negativo causado sobre el crecimiento de los parásitos fue comparable al que ejercieron los otros compuestos. Esto concuerda con lo reportado por Rao y colaboradores donde se observó un efecto severo en el crecimiento de *C. elegans* cuando fueron incubados con una

concentración de solo 1  $\mu\text{M}$  GaPP en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de hemina. Además los controles reportados mostraron que el efecto negativo era producido por la presencia de GaPP y no por el ión  $\text{Ga}^{3+}$  que pudiera generarse o encontrarse como impureza en la solución (Rao *et al.*, 2005). En nuestros ensayos, la baja señal de fluorescencia detectada en epimastigotes Dm28c (y la ausencia de señal en CL Brener) podría deberse a diferentes factores como: la rápida degradación del GaPP una vez internalizado, una rápida detoxificación donde se expulsa al exterior el compuesto, o bien una incorporación poco eficiente al interior celular (o no ser incorporado en CL Brener). Considerando que los ensayos de transporte utilizan tiempos de incubación cortos (5 minutos), si hubiera algún mecanismo de degradación presente en la célula, este también debería actuar rápidamente. Para verificar una posible degradación del GaPP por algún mecanismo presente en el interior celular, se estudió la estabilidad del compuesto en presencia de extractos de epimastigotes de ambas cepas. Se prepararon extractos totales en buffer de lisis como se describe en la sección II.7.3 y se incubaron con 2,5  $\mu\text{M}$  GaPP. La estabilidad del GaPP se siguió registrando los espectros de absorbancia de la solución durante 1 - 5 h a 30 y 37 °C y no se observaron variaciones significativas entre las muestras incubadas con extractos de epimastigotes ( $50 \times 10^6$  células) y las utilizadas como control. También se ensayó la estabilidad del GaPP en presencia de extractos de epimastigotes preparados como se describe en la sección II.5.4, es decir extractos preparados para determinar la actividad hemooxigenasa, y nuevamente se registraron los espectros de absorbancia para comprobar la estabilidad del compuesto. En la figura 32.A y C se registró una disminución del 10% de la señal del GaPP a 2,25 h de incubación con los extractos de epimastigotes CL Brener y del 12% a 5 h de incubación con los extractos de Dm28c. Sin embargo la disminución registrada de los controles (muestras incubadas el mismo tiempo en ausencia de extractos celulares) fueron del 7% a 2,25 h y del 17% a 5 h respectivamente (figura 32.B y D). Estos resultados nos permiten concluir que la baja (o nula) señal del GaPP detectado en el interior celular no se debe a la degradación del mismo, sino probablemente a una ineficiente importación o a una rápida detoxificación, pero aún siendo baja la señal detectada en epimastigotes de la cepa Dm28c la cantidad retenida fue suficiente para causar el efecto negativo en el crecimiento tal como se reporta en los ensayos mostrados en la figura 29.



**Figura 32.** El GaPP fue estable frente a la incubación con extractos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Espectros registrados del sobrenadante de un extracto de  $100 \times 10^6$  de epimastigotes de la cepa CL Brener (A) y Dm28c (C) incubados con  $2,5 \mu\text{M}$  GaPP a  $30^\circ\text{C}$ . Como control se utilizaron los mismos preparados pero sin los extractos celulares (B y D, respectivamente).

#### III.1.3.4. Detección de los niveles de hemo y hemoproteínas en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* crecidos en presencia de los análogos de hemo

Para avanzar en el estudio y caracterización del transporte de los análogos fluorescentes de hemo como modelo para comprender el transporte de hemo en epimastigotes de *T. cruzi*, se evaluó el efecto que la presencia de estos compuestos ejerce sobre los niveles de hemo intracelulares y de algunas hemoproteínas en las cepas Dm28c y CL Brener.

En primer lugar se cuantificó la cantidad de hemo (hemo B) intracelular por el método de formación de hemocromos con piridina en medio básico, como se describe en sección II.5.1 de Materiales y Métodos, en muestras que corresponden a epimastigotes mantenidos por 3 días en medio LIT 10% SFB suplementado con  $15 \mu\text{M}$  de los diferentes AHs

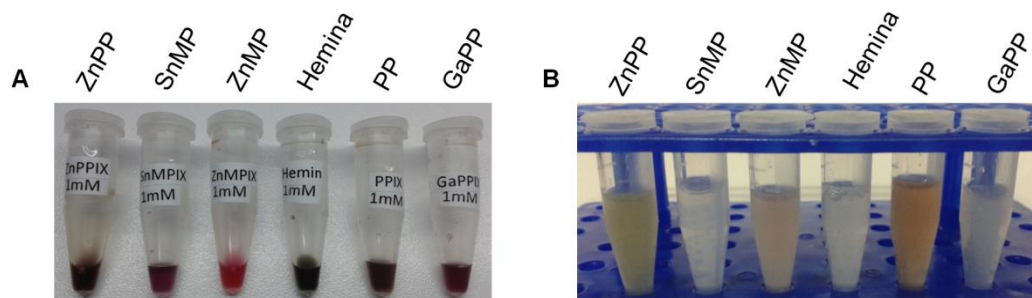
y 5  $\mu$ M hemina (las mismas condiciones utilizadas en la sección III.1.3.2). Como control se mantuvo un cultivo en medio LIT 10% SFB con 5  $\mu$ M hemina y otro con 20  $\mu$ M hemina. Estudios preliminares realizados con la cepa CL Brener mostraron que la incubación con cualquiera de los AHs producía una disminución en la cantidad de hemo detectada (datos no mostrados). Por ello en ambas cepas se analizó el efecto de los siguientes AHs: el SnMP (el análogo que no es internalizado), el ZnMP (internalizado) y el GaPP (de comportamiento diferencial entre ambas cepas). Como se observa a partir de los datos presentados en la tabla 5, todos los AHs ensayados afectaron los niveles de hemo intracelular en ambas cepas de *T. cruzi* cuando se lo compara con el contenido de hemo cuantificado en los cultivos de control. Esto indicaría que a pesar de no ser transportados por ambas cepas, el SnMP y el GaPP podrían interferir con el transporte de hemo; esto se debe probablemente a que interaccionan con los receptores de membrana del sistema dedicado al transporte de hemo y debido a sus características estructurales no pueden ser transportados a través de la membrana.

Condición de crecimiento	CL Brener	Dm28c
	nmoles hemo/ 10 <sup>9</sup> parásitos $\pm$ DS	nmoles hemo/ 10 <sup>9</sup> parásitos $\pm$ DS
20 $\mu$ M hemina	5,13 $\pm$ 0,02	3,67 $\pm$ 0,13
5 $\mu$ M hemina	4,62 $\pm$ 0,05	3,57 $\pm$ 0,01
5 $\mu$ M hemina + 15 $\mu$ M ZnMP	1,57 $\pm$ 0,17 **	1,68 $\pm$ 0,09 **
5 $\mu$ M hemina + 15 $\mu$ M SnMP	2,48 $\pm$ 0,36 **	1,97 $\pm$ 0,21 **
5 $\mu$ M hemina + 15 $\mu$ M GaPP	1,88 $\pm$ 0,16 **	2,67 $\pm$ 0,16 *

**Tabla 5. Los análogos de hemo interfieren el transporte de hemo en epimastigotes.** El contenido de hemo total fue determinado por el método de la piridina básica en muestras de epimastigotes a los 3 días de crecimiento en medio LIT 10% SFB suplementado con 5  $\mu$ M hemina y 15  $\mu$ M de cada uno de los AHs. Los controles corresponden a cultivos realizados en 5 y 20  $\mu$ M hemina. Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada. \*p < 0,01 y \*\*p < 0,001 comparado con la condición control - parásitos crecidos en 5  $\mu$ M hemina (análisis de varianza ANOVA de un factor seguido por post-test de comparaciones múltiples de Dunnet).

Posteriormente se evaluó el efecto que podría producir la presencia de los AHs sobre diferentes hemoproteínas de *T. cruzi*. Para ello, epimastigotes CL Brener se crecieron en medio LIT 10% SFB suplementado con 5  $\mu$ M hemina y 15  $\mu$ M de cada uno de los AHs, y como control se mantuvo un cultivo con 5 y otro con 20  $\mu$ M hemina. Las células fueron crecidas durante 4 días en las condiciones detalladas en la tabla 5, luego colectadas y procesadas para obtener extractos celulares totales como se detalla en la sección II.7.3 de Materiales y

Métodos y extractos enriquecidos en fracción mitocondrial como se detalla en la sección II.7.5 de Materiales y Métodos (figura 33.B).

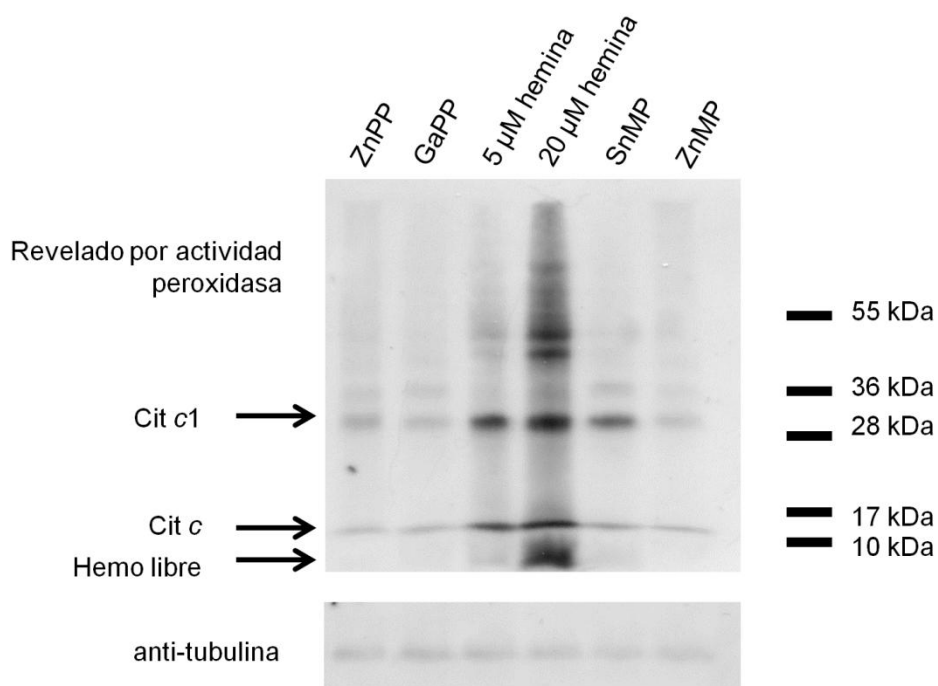


**Figura 33. Fotografías de las fracciones mitocondriales de epimastigotes.** A) Soluciones 1 mM de cada uno de los AHs y de hemina. B) Fracciones mitocondriales de epimastigotes de CL Brener crecidos 4 días en 10% SFB suplementado con 5  $\mu$ M hemina y 15  $\mu$ M de cada uno de los AHs y control con 5  $\mu$ M hemina.

Una fracción de estas muestras fue separada por SDS-PAGE y luego transferida a membranas de nitrocelulosa para evaluar mediante la técnica de Western blot los niveles de distintas hemoproteínas utilizando anticuerpos específicos disponibles en el laboratorio (sección II.7.6.2 de Materiales y Métodos). Se analizaron los niveles de TcCox15, hemoproteína mitocondrial involucrada en la biosíntesis de hemo A (ver sección I.1.5.1 de Introducción) y de TcAPX, hemoperoxidasa ascorbato dependiente localizada en retículo endoplasmático (Wilkinson *et al.*, 2002). Sin embargo, no observamos diferencias apreciables de estas proteínas en las distintas muestras analizadas (dato no mostrado).

Por otro lado, se determinaron los niveles de citocromos c por actividad peroxidasa a partir de los extractos de los epimastigotes (sección II.7.6.3 de Materiales y Métodos). La técnica se optimizó utilizando diferentes preparados proteicos (extractos totales y diferentes fracciones subcelulares), obteniéndose una señal de mejor calidad, en intensidad y bandas aisladas, cuando se analizaron muestras que provenían de fracciones enriquecidas en mitocondrias (sección II.7.5 de Materiales y Métodos). En los ensayos se identificaron claramente las señales que corresponden al citocromo c, al citocromo c1 y al hemo libre, según los tamaños descritos en trabajos reportados en la literatura (San Francisco *et al.*, 2013). Particularmente, San Francisco y colaboradores mostraron que la señal observada a bajo peso molecular (menor de 6 kDa) correspondía a la fracción de hemo libre, es decir a las moléculas de hemo que al momento de realizar la electroforesis en condiciones desnaturizantes no se encontraban unidas covalentemente a proteínas (San Francisco *et al.*, 2013). En la figura 34 se observa que las intensidades correspondientes a los citocromo c,

citocromo c1 y hemo libre de las muestras incubadas con los AHs fueron menores que las correspondientes a los controles; aunque en el caso de las muestras tratadas con SnMP el efecto es evidente solo en los niveles de citocromo c y de hemo libre. Este resultado, si bien es cualitativo, concuerda con el obtenido a partir de las cuantificaciones de hemo por el método de la piridina básica en epimastigotes crecidos en medio con los diferentes AHs, donde se observó que la presencia de cualquiera de los AHs causaron una disminución del contenido de hemo intracelular, independientemente de su capacidad de ser incorporados por las células (tabla 5). La intensidad de las señales correspondientes a los citocromos c y c1 fue menor de igual manera que la señal de hemo detectada en los extractos celulares. Esto probablemente sea una consecuencia indirecta debido a que los AHs provocan una disminución en la disponibilidad de hemo intracelular, provocando una menor cantidad de estas hemoproteínas, y la disminución de las hemoproteínas no se deba a un efecto directo debido a la circulación intracelular de los AHs. Este resultado se apoya en modelos propuestos para otros organismos como *Bradyrhizobium japonicum* y humanos, donde se verificó que la cantidad de hemo regula la producción y los niveles de citocromos c (Gao y O'Brian, 2005; San Francisco *et al.*, 2013).



**Figura 34. Los análogos de hemo afectan los niveles de citocromo c.** La presencia de citocromo c fue revelada por actividad peroxidasa intrínseca en los extractos enriquecidos en mitocondrias de epimastigotes de CL Brener crecidos 4 días con 5 μM hemina, 20 μM hemina o 5 μM hemina más los diferentes AHs (ZnPP, GaPP, SnMP y ZnMP). Como control se detectó tubulina por la técnica de Western blot utilizando anticuerpos anti-tubulina.

Debido al efecto negativo que causan estos compuestos sobre la proliferación de los epimastigotes, las muestras analizadas en estos ensayos fueron procesadas a partir de cultivos de 3 o 4 días en presencia de AHs. Debido al breve tiempo al que los epimastigotes son mantenidos en presencia de AHs, es posible que no se manifieste de manera apreciable el impacto en los niveles de las hemoproteínas. Es decir, en estos ensayos hubo una situación de compromiso ya que la toma de las muestras se realizó antes de que se vea afectada la viabilidad de los epimastigotes y sólo pudimos evaluar el nivel de las hemoproteínas en ese momento; no podemos asegurar que este nivel se mantenga constante o que cambie a mayores tiempo de incubación.

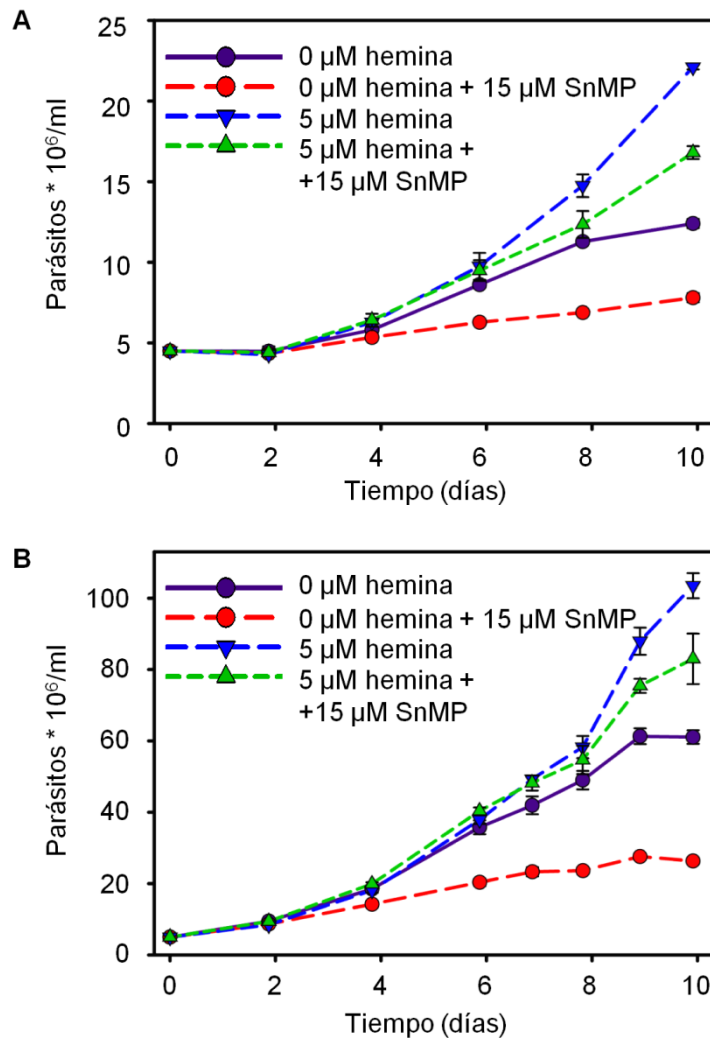
En resumen, los resultados presentados hasta aquí muestran que todos los AHs ensayados afectan los niveles de hemo intracelular independientemente de si son incorporados o no por los epimastigotes. Solo se detectó un efecto en los niveles de citocromo *c* y citocromo *c1* de las proteínas evaluadas. Probablemente esta disminución se deba al cambio en el contenido intracelular de hemo. De todas maneras, no podemos descartar que la presencia intracelular de AHs afecte la formación y estabilidad de hemoproteínas.

#### **III.1.3.5. SnMP interfiere con el transporte de hemo en *Trypanosoma cruzi***

Los resultados presentados en la sección III.1.1 se muestran que los epimastigotes de ambas cepas ensayadas mantenidos en LIT 10% SFB sin el agregado de hemina fueron viables pero presentaron un menor crecimiento comparado a los epimastigotes mantenidos en el mismo medio pero suplementado con hemina (figura 21.A y B). Una razón que podría explicar esta observación es que las trazas de hemo presentes en el SFB y tal vez en otros componentes del medio como el extracto de hígado. Además, como los epimastigotes fueron previamente mantenidos en medio LIT 10% SFB con hemina, posiblemente la reserva intracelular de hemo les permita mantener su crecimiento por 7 a 10 días. Basándonos en estos resultados y teniendo en cuenta las evidencias que mostraron que la presencia del análogo SnMP en el medio de cultivo provocó la disminución del contenido de hemo intracelular como los demás AHs pero sin afectar la viabilidad de los epimastigotes (figura 28.A y 29.A, y tabla 5) y que fue el único AH que no fue detectado en el interior celular (figuras 28.B y C y figura 29.B y C), decidimos evaluar si el SnMP afectaba el crecimiento de los epimastigotes en condiciones más astringentes de hemo. Para eso, los epimastigotes de

las cepas CL Brener y Dm28c mantenidos previamente en medio LIT 10% SFB sin hemina durante 15 días (hambreando) se enfrentaron a crecer en el mismo medio suplementado pero con 15  $\mu\text{M}$  SnMP con y sin el agregado de 5  $\mu\text{M}$  hemina, y se siguió el crecimiento del cultivo durante 10 días sin realizar renovaciones periódicas del medio (sección II.4.3 de Materiales y Métodos). En la figura 35 se presentan los resultados obtenidos y en la tabla 6 se muestra la cuantificación del contenido de hemo intracelular de los epimastigotes a los 3 y a los 10 días de crecimiento, determinado por el método de la piridina básica (sección II.5.1 de Materiales y Métodos). En las muestras que provienen de los cultivos mantenidos en LIT 10% SFB sin el agregado de hemina (con y sin SnMP) no pudo cuantificarse hemo intracelular, posiblemente porque su concentración esté por debajo del límite de detección del método. Pero la presencia de SnMP agudizó el fenotipo que produce la baja disponibilidad de hemo en el medio de cultivo y este comportamiento fue similar para ambas cepas (figuras 35.A y B). Este resultado nos sugiere que el SnMP podría estar dificultando la entrada de hemo a la célula. Cuando evaluamos la presencia de SnMP por microscopía confocal (dato no mostrado), aún en estas condiciones, no pudimos detectar la señal fluorescente correspondiente al análogo aunque no podemos descartar que pueda haber trazas intracelulares de SnMP no detectadas.

Por otro lado los datos colectados en este ensayo nos muestran que el agregado de 15  $\mu\text{M}$  SnMP produjo una disminución del crecimiento de los epimastigotes de ambas cepas en los cultivos que contenían también 5  $\mu\text{M}$  de hemina y que comienza a manifestarse a partir del día 6 - 7 de incubación. El análisis del contenido de hemo intracelular en epimastigotes crecidos en LIT 10% SFB en presencia de 15  $\mu\text{M}$  de SnMP y 5  $\mu\text{M}$  de hemina no resultaron significativamente diferentes del control (mantenidas con 5  $\mu\text{M}$  de hemina) cuando las muestras fueron tomadas al día 3 de incubación. Pero observamos que en las muestras de los cultivos mantenidos en medio suplementado con 15  $\mu\text{M}$  SnMP y 5  $\mu\text{M}$  hemina tomadas al día 10, el contenido de hemo intracelular fue significativamente menor que el de las muestras control (mantenidas con 5  $\mu\text{M}$  de hemina), y esto podría explicar la disminución del crecimiento (figuras 34.A y B). Estos resultados también apoyarían la hipótesis de que el SnMP competiría con la hemina por la entrada a la célula causando que este proceso sea menos eficiente y como consecuencia el menor contenido intracelular de hemo afectaría el crecimiento del parásito.



**Figura 35. El crecimiento de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* es sensible a la capacidad de incorporar hemo.** Curvas de crecimiento de epimastigotes cepas CL Brener (A) y Dm28c (B) en medio LIT 10% SFB con el agregado de 0  $\mu\text{M}$  de hemina, 5  $\mu\text{M}$  de hemina y/o con 15  $\mu\text{M}$  SnMP. Los cultivos se mantuvieron sin diluciones durante 10 días. Previamente las células se habían mantenido en medio LIT 10% SFB sin hemina durante 15 días. Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada.

Por otro lado, en las muestras provenientes de los cultivos mantenidos en LIT 10% SFB con 20  $\mu\text{M}$  hemina se detectó una cantidad elevada de hemo cuando fueron tomadas al día 3 de incubación, pero estos valores se normalizaron al día 10; los contenidos de hemo determinados al día 10 fueron próximos al contenido de hemo determinado en epimastigotes crecidos en LIT 10% SFB suplementado con 5  $\mu\text{M}$  hemina, mostrados en la sección III.1.1.

En resumen, los resultados obtenidos indican que el SnMP sería el único AH de hemo ensayado que no es transportado a niveles detectables por epimastigotes de las cepas CL Brener y Dm28c de *T. cruzi*. Por ello en condiciones favorables donde el parásito pueda suplir

sus requerimientos nutricionales de hemo no ejerce ningún efecto en los epimastigotes. Sin embargo, el SnMP tendría la capacidad de bloquear o dificultar el transporte de hemo; a diferencia de otros compuestos utilizados anteriormente para bloquear el transporte de hemo, como los inhibidores de transportadores del tipo ABC (Cupello *et al.*, 2011; Lara *et al.*, 2007), que además de bloquear el transporte de hemo inhibirían el transporte de otros metabolitos. Esto lo hace un compuesto interesante como herramienta para estudiar los efectos que puede causar sólo el bloqueo el transporte de hemo en *T. cruzi* sin interferir con otros procesos esenciales.

Condición de crecimiento	CLBrener		Dm28c	
	nmoles hemo/ 10 <sup>9</sup> parásitos ± DS		nmoles hemo/ 10 <sup>9</sup> parásitos ± DS	
	3 días	10 días	3 días	10 días
0 µM hemina	ND	ND	ND	ND
0 µM hemina + 15 µM SnMP	ND	ND	ND	ND
5 µM hemina	3,40 ± 0,55	3,80 ± 0,06	4,58 ± 0,34	0,97 ± 0,17
5µM hemina + 15 µM SnMP	3,55 ± 0,38	1,57 ± 0,14 *	3,63 ± 0,76	0,51 ± 0,15 *
20 µM hemina	10,7 ± 1,6	4,8 ± 0,6	8,4 ± 1,1	3,3 ± 0,2

**Tabla 6. El tratamiento con SnMP afecta la incorporación de hemo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.** El contenido de hemo total fue determinado por el método de la piridina básica en muestras de epimastigotes al tercer y décimo día de crecimiento en medio LIT 10% SFB suplementado con 15 µM SnMP y/o 5 µM hemina. Control realizado con 20 µM hemina. Previamente las células se habían mantenido en medio LIT 10% SFB sin el agregado de hemina durante 15 días. Los datos están expresados como el promedio ± DS de dos réplicas independientes de cada condición ensayada. Prueba t de *Student* a dos colas comparando contenido de hemo de epimastigotes crecidos en 5 µM hemina con epimastigotes crecidos con 5 µM hemina y 15 µM SnMP: \*p < 0,05. ND: no determinado.

### **III.2. Biosíntesis de hemo A en *Trypanosoma cruzi***

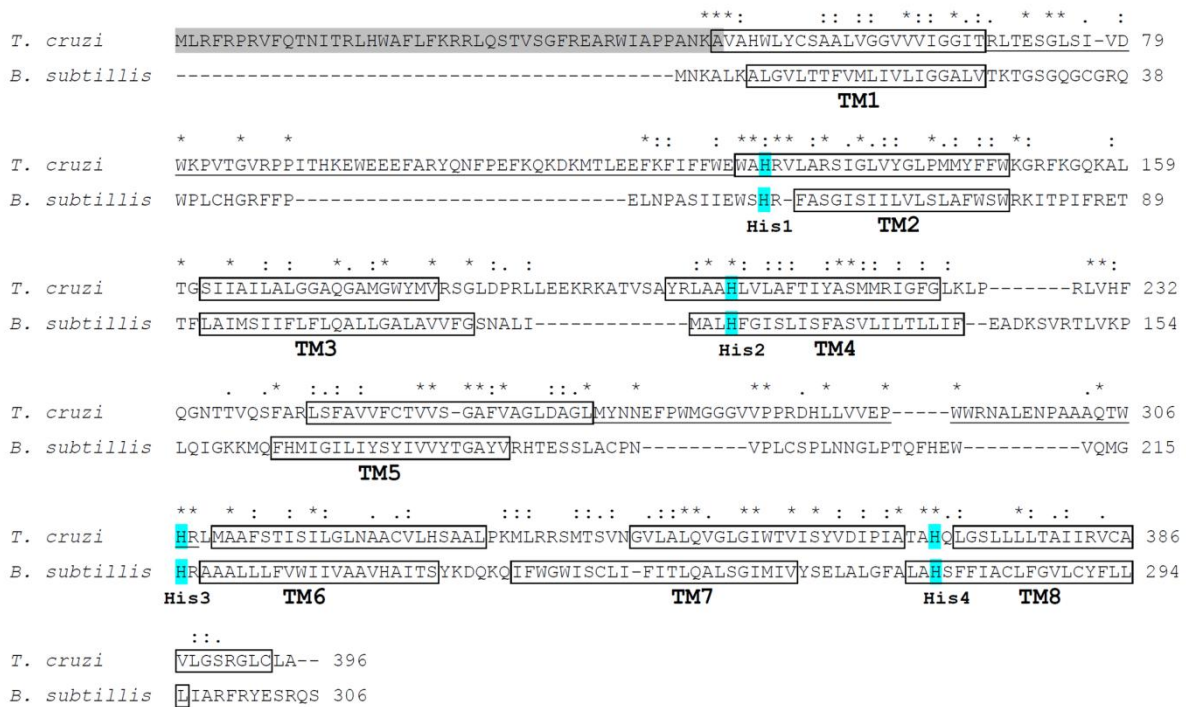
*T. cruzi* presenta un metabolismo fermentativo aeróbico, es decir que no puede independizarse del consumo de oxígeno a pesar de tener un metabolismo fermentativo y por ello necesita una cadena mitocondrial activa (Tielens y van Hellemond, 2009). Si bien tendría múltiples oxidasas terminales dando lugar a una cadena respiratoria ramificada (figura 15 de Introducción), se propone que una CcO del tipo  $aa_3$  es la principal oxidasa terminal, siendo la responsable del 94% del consumo de oxígeno en epimastigotes (Affranchino *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 2011; Tielens y van Hellemond, 2009). Al depender de la actividad de la CcO durante todo su ciclo de vida, proponemos que la síntesis, distribución y ensamblado de hemo A serían también esenciales para *T. cruzi*.

En trabajos previos desarrollados en el laboratorio se identificaron en el genoma de *T. cruzi* las secuencias codificantes para una enzima con actividad hemo O sintasa (HOS) y otra para una hemo A sintasa (HAS), denominadas TcCox10 y TcCox15, respectivamente. Dichas secuencias (Tc00.1047053509601.59 y Tc00.1047053511211.70) fueron inicialmente identificadas mediante búsqueda bioinformática sobre el genoma de CL Brener utilizando como semilla las secuencias de Cox10 y Cox15 de *S. cerevisiae* (YPL172C y YER141W). Los porcentajes de similitud e identidad entre dichas secuencias son del 52% y 37% para Cox10, y del 56% y 41% para Cox15. La actividad de las enzimas se comprobó en ensayos de complementación en *S. cerevisiae* utilizando cepas *knockout* para los genes *COX10* y *COX15* (*cox10Δ* y *cox15Δ*), respectivamente. Como primera aproximación al estudio de estos genes en el parásito se analizaron los niveles de acumulación de los ARNm mediante la técnica de qRT-PCR, resultando que los genes se transcriben en los distintos estadios del ciclo de vida del parásito (Buchensky *et al.*, 2010).

En este contexto, como parte de los objetivos de esta Tesis doctoral, nos propusimos elucidar si estas enzimas eran activas en los distintos estadios del parásito y la relevancia de la síntesis de hemo A en el ciclo de vida de *T. cruzi*, y para ellos realizamos las aproximaciones experimentales que se detallan en esta sección. Es importante mencionar que todos estos ensayos fueron realizados sobre la cepa Dm28c de *T. cruzi*.

**III.2.1. Análisis bioinformático de proteínas que estarían involucradas en la síntesis de hemo A en *Trypanosoma cruzi***

En primera instancia se analizó la secuencia de TcCox15 para reconocer las regiones conservadas propias de las HAS y además identificar en el genoma de *T. cruzi* los genes que podrían participar junto a TcCox15 en la síntesis de hemo A y en el ensamblado de la CcO. Las búsquedas se realizaron en los genomas de las cepas CL Brener y de Dm28c (El-Sayed *et al.*, 2005; Grisard *et al.*, 2014), que son las cepas utilizadas en este trabajo de Tesis.

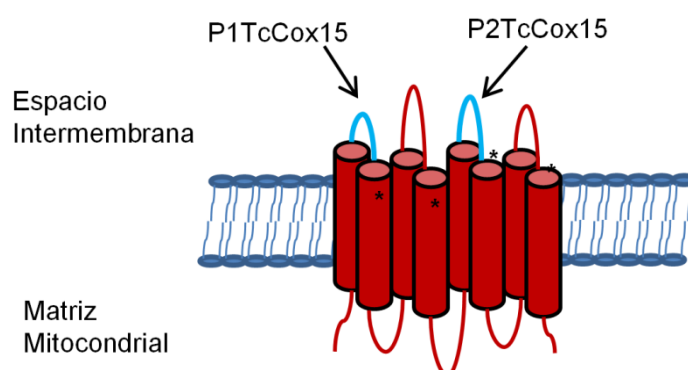


**Figura 36. TcCox15 presenta las características topológicas conservadas en proteínas con actividad HAS.** Secuencias de HAS de *T. cruzi* y *B. subtilis* - TcCox15 (TCDM\_06426) y CtaA (CAB11340.1) – alineadas mediante ClustalW. Se muestran recuadradas las 8 regiones transmembranas predichas, resaltados en azul los aminoácidos conservados y resaltado en gris el posible péptido señal. Además se muestran subrayadas las regiones antigénicas P1TcCox15 (entre TM1 y TM2) y P2TcCox15 (entre TM5 y TM6) utilizadas como blanco para la obtención de anticuerpos policlonales.

Del análisis del alineamiento de la secuencia de TcCox15 con CtaA de *B. subtilis* (sección II.1.1 de Materiales y Métodos), se reconoció la presencia de las 4 histidinas conservadas en la secuencia de TcCox15: H129, H206, H307 y H370 según la numeración de *T. cruzi* que corresponden a las H60, H123, H216 y H278 de CtaA de *B. subtilis* (Hederstedt, 2012), respectivamente (sección II.1.5.1 de Introducción); y al igual que sucede con las HAS de eucariotas, TcCox15 no posee las cisteínas que están conservadas en las HAS procariontas (figura 36). Mediante programas bioinformáticos de libre acceso (sección II.1.1 de Materiales y Métodos) se identificaron además 8 posibles regiones transmembranas (TM) en TcCox15

que concuerdan con las regiones transmembranas predichas para CtaA de *B. subtilis* (figura 36). Como se esquematiza en la figura 37, los aminoácidos conservados quedarían orientados hacia el espacio intermembrana y los extremos C y N-terminal orientados hacia la matriz mitocondrial al igual que lo predicho para las demás HAS eucariotas identificadas.

Utilizando programas predictores de localización celular de libre acceso se estimó que la localización de TcCox15 sería mitocondrial: probabilidades de 0,9747 por MITOPROT (Claros y Vincens, 1996) y de 0,956 por Targetp (Emanuelsson *et al.*, 2000); y además la presencia de un péptido señal con un sitio de corte posterior al aminoácido 46 que se esquematiza en la figura 36 (sección II.1.1 de Materiales y Métodos).



**Figura 37. Modelo propuesto que representa la topología de TcCox15.** Se representan las regiones transmembranas y los bucles predichos. Se remarcan las regiones antigénicas usadas como blanco de anticuerpos policlonales y las 4 histidinas conservadas (\*).

Las enzimas HAS necesitan para su actividad de una ferredoxina que entregue electrones para las reacciones de monooxigenación con el acompañamiento de la respectiva ferredoxina reductasa (sección I.1.5.1 de la Introducción). Utilizando las secuencias de la ferredoxina Yah1 y la ferredoxina reductasa Arh1 de *S. cerevisiae* (genes YPL252C y YDR376W) se identificaron secuencias en el genoma de *T. cruzi* que podrían codificar para proteínas con dichas funciones en el parásito. Para el caso de la ferredoxina Yah1, se encontraron las secuencias TcCLB.509011.70 en el genoma de la cepa CL Brener haplotipo esmeraldo y las secuencias TcCLB.504575.40 y TcCLB.508879.70 en el genoma de la cepa CL Brener haplotipo no-esmeraldo (tabla 7). Las secuencias encontradas en los genomas de *T. cruzi* son variables entre ellas: las dos primeras secuencias tienen un alto porcentaje de similitud e identidad entre ellas (del 81% y del 80% respectivamente), mientras que la última secuencia mencionada (la secuencia TcCLB.508879.70) difiere de las otras dos secuencias de *T. cruzi* (similitud del 37 - 41% y una identidad del 25 - 28%). Por otro lado, las 3 probables ferredoxinas de *T. cruzi* tienen una similitud y una identidad moderada con respecto a Yah1

de levaduras (del 38 – 43% y del 24 – 28% respectivamente). Las 3 secuencias analizadas tienen alta probabilidad de localización mitocondrial presentando un péptido señal con un sitio de corte definido. Las secuencias de las tres proteínas fueron analizadas en busca de posibles dominios conservados y se determinó la presencia de un dominio Fer2. Fer2 es un dominio de unión a centros hierro azufre (2Fe-2S) que es característico de proteínas que transfieren electrones entre las que están incluidas las ferredoxinas. En el genoma de la cepa Dm28c se encontró el marco abierto de lectura AYLP01000008-4-56969-56469 de características similares a las encontradas en los genomas de CL Brener, pero no se encuentra anotada como posible proteína, probablemente por no haberse asignado un inicio de la traducción en la secuencia reportada (sección II.1.1 de Materiales y Métodos).

	Secuencia	Genoma	probabilidad de match al azar (E-value)	Longitud de secuencia
Ferredoxina Yah1	YPL252C	<i>S. cerevisiae</i>	-	172 aa
	TcCLB.509011.70	CL Brener haplotipo esmeraldo	$2 \times 10^{-23}$	163 aa
	TcCLB.504575.40	CL Brener haplotipo no-esmeraldo	$1 \times 10^{-23}$	194 aa
	TcCLB.508879.70	CL Brener haplotipo no-esmeraldo	$9 \times 10^{-31}$	192 aa
Ferredoxina reductasa Arh1	YDR376W	<i>S. Cerevisiae</i>	-	493 aa
	TCDM_04666	Dm28c	$3 \times 10^{-62}$	620 aa
	TcCLB.511367.230	CL Brener haplotipo no-esmeraldo	$4 \times 10^{-64}$	595 aa
Shy1	YGR112W	<i>S. cerevisiae</i>	-	389 aa
	TCDM_07735	Dm28c	$6 \times 10^{-6}$	333 aa
	TcCLB.506227.90	CL Brener haplotipo esmeraldo	$2 \times 10^{-5}$	333 aa
	TcCLB.511847.50	CL Brener haplotipo no-esmeraldo	$2 \times 10^{-5}$	333 aa

**Tabla 7. Proteínas hipotéticas de *T. cruzi* que estarían involucradas en la síntesis y ensamblado de hemo A en CcO.** Los E-value presentados son los obtenidos de la búsqueda por BLAST en la base de datos TritypDB contra el genoma de la cepa mencionada de *T. cruzi* utilizando la secuencia de levaduras como semilla. aa: aminoácidos.

Para el caso de la ferredoxina reductasa Arh1, se encontraron las secuencias TCDM\_04666 en el genoma de la cepa Dm28c y TcCLB.511367.230 de la cepa CL Brener haplotipo no-esmeraldo. Las secuencias encontradas difieren en unos 100 aa con respecto a la secuencia de levaduras (tabla 7). En este caso las secuencias de *T. cruzi* tienen una similitud e identidad muy alta entre ellas (del 94% y del 93% respectivamente), y una similitud del 35 – 36% y una identidad del 23 – 24% con respecto a Arh1 de levaduras. Las secuencias de dichas proteínas fueron analizadas por posibles dominios conservados y se detectó en ellas un posible dominio Rossmann de unión a NAD(P). Los dominios Rossmann son dominios que unen nucleótidos como ciertos cofactores de enzimas: FAD, NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>. En el genoma de la cepa CL Brener haplotipo esmeraldo se encontró la secuencia TcCLB.509965.20 con un E-value elevado (de 0,64); con una similitud del 27% y una identidad del 14% con respecto a Arh1 de levaduras y un tamaño de 677 aa. Del análisis bioinformático realizado surge la existencia de probables bucles de unión a nucleósidos o dominios del tipo de transportadores ABC, pero no dominios propios de una ferredoxina reductasa. Tampoco presentaría, a diferencia de las otras secuencias, una señal de localización mitocondrial ni péptido señal definido (sección II.1.1 de Materiales y Métodos).

Con estas evidencias, existirían en el genoma de *T. cruzi* secuencias que codificarían para las posibles proteínas con actividad de ferredoxina y ferredoxina reductasa con la función de entregarle a TcCox15 los electrones necesarios para su actividad enzimática.

Luego de que el hemo A es sintetizado, se requiere de diversos factores de ensamblado para que sea insertado en la subunidad Cox1 y luego de varios pasos formar una CcO funcional (sección I.1.5.2 de Introducción). En este escenario, la CcO de *T. cruzi* necesitaría también de diversas proteínas accesorias para ensamblarse correctamente. Utilizando las secuencias de las proteínas que han sido reportadas que intervienen en las primeras etapas del ensamblado de la CcO de *S. cerevisiae* Shy1, Coa1, Coa2, Coa3, Cox14, Ssc1 y Mss51 (Khalimonchuk *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 2012), se identificaron en el genoma de *T. cruzi* secuencias con similitud a la Shy1 (YGR112W): TCDM\_07735 en el genoma de Dm28c, TcCLB.506227.90 en el genoma de CL Brener haplotipo esmeraldo y TcCLB.511847.50 de CL Brener haplotipo no-esmeraldo (tabla 7). Las secuencias encontradas en los genomas de *T. cruzi* tienen una similitud del 99% y una identidad del 97 – 98% entre sí, y una similitud de 28% y una identidad de 17% con respecto a Shy1. Se analizaron las secuencias para detectar dominios conservados y se observó que todas pertenecerían a la

superfamilia SURF1. La única discrepancia encontrada para que estas proteínas cumplan la función de Shy1, es que no fue predicha su localización mitocondrial (sección II.1.1 de Materiales y Métodos).

Por otro lado se encontraron secuencias con similitud a Ssc1 de *S. cerevisiae* (YJR045C), pero esta es una chaperona mitocondrial del tipo Hsp70 no específica para el proceso de ensamblado de la CcO. No se pudieron identificar secuencias con homología para los factores de ensamblado Coa1, Coa2, Coa3, Cox14 ni Mss51 de *S. cerevisiae* (YIL157C, YPL189C, YJL062W, YML129C y YLR203C, respectivamente). Estas proteínas accesorias tampoco están conservadas en humanos (Soto *et al.*, 2012) ni en *A. thaliana* (Mansilla *et al.*, 2015). En cuanto a proteínas que intervienen en el ensamblado de la CcO, solo ortólogos a Shy1/Surf1 parecerían estar ampliamente conservadas en las distintas especies. Por otro lado, tampoco se pudieron identificar en las secuencias genómicas de *T. cruzi*, secuencias ortólogas a Cox5A y Cox6 de levaduras (YNL052W y YHR051W, proteínas no catalíticas de la CcO que se ensamblan junto a Cox1 en los estadios tempranos de la formación del complejo cuando se incorpora el hemo A), aunque estas están más conservadas en distintas especies (Soto *et al.*, 2012) (sección I.1.5.2 de Introducción). Estas evidencias nos hacen pensar que en el ensamblado de la CcO de *T. cruzi* podrían intervenir otros factores de ensamblado diferentes a los reportados en la literatura.

Si bien la actividad HAS de TcCox15 fue confirmada en ensayos de complementación en levaduras (Buchensky *et al.*, 2010), el rol de esta enzima en *T. cruzi* como hemo A sintasa no estaba convalidada. El hecho de que sea funcionalmente activa en *S. cerevisiae* indicaría que puede utilizar el aporte de electrones de la ferredoxina y ferredoxina reductasa en levaduras para su actividad y dado que en el genoma de *T. cruzi* identificamos secuencias proteicas que podrían cumplir esas funciones en el parásito, la hipótesis de que TcCox15 participaría en la síntesis de hemo A se ve fortalecida. Dado que la subunidad Cox1 de la CcO necesita de factores proteicos de ensamblado para su estabilidad y para la inserción de las dos moléculas de hemo A, y que en *T. cruzi* se identificaron sólo secuencias de proteínas ortólogas a Shy1 pero no de los demás factores de ensamblado (ni las subunidades no catalíticas Cox5A y Cox6 del complejo CcO caracterizados en levaduras), esta evidencia nos indicaría que el ensamblado e inserción de hemo A en Cox1 podría ser diferente en ambos organismos. A pesar de ello, la expresión heteróloga en levaduras de proteínas de la

biosíntesis de hemo A (TcCox10 y TcCox15) ha resultado una herramienta útil para el estudio de la función de estas enzimas (Buchensky *et al.*, 2010).

### **III.2.2. Diseño y obtención de anticuerpos policlonales de conejo específicos para el reconocimiento de TcCox15**

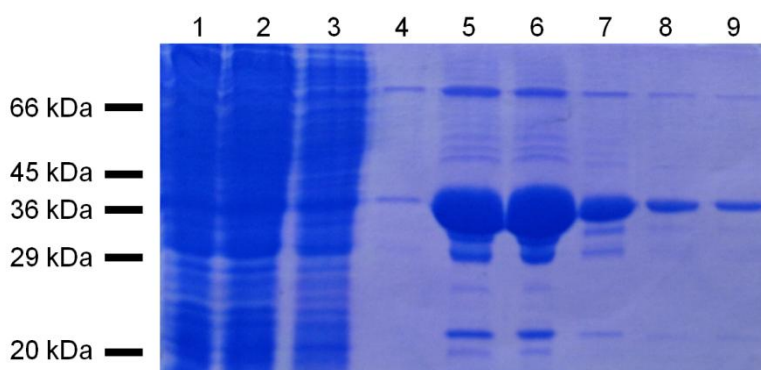
Con el fin de detectar la proteína TcCox15 en el parásito y teniendo en cuenta que es una proteína integral de membrana, se realizó la siguiente estrategia para obtener anticuerpos policlonales específicos. Utilizando los resultados obtenidos de los programas de predicción estructural antes mencionados (regiones transmembrana y péptido señal) y analizando las posibles regiones antigénicas<sup>6</sup>, se seleccionaron dos segmentos polipeptídicos denominados P1TcCox15 y P2TcCox15 (ver figuras 36 y 37) que cumplieran con los requisitos de ser secuencias antigénicas y de no pertenecer a posibles regiones transmembranas o al posible péptido señal.

Las secuencias P1TcCox15 y P2TcCox15 fueron amplificadas mediante PCR como se detalla en la sección II.6.3.1 de Materiales y Métodos usando como molde una secuencia del gen *TcCOX15* clonada en el laboratorio (pKS.*TcCOX15.HIS*) proveniente de la cepa Dm28c (Buchensky *et al.*, 2010). Los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector de expresión pET-Term (Gonzalez *et al.*, 2012) que permite su expresión como fusión a GST (glutación S-transferasa) en *E. coli*, generando los siguientes plásmidos: pET-Term.*P1TcCOX15* y pET-Term.*P2TcCOX15*.

Se optimizaron las condiciones de expresión de la proteínas de fusión a partir de cultivos de cepas de *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS' transformadas con los plásmidos mencionados anteriormente como se detalla en la sección II.7.1.1 de Materiales y Métodos. No se logró obtener cantidades significativas de GST-P2TcCox15 soluble, por lo que se trabajó solo con GST-P1TcCox15 que presentaba mejor rendimiento en forma soluble. Se purificó la proteína de fusión GST-P1TcCox15 por cromatografía de afinidad utilizando resina de glutatión agarosa (sección II.7.1.2 de Materiales y Métodos). Esta consistió en incubar la resina con el lisado celular, lavarla para eliminar uniones inespecíficas y la posterior elución de la proteína de interés con una solución conteniendo glutatión. Las diferentes fracciones de la purificación se muestran en la figura 38.

---

<sup>6</sup> Tesina de grado de Simón Menéndez Bravo, titulada "Estudio de proteínas mitocondriales de *Trypanosoma cruzi* involucradas en el metabolismo de hemo". Directora: Dra. Julia Alejandra Cricco

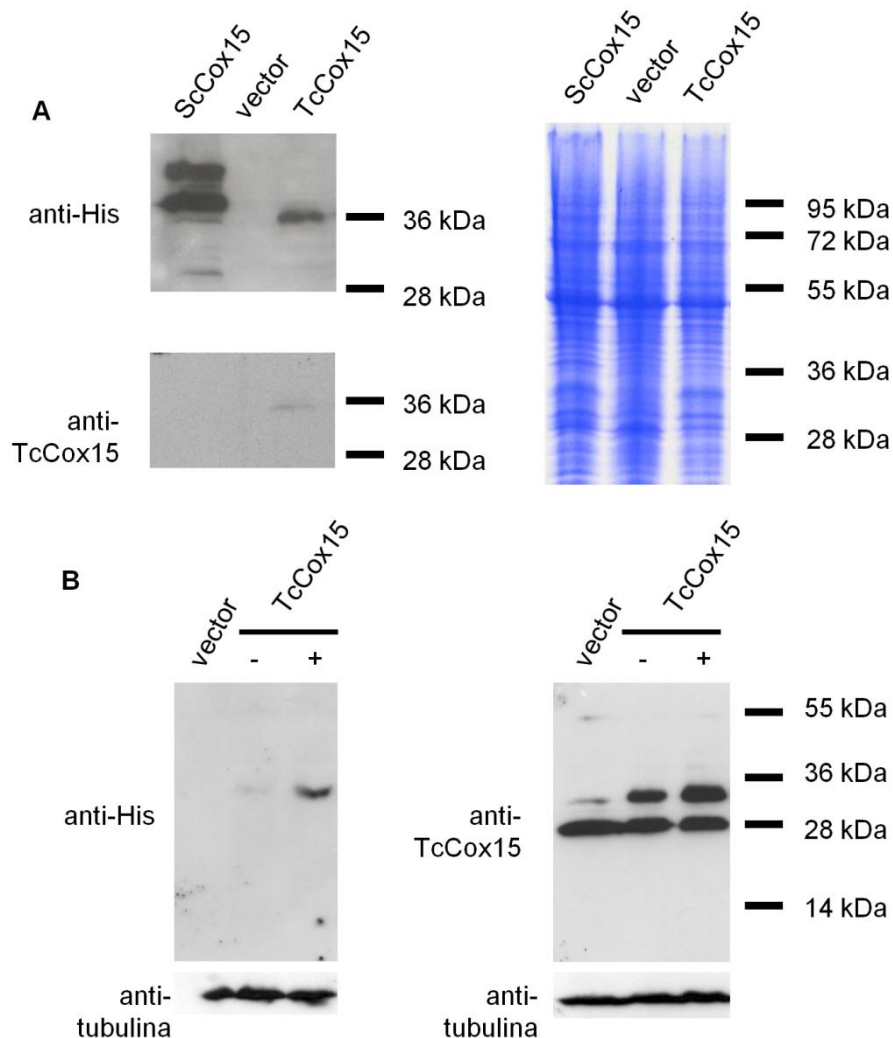


**Figura 38. La proteína de fusión GST-P1Cox15 es purificada eficientemente mediante cromatografía de afinidad.** SDS-PAGE de las muestras de los pasos de purificación con resina de glutatión agarosa de GST-P1TcCox15, teñido con Coomassie. Calle 1: Fracción soluble del extracto total de *E. coli* BL21(DE3)pLysS' que sobreexpresa GST-P1TcCox15. Calle 2: Remanente de la fracción celular soluble luego de la purificación. Calle 3: Extracto total celular. Calle 4 a 9: Fracciones de elución 1 a 6.

La proteína GST-P1TcCox15 purificada fue utilizada para obtener anticuerpos policlonales específicos de conejo según el protocolo descrito en la sección II.7.1.3 de Materiales y Métodos. La manipulación de animales y obtención de sueros fue realizada por el personal del servicio de Bioterio de la FCByF UNR. La especificidad del suero inmune obtenido fue validada mediante ensayos de Western blot y luego se lo utilizó para purificar los anticuerpos contra el segmento P1TcCox15 (sin la GST de la fusión). Posteriormente los anticuerpos eluidos se concentraron aproximadamente 15 veces (sección II.7.1.4 de Materiales y Métodos) para ser utilizados en los ensayos de Western blot e Inmunofluorescencia Indirecta.

La especificidad de los anticuerpos policlonales purificados se comprobó mediante la técnica de Western blot utilizando extractos mitocondriales de *S. cerevisiae cox15Δ* y extractos totales de epimastigotes, ambos expresando TcCox15 como proteínas de fusión a una cola C-terminal de 6 histidinas. Para realizar los extractos mitocondriales de levadura se crecieron *cox15Δ* transformadas con pRS426M25.*TcCOX15.HIS* en SCDO Glu sin uracilo (-U) como medio de selección y se purificaron mitocondrias (sección II.3.4 y II.7.2 de Materiales y Métodos). Como control se utilizaron levaduras transformadas con el vector pRS426M25 y células transformadas con pRS426M25.*COX15.HIS* (el gen *COX15* de *S. cerevisiae* clonado en el vector pRS426M25). En la figura 39.A se observa la señal detectada mediante la técnica de Western blot utilizando tanto los anticuerpos anti-TcCox15 como los anti-His comerciales en la calle correspondiente a los extractos de células que expresaban TcCox15.His (sección II.7.6.2 de Materiales y Métodos). Para verificar la especificidad en *T. cruzi*, estos se

evaluaron a partir de extractos obtenidos de epimastigotes transfectados con pTcINDEX.*TcCOX15.HIS* (inducidos y sin inducir la expresión del gen por el agregado de tetraciclina) y de epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX como control (sección II.3.7 y II.7.3 de Materiales y Métodos). En la figura 39.B se observa que los anticuerpos anti-TcCox15 reconocen a TcCox15.His, banda que corresponde a una proteína de masa molecular de 34 – 35 kDa, y además a una banda que corresponde a una proteína de masa molecular de 28 kDa (sección II.7.6.2 de Materiales y Métodos). Mientras que esta última señal es reconocida en todos los extractos, la señal que corresponde a TcCox15 varía en intensidad: en la calle que corresponde a los parásitos transfectados con el vector pTcINDEX se observa una señal débil correspondiente a TcCox15 endógena y en las calles correspondientes a los parásitos sobreexpresantes se observa una señal más intensa.



**Figura 39. Los anticuerpos policlonales anti-TcCox15 reconocen a la proteína recombinante TcCox15.His en extractos celulares totales obtenidos de levaduras y de *T. cruzi*.** A) Inmunoblot de extractos mitocondriales de levaduras *cox15*Δ transformadas con pRS426M25.*COX15.HIS* (ScCox15), pRS426M25 (vector) y pRS426M25.*TcCOX15.HIS* (TcCox15) crecidas en SCDO Glu-U con 20 mg/l metionina, utilizando anticuerpos anti-His y anticuerpos policlonales anti-TcCox15; y un SDS-PAGE

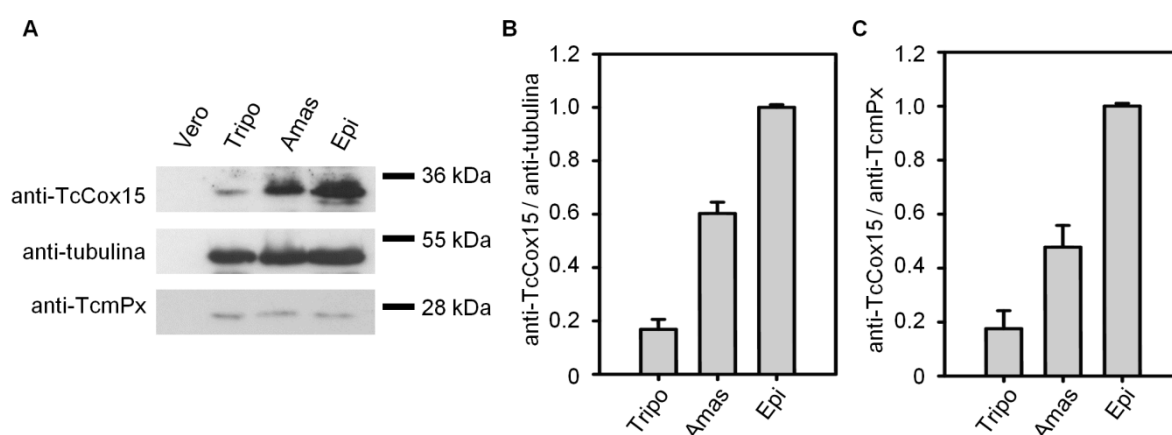
teñido con Coomassie con los mismos extractos como control de siembra. B) Inmunoblot de extractos totales de epimastigotes Dm28c.pLEW13 transfectados con pTcINDEX (vector) y pTcINDEX.*TcCOX15.HIS* (TcCox15) inducidos por 3 días con tetraciclina (+) y sin inducir (-); utilizando anticuerpos anti-His y anticuerpos policlonales anti-TcCox15 y anti-tubulina como control de carga de los extractos de epimastigotes de *T. cruzi*.

Estos ensayos nos muestran además que el vector pTcINDEX posee una expresión basal que escapa al control del sistema (hay expresión en ausencia de tetraciclina), lo que se denomina expresión *leaky*. Estos resultados muestran que los anticuerpos anti-TcCox15 reconocen a la proteína TcCox15.His tanto en extractos proteicos de levadura como de epimastigotes de *T. cruzi*; por otro lado la señal detectada para TcCox15.His en un SDS-PAGE correspondería a una proteína de aproximadamente 33 - 35 kDa. Este tamaño difiere del esperado, de 45,06 kDa, estimado en base a la secuencia primaria de TcCox15.His (sección II.1.1 de Materiales y Métodos). Esta diferencia podría deberse al procesamiento que sufre la proteína durante la importación a la mitocondria y/o debido a que su movilidad electroforética en SDS-PAGE sea diferente a la de los patrones de peso molecular utilizados (en general proteínas globulares solubles).

### **III.2.3. Análisis de la expresión endógena del gen *TcCOX15* en *T. cruzi***

En estudios previos realizados en el laboratorio se determinó la presencia del transcripto del gen *TcCOX15* en los distintos estadios del parásito (Buchensky *et al.*, 2010), pero no se había determinado la presencia y niveles de acumulación de la proteína durante su ciclo de vida. Por este motivo, una vez obtenidos los anticuerpos específicos contra TcCox15, se verificó la presencia de TcCox15 en los distintos estadios de *T. cruzi* mediante la técnica de Western blot (sección II.7.4 y II.7.6.2 de Materiales y Métodos). Además, comparando la intensidad de la señal generada por los anticuerpos anti-TcCox15 en relación a la señal anti-tubulina y anti-TcmPx (anti-triparredoxina peroxidasa mitocondrial de *T. cruzi*) se logró cuantificar el nivel relativo de TcCox15 entre los distintos estadios. En la figura 40.A se muestra la señal correspondiente a TcCox15 en los distintos estadios y en las figuras 40.B y C la cuantificación de las señales obtenidas. Las señales más intensas se obtuvieron en los estadios replicativos - epimastigotes y amastigotes - en comparación con el estadio infeccioso de tripomastigote, siendo mayor en epimastigote. Estos resultados son coherentes con la hipótesis de que esta enzima sería más activa en los estadios replicativos donde habría un requerimiento mayor de obtención de energía debido a la necesidad de mayor síntesis de los

diferentes componentes celulares durante la división celular. En cambio en el estadio de tripomastigote, los requerimientos de esta enzima serían menores o tal vez nulos. Mediante este análisis no podemos diferenciar si la señal más débil detectada en tripomastigotes se debe a que hay menor síntesis proteica por un menor requerimiento de la enzima o que la proteína detectada sea proteína residual sintetizada durante el estadio de amastigote. Esta relación concuerda con los datos obtenidos de estudios de transcriptoma determinado por microarreglos, donde se observó que la mayor expresión es en epimastigote, luego en amastigotes y por último en tripomastigotes, con Valores de expresión de 0,585; 0,376 y - 0,061 respectivamente (Minning *et al.*, 2009).



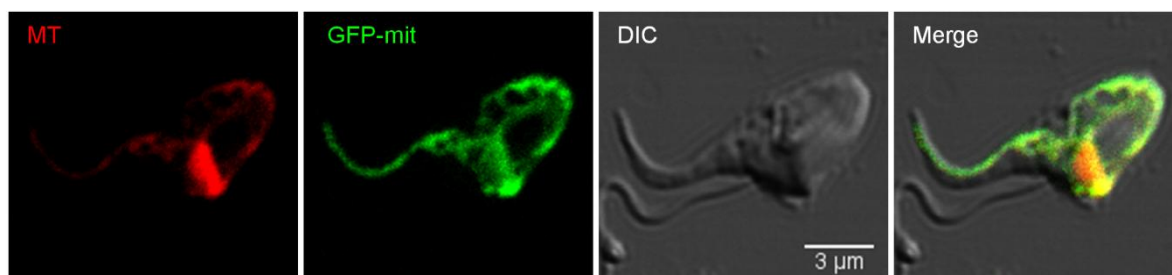
**Figura 40. La proteína TcCox15 es detectada en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.** Inmunoblot de extractos totales de los diferentes estadios de *T. cruzi* cepa Dm28c - tripomastigotes derivados de células, amastigotes intracelulares y epimastigotes – utilizando anticuerpos policlonales anti-TcCox15 (A). Como control negativo, se sembraron extractos de células Vero. Anticuerpos: anti-tubulina como control de carga de los extractos totales y anti-triparredoxina peroxidasa mitocondrial de *T. cruzi* (TcmPx) como control de carga de los extractos y como marcador mitocondrial. La intensidad de las bandas correspondientes a la señal de la proteína TcCox15 fue cuantificada y normalizada por la señal obtenida con los anticuerpos anti-tubulina (B) y con los anticuerpos anti-TcmPx (C). Los datos expresan el promedio  $\pm$  DS de tres cuantificaciones independientes realizadas, tomando como referencia la señal obtenida en epimastigote.

En cuanto a la regulación de TcCox15 en respuesta a distintos metabolitos, se evaluó la respuesta a la disponibilidad de hemo en epimastigotes. En la bibliografía está reportado que los niveles de Cox10 y Cox15 son independientes uno del otro en levaduras y se regulan de manera diferente. Se ha reportado que Cox15 responde a hemo y se incrementan un 10% los niveles de ARNm y 8 veces los niveles de proteína por el agregado de este (sección I.1.5.2 de Introducción) (Wang *et al.*, 2009). Cuando evaluamos el efecto de los análogos de hemo (AHs) sobre los niveles de hemoproteínas (20  $\mu$ M hemina, 5  $\mu$ M hemina y 5  $\mu$ M hemina + 15  $\mu$ M análogos de hemo) que se describen en la sección III.1.3.4, se estudió también como

eran afectados los niveles de TcCox15, y en las condiciones ensayadas no se determinaron cambios apreciables. Si bien no se evidenciaron cambios en la acumulación de TcCox15 en respuesta a la concentración de hemo, es posible que la regulación se ejerza a nivel de regulación de la actividad enzimática y no de la síntesis proteica (sección I.1.5.2 de Introducción).

#### **III.2.4. Detección y localización subcelular de la proteína TcCox15 en epimastigotes de *T. cruzi***

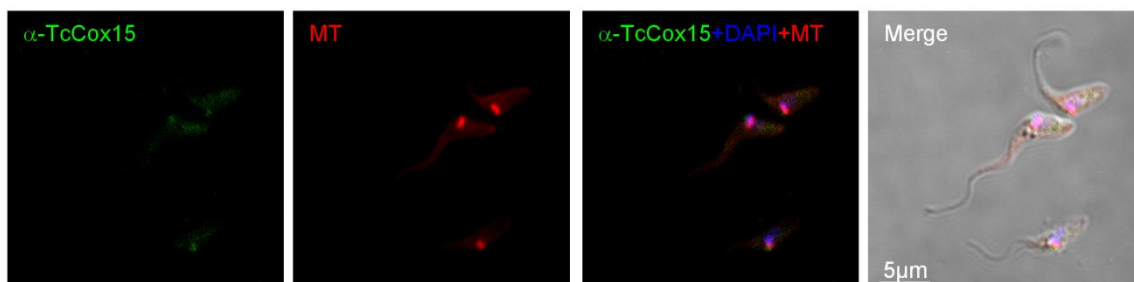
Previo a realizar los estudios de localización de TcCox15, se optimizó el marcaje de mitocondrias de epimastigotes con Mitotracker (Invitrogen), compuesto fluorescente que entra de forma pasiva a las células y al oxidarse se une a grupos sulfhidrilos, para lo cual se necesita incubar el compuesto con el parásito en estado vivo. Para esto, se ensayaron diferentes condiciones, concentraciones de 50 nM a 1  $\mu$ M de Mitotracker y tiempos de incubación de 30 y 60 min (sección II.9.2 de Materiales y Métodos); y luego se analizó la señal obtenida por microscopía de fluorescencia. Una incubación con 1  $\mu$ M Mitotracker por 60 min a 28 °C (temperatura de crecimiento de los epimastigotes), permitió una visualización de la señal característica de la única gran mitocondria que posee el parásito y que abarca gran parte de su volumen citoplasmático (figura 41). Como control, se utilizaron epimastigotes transfectados con pTEX.55aaTcCOX8-GFP<sup>7</sup> que expresan la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) fusionada a una señal de localización mitocondrial (sección II.6.1 y II.3.7 de Materiales y Métodos).



**Figura 41.** La tinción mitocondrial con Mitotracker fue validada en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Las imágenes de epimastigotes transfectados con pTEX.55aaTcCOX8-GFP e incubados con 1  $\mu$ M Mitotracker durante 60 minutos fueron obtenidas por microscopía confocal.

<sup>7</sup> Plásmido obtenido del laboratorio del Dr. Claudio A. Pereira (Instituto de Investigaciones Medicas Alfredo Lanari; IDIM-CONICET).

A partir de epimastigotes marcados con Mitotracker en las condiciones antes mencionadas, se intentó detectar a la TcCox15 endógena utilizando los anticuerpos anti-TcCox15 mediante Inmunofluorescencia Indirecta (sección II.9.3 de Materiales y Métodos). Sin embargo, la señal correspondiente a TcCox15 fue muy débil, lo que no nos permitió confirmar su localización subcelular (figura 42).



**Figura 42. La señal de inmunofluorescencia de TcCox15 en epimastigotes no permite asignar su localización celular.** Imágenes de microscopía confocal de un ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta sobre epimastigotes incubados con 1  $\mu$ M Mitotracker (MT), DAPI y anti-TcCox15, usando anti-IgG de ratón conjugados con FITC como anticuerpo secundario. La imagen es representativa de diferentes campos tomados de al menos tres experimentos independientes.

### **III.2.5. Localización de TcCox15 en epimastigotes que sobreexpresan el gen *TcCOX15* recombinante**

Debido a que mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta sobre epimastigotes no se logró confirmar la localización mitocondrial de TcCox15, se plantearon dos estrategias alternativas: una de ellas involucra la sobreexpresión de la proteína en el parásito como fusión a una cola de 6 histidinas C-terminal y detectarla mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta utilizando los anticuerpos anti-TcCox15 o anti-His, y la segunda involucra la sobreexpresión de TcCox15 fusionada a la proteína GFP en su extremo C-terminal y el posterior análisis de las imágenes de microscopía confocal.

#### **III.2.5.1. Evaluación de la expresión de *TcCOX15.HIS.GFP* para comprobar la localización subcelular de TcCox15**

En primer lugar se clonó la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP) de manera de generar una fusión C-terminal a la proteína TcCox15.His, generando la versión recombinante TcCox15.His.GFP. La secuencia génica que codifica para TcCox15.His.GFP se clonó en el vector regulable por metionina pRS426M25 para evaluar su

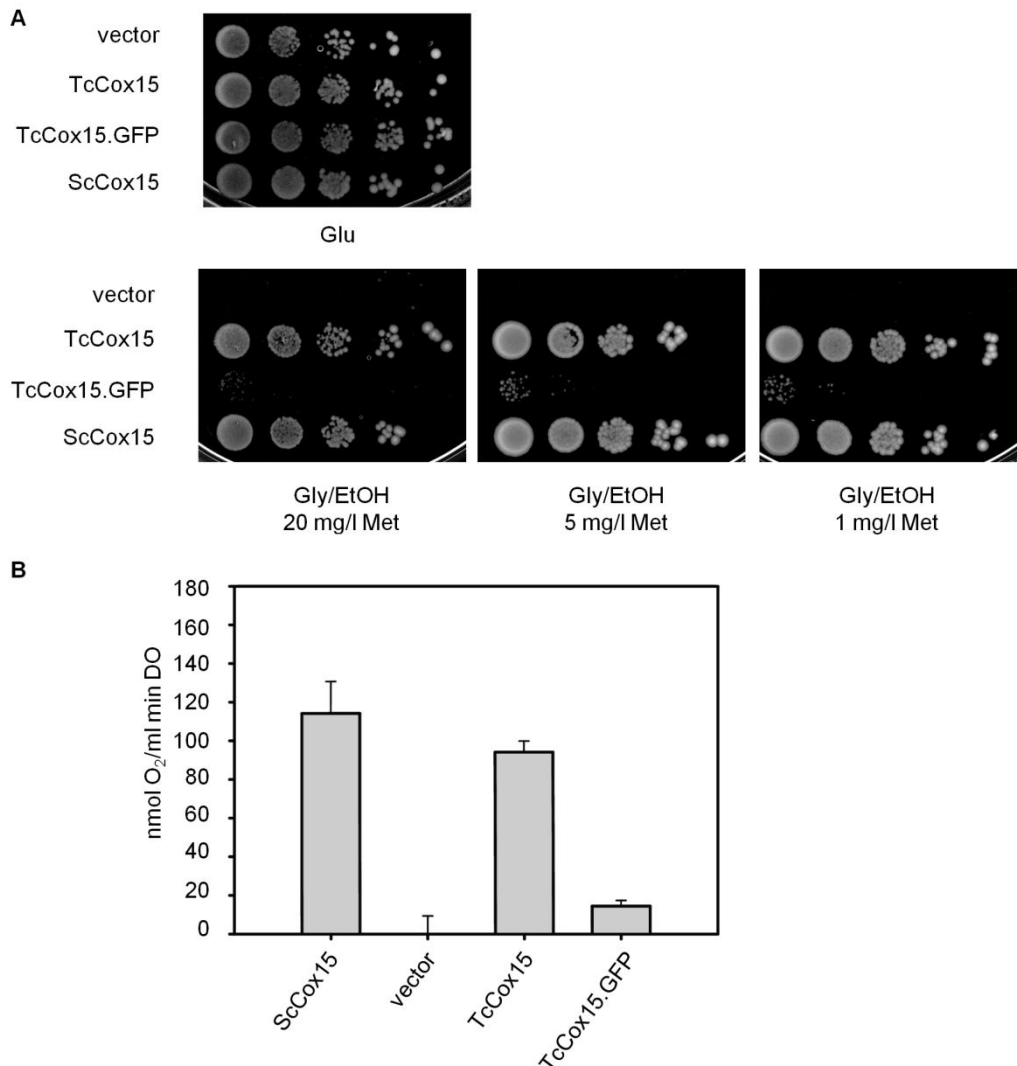
expresión en levaduras y en el vector inducible por tetraciclina pTcINDEX para evaluar su expresión en *T. cruzi* (secciones II.6.3.2 y II.6.3.3 de Materiales y Métodos).

La actividad HAS de TcCox15.His.GFP se analizó mediante ensayos de complementación en placa a partir de células de *S. cerevisiae cox15Δ* transformadas con el plásmido pRS426M25.TcCOX15.HIS.GFP (figura 43.A) (secciones II.6.1, II.3.4 y II.8.1 de Materiales y Métodos). Las levaduras *cox15Δ* no sintetizan hemo A, por lo tanto no tienen una CcO activa ni una cadena respiratoria funcional. Por esto las levaduras *cox15Δ* transformadas con el vector pRS426M25 solo crecieron utilizando fuentes de carbono fermentables como la glucosa y no lo hicieron en medios con fuentes no fermentables como el glicerol/etanol. Cuando se expresó COX15.HIS (el gen de levaduras) en las levaduras *cox15Δ* se revirtió la deficiencia respiratoria y las células crecieron en todas las condiciones ensayadas; lo mismo ocurrió y en igual medida expresando TcCOX15.HIS. Por el contrario, al expresar TcCOX15.HIS.GFP la reversión del fenotipo fue leve, se observó un crecimiento muy bajo en medio suplementado con glicerol/etanol incluso a baja concentración de metionina (el promotor MET25 se reprime con el aumento de la concentración de metionina, entonces en bajas concentraciones de metionina hay alta expresión del gen).

De forma complementaria se cuantificó el consumo de oxígeno de células de levaduras *cox15Δ* previamente crecidas en medio con glucosa (sección II.8.3 de Materiales y Métodos). Esta técnica ha mostrado en algunos casos ser más sensible que el ensayo de complementación en placa ya que permite detectar si hay actividad respiratoria aún cuando esta no sea suficiente para el crecimiento. En la figura 43.B se muestra que en el caso de las levaduras transformadas con el vector pRS426M25 el consumo fue nulo y en cambio este se restableció al expresar COX15.HIS y en igual medida con TcCOX15.HIS. En cambio al expresar TcCOX15.HIS.GFP el consumo de oxígeno fue un 20% en relación al consumo de las levaduras que expresan TcCOX15.HIS.

En un estudio presentado por Bareth y colaboradores realizados en *S. cerevisiae*, se reportó que la fusión de diferentes secuencias en el extremo C-terminal de Cox15 de levaduras impedía la interacción de la proteína con el intermediario temprano de ensamblado del complejo de la CcO formado por varias proteínas tales como Mss51, Coa3, Cox14, Cox1, Shy1, Cox5A, Cox6 y Cox1. Esto se observó por ensayos de Blue Native PAGE y de coimmunoprecipitación; sin embargo aún en estos casos no disminuyó la capacidad respiratoria de las células cuando se la ensayó por el método de complementación en placa

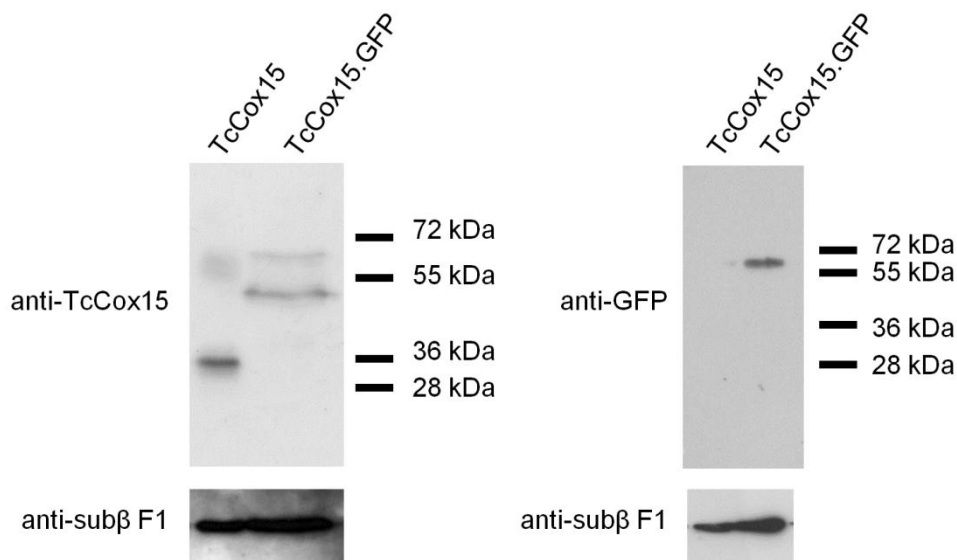
(Bareth *et al.*, 2013). Por otro lado Cox15 forma oligómeros (Bestwick *et al.*, 2010) y la formación de estos podría ser también afectada por el agregado de estas secuencias C-terminales. Estos antecedentes nos llevan a proponer que la adición de la proteína GFP en el extremo C-terminal de TcCox15, a diferencia de la adición solamente de la cola de 6 histidinas, afectaría la interacción con los diferentes intermediarios del ensamblado de la CcO o la formación de los propios oligómeros de TcCox15, afectando la actividad de la enzima o la entrega del hemo A a Cox1.



**Figura 43. La proteína recombinante TcCox15.His.GFP no mostró actividad HAS en levaduras.** A) Ensayo de complementación en placa utilizando *S. cerevisiae cox15Δ* transformadas con el vector pRS426M25 (vector), pRS426M25.*TcCOX15.HIS* (TcCox15), pRS426M25.*TcCOX15.HIS.GFP* (TcCox15.GFP) o pRS426M25.*COX15.HIS* (ScCox15). 7  $\mu$ l de diluciones seriadas 1/10 desde una dilución inicial de DO = 1 fue sembrada en medio sólido SCDO-U con glucosa como fuente de carbono fermentable (Glu) para control de las diluciones o glicerol/etanol (Gly/EtOH) como fuentes de carbono no fermentables para probar la capacidad respiratoria de las células. Se agregaron distintas concentraciones de metionina. B) Consumo de oxígeno en 3% glicerol de *S. cerevisiae cox15Δ* transformadas con los mismos plásmidos. El cultivo creció ON en medio SCDO-U con 2% p/v glucosa

como fuente de carbono y 10 mg/l metionina. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  DS de 3 agregados medidos del mismo preparado celular.

La presencia de la proteína TcCox15.His.GFP en extractos mitocondriales de *cox15* $\Delta$  se comprobó mediante un ensayo de Western blot utilizando los anticuerpos anti-TcCox15 (sección II.7.5 y II.7.6.2 de Materiales y Métodos). En la figura 44 se muestra la señal correspondiente a TcCox15.His usada como control en la primer calle y dos bandas de masas moleculares de aproximadamente 64 kDa y 51 kDa en la calle donde se sembró la muestra que contiene la proteína de fusión TcCox15.His.GFP. Además, se repitió el ensayo utilizando anticuerpos anti-GFP comerciales y se detectó una única banda de masa molecular de aproximadamente 63 kDa. La señal de masa molecular de 63 – 64 kDa correspondería a la proteína TcCox15.His.GFP. Esta sería la suma de las masas de TcCox15.His, la cual previamente se observó como una banda de masa molecular aproximada de 33 - 35 kDa (determinado en los ensayos de Western blot de la sección III.2.2) más la masa de la GFP de 27,17 kDa, determinado a partir de su secuencia proteica. Si bien TcCox15.His.GFP fue detectada en la fracción mitocondrial, no se descarta que la fusión a GFP altere la estabilidad de la proteína y debido a esto se detectó también una segunda señal más intensa correspondiente a una proteína de menor masa molecular.

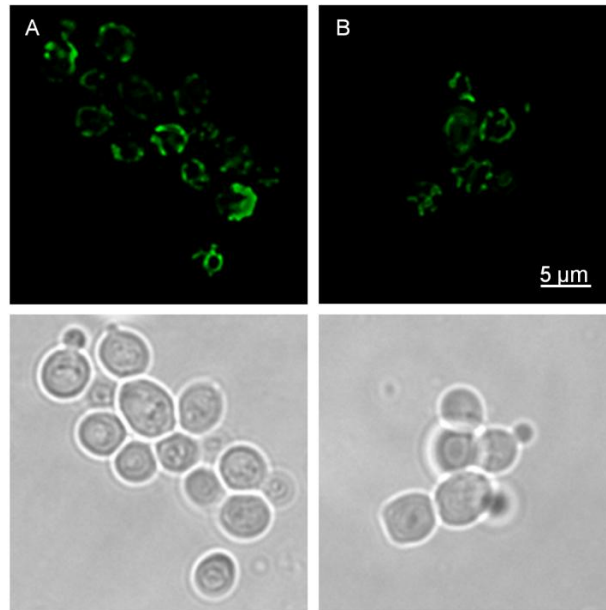


**Figura 44. La fusión a GFP C-terminal de la proteína TcCox15 afecta parcialmente la estabilidad de TcCox15.** Inmunoblot a partir de extractos crudos de mitocondria de levadura *cox15* $\Delta$  transformadas con pRS426M25.*TcCOX15.HIS* (TcCox15) o pRS426M25.*TcCOX15.HIS.GFP* (TcCox15.GFP), crecidas en medio selectivo SCDO-U con 0,2% p/v glucosa, 1,8% p/v galactosa y 2 mg/l metionina; utilizando anticuerpos anti-GFP, anticuerpos policlonales anti-TcCox15 y anticuerpos anti-subunidad  $\beta$  del complejo F1 de la ATPasa mitocondrial de levadura (anti-sub $\beta$  F1) como control de carga de los extractos mitocondriales.

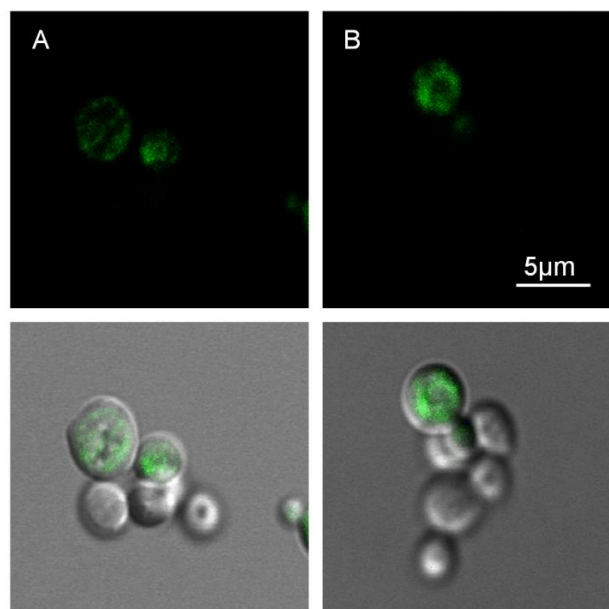
Además se analizó la localización de TcCox15.His.GFP por microscopía de fluorescencia. En la figura 45 se muestra un patrón típico de las mitocondrias de levaduras que se obtuvieron a partir de células transformadas con pYX142-*mtGFP* (Westermann y Neupert, 2000), un vector que expresa la GFP unida en su N-terminal a un péptido señal de direccionamiento mitocondrial (sección II.9.4 de Materiales y Métodos) y se comparó las imágenes obtenidas de células que contienen a la proteína de fusión TcCox15.His.GFP. Para analizar la localización de TcCox15.His.GFP, se crecieron las células de levadura *cox15Δ* transformadas con p4RS26M25.*TcCOX15.HIS.GFP* en medio sintético suplementado con diferentes fuentes de carbono (glucosa y glicerol/etanol) y se prepararon para observar al microscopio confocal (sección II.9.4 de Materiales y Métodos). En la figura 46 se muestran algunas imágenes de uno de los experimentos realizados. Si bien la señal correspondiente a la fluorescencia de GFP solo se aprecia en un bajo porcentaje de las células, esto se observó en todas las condiciones de crecimiento, siendo las células crecidas en glicerol/etanol las que poseían mayor señal tanto en el porcentaje de células con señal como en la intensidad de las mismas. Por otro lado, la mayoría de las células observadas no muestran un patrón de señal típico de mitocondria si se la compara con un patrón típico mitocondrial de levaduras (figura 45). Esto nos permite postular que no toda la proteína de fusión podría localizarse en la mitocondria o bien que parte de esta podría ser parcialmente degradada quedando la GFP fuera de la misma. Estas últimas suposiciones apoyarían los resultados obtenidos en los ensayos de complementación de función en placa y de Western blot (figuras 43 y 44).

Luego, nos propusimos evaluar si la presencia de TcCox15.His.GFP afectaría la función HAS de Cox15 de levaduras. Para ello se transformaron células *S. cerevisiae* salvajes (WT) con el plásmido pRS426M25.*TcCOX15.HIS.GFP* y con el plásmido pRS426M25.*TcCOX15.HIS* como control (secciones II.6.1 y II.3.4 de Materiales y Métodos) y se realizó un ensayo de complementación en placa (figura 47) (sección II.8.1 de Materiales y Métodos). Las levaduras WT sintetizan hemo A por lo tanto crecen en fuentes de carbono no fermentables. La expresión de *TcCOX15.HIS* no afectó el crecimiento en ninguno de los medios ensayados, pero por el contrario la expresión de *TcCOX15.HIS.GFP* disminuyó el crecimiento en medio sintético suplementado con glicerol/etanol como fuente de carbono y baja concentración de metionina (alta expresión del gen). Este resultado nos indicaría que TcCox15.His.GFP no sólo fue menos activa que la proteína sin la fusión a GFP, sino que afecta el normal funcionamiento de Cox15 (el gen de levadura) en la mitocondria, generando un efecto

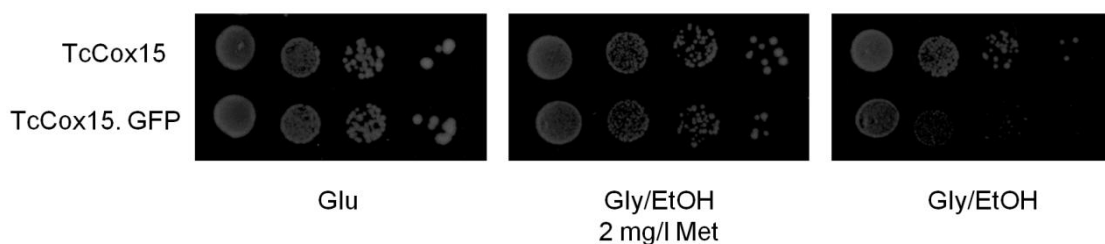
dominante negativo, lo que confirmaría la posible disrupción de los complejos que intervienen en el ensamblado de la CcO o la misma oligomerización de Cox15.



**Figura 45. Mitochondrias de levadura marcadas con GFP.** Imágenes deconvolucionadas de microscopía de fluorescencia de células de *S. cerevisiae* WT transformadas con pYX142-*mtGFP* crecidas ON en medio SCDO-L y utilizando diferentes fuentes de carbono: fermentable - glucosa (A)- y no fermentable - glicerol/etanol (B). Las imágenes son representativas de diferentes campos tomados de dos experimentos independientes. Si bien en nuestras muestras no se logra apreciar una diferencia apreciable entre las mitocondrias de levaduras crecidas en medio fermentable y no fermentable, está reportado que al crecer en etanol las levaduras tienen mayor número de mitocondrias (20 – 30) de menor tamaño y redondeadas en relación a cuando crecen en glucosa (Visser *et al.*, 1995).



**Figura 46. TcCox15.His.GFP no localiza únicamente en mitocondrias de levaduras.** Imágenes de microscopía confocal de células de *S. cerevisiae* *cox15*Δ transformadas con p4RS26M25-*TcCOX15.HIS.GFP* crecidas ON en medio SCDO-U, 20 mg/l metionina y utilizando diferentes fuentes de carbono: fermentables - glucosa (A) - y no fermentable – glicerol/etanol (B). Las imágenes son representativas de diferentes campos tomados de dos experimentos independientes.

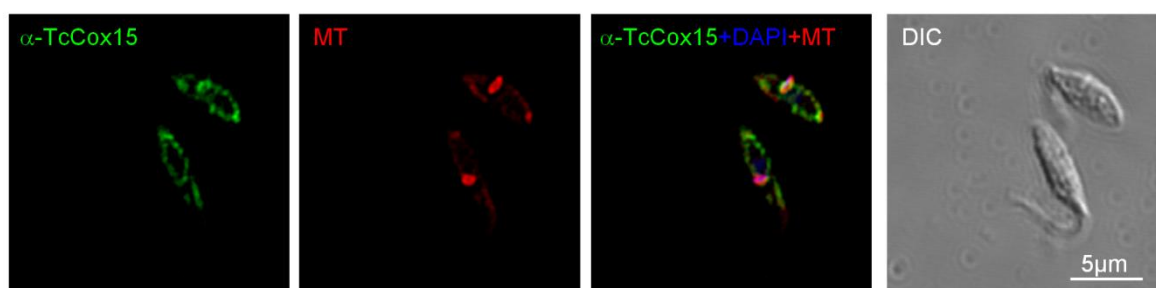


**Figura 47. TcCox15.His.GFP ejerce un efecto dominante negativo sobre el crecimiento de levaduras salvajes.** Ensayo de complementación en placa utilizando *S. cerevisiae* salvajes (WT) transformadas con el vector pRS426M25.*TcCOX15.HIS* (TcCox15) o pRS426M25.*TcCOX15.HIS.GFP* (TcCox15.GFP). 7  $\mu$ l de diluciones seriadas 1/10 desde una dilución inicial de DO = 1 fue sembrada en medio sólido SCDO-U con glucosa como fuente de carbono fermentable (Glu) para control de la diluciones o glicerol/etanol (Gly/EtOH) como fuentes de carbono no fermentables para probar la capacidad respiratoria de las células. Se agregaron distintas concentraciones de metionina.

Luego a pesar de las evidencias obtenidas en levaduras, se decidió evaluar la expresión en epimastigotes de *T. cruzi*. Para esto se realizó el protocolo de transfección de epimastigotes (Dm28c.pLEW13) con el vector pTcINDEX.*TcCOX15.HIS.GFP* (sección II.6.1 y II.3.7 de Materiales y Métodos). Se realizaron distintos eventos de electroporación y posterior proceso de selección, pero no fue posible obtener transfectantes estables. Incluso en algunos casos las células transfectadas con este plásmido detuvieron su crecimiento antes que lo hicieran las células control electroporadas en ausencia de ADN. Como control positivo de la transfección se utilizó el vector pTcINDEX.*TcCOX15.HIS* (que se describe en la próxima sección) y se obtuvieron transfectantes estables en la mayoría de los casos. Esto apoyaría la hipótesis de que la expresión de la fusión de TcCox15.His a GFP no solo afectaría la actividad de la proteína fusión, sino que también la actividad de la proteína endógena del parásito como se observó al expresarla en levaduras WT (figura 47). Si bien el vector utilizado es regulable por tetraciclina, existe una expresión basal en ausencia del inductor (expresión *leaky*) y esto podría justificar la imposibilidad de obtener epimastigotes transfectantes. La fusión voluminosa C-terminal podría alterar la formación de los oligómeros activos de TcCox15 nativa del parásito o la interacción de estos con el ensamblado de la CcO y la entrega del hemo A a la misma, ya que se formarían complejos mixtos de TcCox15 nativa y TcCox15.His.GFP.

### **III.2.5.2. Evaluación de la expresión de *TcCOX15.HIS* y posterior análisis de la localización subcelular de TcCox15**

Trabajos previos a esta tesis mostraron que la expresión de la proteína recombinante TcCox15.His en levaduras resultó activa (Buchensky *et al.*, 2010) y esto también fue corroborado en los ensayos que se muestran en la figura 43. Entonces, como alternativa para estudiar la localización de TcCox15, la secuencia *TcCOX15.HIS* se clonó en el vector pTcINDEX y se transfectaron epimastigotes Dm28c.pLEW13 con el plásmido resultante (pTcINDEX.*TcCOX15.HIS*) (secciones II.6.1, II.6.3.4 y II.3.7 de Materiales y Métodos). Una vez obtenidos epimastigotes transfectantes estables, se indujo la expresión del gen con el agregado del inductor (0,05  $\mu\text{g/ml}$  tetraciclina), se marcaron las mitocondrias con Mitotracker y luego se utilizaron los anticuerpos anti-TcCox15 para analizar la localización celular de TcCox15 mediante de técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (sección II.9.2 y II.9.3 de Materiales y Métodos). En la figura 48 se muestran las imágenes registradas por microscopía confocal donde se observa que la señal de fluorescencia verde intensa correspondiente a TcCox15 se superpone con la señal roja del Mitotracker. Este resultado nos permite proponer que TcCox15 se encuentra en la mitocondria de *T. cruzi* como las HAS ya caracterizadas de organismos eucariotas.



**Figura 48. La proteína TcCox15 localiza en la mitocondria de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.** Imagen deconvolucionada de microscopía confocal obtenida por Inmunofluorescencia Indirecta sobre epimastigotes transfectados con pTcINDEX.*TcCOX15.HIS* inducidos con 0,05  $\mu\text{g/ml}$  tetraciclina durante 3 días, incubados luego 1 h con 1  $\mu\text{M}$  Mitotracker (MT) y tratados con anticuerpos policlonales de conejo anti-TcCox15 y anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con FITC. La imagen es representativa de múltiples campos tomados de tres experimentos independientes. Coeficientes del análisis de colocalización (rojo:verde): coeficiente de correlación de Pearson's 0,972 y coeficientes de superposición de Manders 0,895 y 0,924.

### **III.2.6. Estudio del rol de TcCox15 en la síntesis de hemo A de *T. cruzi***

El hemo A se sintetiza únicamente para la CcO, debido a ello es probable que su síntesis esté regulado en función de su demanda y los estudios realizados en *S. cerevisiae* apoyan esta hipótesis (Wang *et al.*, 2009). Por otro lado se ha demostrado que las enzimas

involucradas - HOS y HAS - formarían distintos complejos multiproteicos relevantes para su actividad. Los estudios realizados por Brown y colaboradores mostraron que las proteínas HOS y HAS de *B. subtilis* y de *R. sphaeroides* interactúan entre sí cuando se expresan en un organismo heterólogo (Brown *et al.*, 2004a). Por otro lado, Bestwick y colaboradores mostraron que ambas proteínas forman oligómeros para ser funcionales en *S. cerevisiae* (Bestwick *et al.*, 2010). Además, se mostró que Cox15 interacciona con los intermediarios tempranos de ensamblado de la CcO (Bareth *et al.*, 2013). Parte de los objetivos planteados para este trabajo de tesis fueron validar la participación de TcCox15 en la síntesis de hemo A en *T. cruzi* y evaluar su relevancia en el ciclo de vida del parásito.

Algunas estrategias validadas para estudiar la función de un gen determinado en un organismo involucran técnicas de genética reversa, es decir anular el producto del gen y evaluar el fenotipo resultante. Las técnicas comúnmente utilizadas para este tipo de análisis no son aplicables en *T. cruzi*. Por ejemplo no se han reportado la realización con éxito de mutantes condicionales en genes esenciales ni *knockdown* de genes mediante ARN de interferencia. *T. cruzi*, al igual que algunas especies de *Leishmania*, es ARNi negativo, es decir que la introducción de ARN doble hebra no desencadena la degradación del ARNm blanco. Esto es consistente con no encontrarse en su genoma un ortólogo a AGO1, que es el encargado de formar el complejo de reconocimiento del ARNm blanco junto a los ARN pequeños de interferencia (Ullu *et al.*, 2004). Debido a esto, una estrategia utilizada es la sobreexpresión de genes en trans (salvajes, mutantes puntuales o versiones truncadas) y analizar el efecto de esto en el parásito. Entonces, para tratar de alcanzar estos objetivos se diseñaron y construyeron distintas mutantes puntuales de TcCox15 en residuos conservados y se evaluó si estos eran esenciales para la actividad enzimática. Luego, para analizar el rol de TcCox15 en la síntesis de hemo A y su esencialidad en *T. cruzi*, se evaluó el efecto causado por la sobreexpresión de las versiones salvaje y mutantes no funcionales de TcCox15 en el parásito.

#### **III.2.6.1. Diseño y construcción de mutantes puntuales en residuos conservados de TcCox15**

Para profundizar el estudio de TcCox15 se diseñaron y construyeron mutantes puntuales en residuos conservados de histidinas mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigido. Como se mencionó en la sección III.2.1, la secuencia de TcCox15 posee las 3

histidinas conservadas que resultaron relevantes para la actividad: H129, H206 y H307 según la numeración de *T. cruzi* que corresponden a H60, H123 y H216 de CtaA de *B. subtilis*, respectivamente. Estos residuos se encontrarían en los 2 sitios de unión a hemo propuestos para las HAS, uno que uniría al hemo O/hemo A que son su sustrato/producto y otro que uniría el hemo B que funcionaría como cofactor (Hederstedt, 2012; Hederstedt *et al.*, 2005). Cuando el sitio activo de una enzima o el sitio de unión a su cofactor se modifican, es frecuente que la estabilidad de la misma se altere. Se ha reportado que diferentes mutaciones puntuales en CtaA alteran la actividad, la estabilidad y la unión a hemo de esta proteína. Algunas sustituciones (H60M y H216M) son activas, otras sustituciones (H60L, H60A, H123L y H123M, y H123A) solo afectan la actividad HAS mientras que hay un tercer grupo de sustituciones (H216L y H216A) que afectan la estabilidad de la enzima y en consecuencia también la actividad enzimática (Hederstedt *et al.*, 2005; Mogi, 2009b). Hederstedt y colaboradores eligieron realizar el reemplazo de las histidinas por metionina y leucina (Hederstedt *et al.*, 2005) basados en estudios previos realizados por Matsson y colaboradores con mutantes en citocromos de membrana que resultaron exitosos en cuanto a generar proteínas estables sin actividad pero con hemo unido. La metionina puede actuar como ligando axial del hemo al igual que las histidinas y debido a esto afectarían menos la estabilidad de las proteínas (Matsson *et al.*, 2000). Con estos antecedentes, se decidió en una primera etapa estudiar el efecto que producía sobre la actividad de TcCox15 el reemplazo por alanina de las tres histidinas conservadas. En caso de observar efectos sobre la estabilidad de TcCox15, analizaríamos la sustitución de esos mismos residuos de histidinas por leucina o metionina de manera similar a lo realizado por Hederstedt y colaboradores en CtaA (Hederstedt *et al.*, 2005).

Como se detalla en la sección II.6.3.4 de Materiales y Métodos, se construyeron mediante mutagénesis sitio dirigido las mutantes puntuales TcCox15H129A.His, TcCox15H206A.His y TcCox15H307A.His sobre la secuencia del gen *TcCOX15* proveniente de la cepa Dm28c que fue previamente amplificada y clonada en el laboratorio como fusión a una cola de 6 histidinas (*TcCOX15.HIS*). Una vez obtenidas y verificadas las secuencias *TcCOX15H129A.HIS*, *TcCOX15H206A.HIS* y *TcCOX15H307A.HIS*, se subclonaron en el vector de expresión en levaduras pRS426M25 (Buchensky *et al.*, 2010) y en el vector de expresión en *T. cruzi* pTcINDEX (Taylor y Kelly, 2006).

### **III.2.6.2. Análisis de la actividad HAS de las mutantes de TcCox15 en *Saccharomyces cerevisiae* *cox15*Δ**

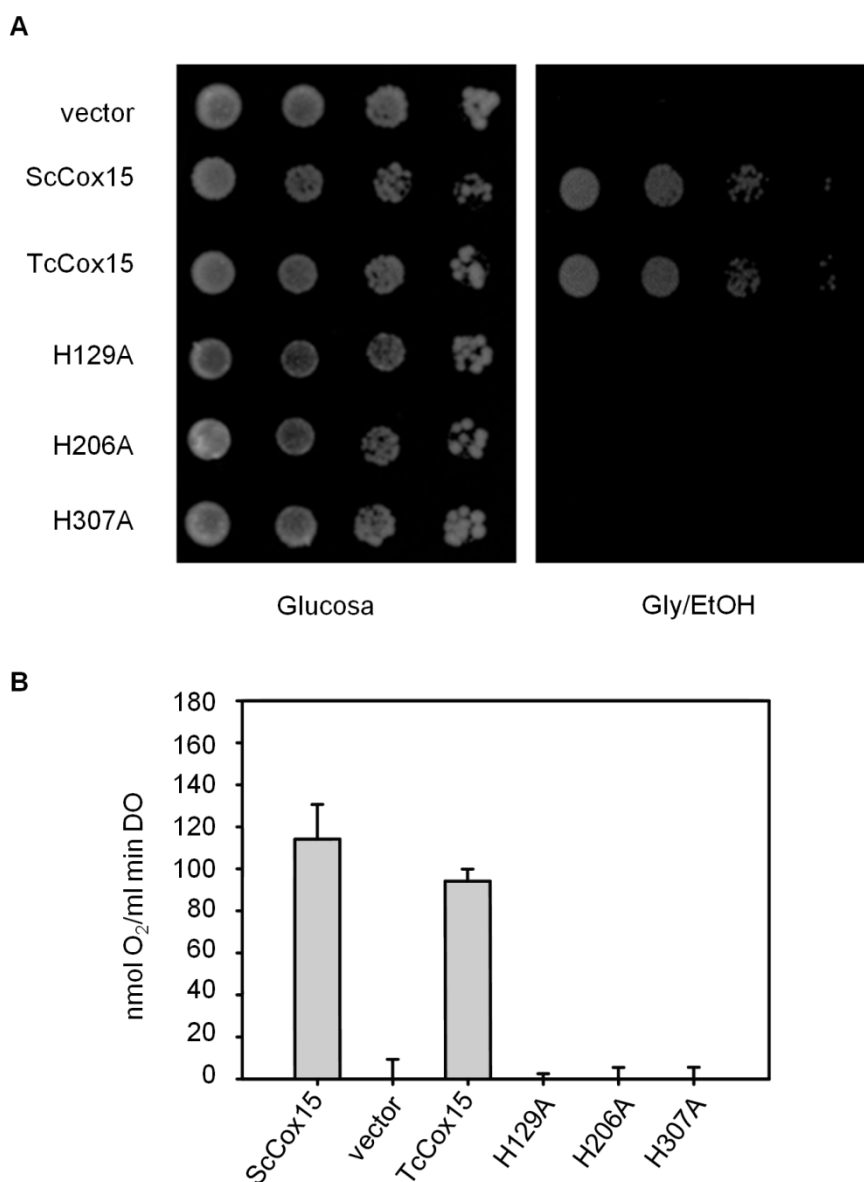
En primer lugar se evaluó la actividad de las mutantes TcCox15H129A.His, TcCox15H206A.His y TcCox15H307A.His en *S. cerevisiae* *cox15*Δ. Para esto se transformaron las levaduras *cox15*Δ con los diferentes plásmidos derivados del vector pRS426M25 (secciones II.6.1 y II.3.4 de Materiales y Métodos).

De manera similar a los estudios previos realizados en el laboratorio se llevaron a cabo los ensayos de complementación de actividad en placa (Buchensky *et al.*, 2010) (sección II.8.1 de Materiales y Métodos). En la figura 49.A se observa que las levaduras transformadas con el vector pRS426M25 (control negativo) no revirtieron el fenotipo respiratorio. Las levaduras que expresan *COX15.HIS* o *TcCOX15.HIS* crecieron en glicerol/etanol, revirtiendo el fenotipo respiratorio. Por último, las levaduras que expresan las versiones mutantes del gen *TcCOX15* no revirtieron la deficiencia respiratoria de las células *cox15*Δ. Además se realizaron mediciones de consumo de oxígeno como se describe en la sección II.8.3 de Materiales y Métodos y que se muestran en la figura 49.B. Este ensayo confirma que las enzimas mutantes TcCox15H129A.His, TcCox15H206A.His y TcCox15H307A.His no pudieron restablecer el consumo de oxígeno de las células *cox15*Δ, contrariamente a lo que sucede cuando se expresa el gen *TcCOX15.HIS* salvaje, confirmando que estas no presentan actividad HAS.

Para verificar que las enzimas mutantes no tenían su actividad catalítica pero mantenían su estabilidad, se verificó la presencia de las mutantes de TcCox15.His mediante ensayos de Western blot sobre fracciones mitocondriales utilizando anticuerpos comerciales anti-His y anti-TcCox15 (secciones II.7.2 y II.7.6.2 de Materiales y Métodos). Como se muestra en la figura 50, se detectó una banda de masa molecular aproximada a la que presenta la proteína TcCox15.His salvaje en las calles que corresponden a extractos mitocondriales que contienen a las mutantes de TcCox15.His.

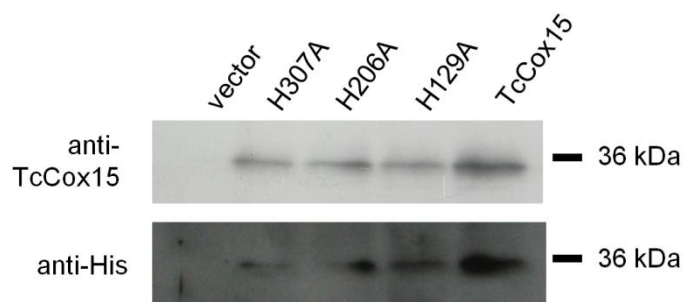
Estos ensayos nos permitieron confirmar que la falta de actividad respiratoria en células *cox15*Δ que contienen las versiones mutantes de TcCox15 se debió a la falta de actividad HAS de estas mutantes. Posteriormente, se decidió analizar si la presencia de estas versiones no funcionales de TcCox15 afectaba la actividad HAS de Cox15 de levaduras en un entorno salvaje; para ello se transformaron levaduras salvajes (WT) con los plásmidos derivados del vector pRS426M25 que expresan el gen *TcCOX15.HIS* y las versiones mutantes

*TcCOX15H129A.HIS*, *TcCOX15H206A.HIS* y *TcCOX15H307A.HIS* (sección II.3.4 de Materiales y Métodos). El ensayo de complementación de función en placa se realizó como se describe en el apartado II.8.1 de Materiales y Métodos y no se observó ningún efecto sobre el crecimiento de las células salvajes debido a la presencia de las versiones no funcionales de TcCox15.His. En resumen, no observamos un efecto dominante negativo debido a la expresión de las proteínas mutantes no funcionales en un entorno genético salvaje.



**Figura 49. Las histidinas conservadas de TcCox15 son esenciales para la actividad HAS de TcCox15 en *S. cerevisiae cox15Δ*.** A) Ensayo de complementación en placa utilizando *S. cerevisiae cox15Δ* transformadas con el vector pRS426M25 (vector), pRS426M25.*COX15.HIS* (ScCox15), pRS426M25.*TcCOX15.HIS* (TcCox15), pRS426M25.*TcCOX15H129A.HIS* (H129A), pRS426M25.*TcCOX15H206A.HIS* (H206A) y pRS426M25.*TcCOX15H307.HIS* (H307A). 7  $\mu$ l de diluciones seriadas 1/10 desde una dilución inicial de DO = 1 fue sembrada en medio sólido SCDO-U con 20 mg/ml metionina y con glucosa como fuente de carbono fermentable (Glu) para control de la diluciones o glicerol/etanol (Gly/EtOH) como fuentes de carbono no fermentables para probar la capacidad respiratoria de las células. B) Consumo de oxígeno en 3% v/v glicerol de *S. cerevisiae*

*cox15Δ* transformadas con los mismos plásmidos. El cultivo creció ON en medio SCDO-U con 2% p/v glucosa como fuente de carbono y 10 mg/l metionina. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  DS de 3 agregados medidos del mismo preparado celular.



**Figura 50. Las proteínas mutantes de TcCox15.His están presentes en extractos mitocondriales de *S. cerevisiae cox15Δ*.** Inmunoblot de extractos de mitocondria de levadura *cox15Δ* transformadas con el vector pRS426M25 (vector), pRS426M25.*TcCOX15.HIS* (TcCox15), pRS426M25.*TcCOX15H129A.HIS* (H129A), pRS426M25.*TcCOX15H206A.HIS* (H206A) y pRS426M25.*TcCOX15H307.HIS* (H307A), crecidas en medio selectivo SCDO-U con 2% p/v glucosa y 20 mg/l metionina; utilizando anticuerpos anti-His y anticuerpos policlonales de conejo anti-TcCox15.

Con estos resultados podemos concluir que las mutaciones introducidas en TcCox15 afectaron la función de la enzima, confirmando que los residuos modificados son esenciales para su actividad al igual que lo reportado en los ensayos realizados con la HAS de *B. subtilis* (Hederstedt *et al.*, 2005; Mogi, 2009b). Además, las mutaciones introducidas no alteraron de forma apreciable la estabilidad de la proteína, por lo cual estas resultan una herramienta interesante para evaluar la función de TcCox15 en el organismo nativo, el parásito *T. cruzi*.

### **III.2.6.3. Análisis de la sobreexpresión del gen *TcCOX15.HIS* salvaje y mutantes en epimastigotes de *T. cruzi***

Para estudiar la síntesis de hemo A en el parásito se transfectaron epimastigotes de *T. cruzi* cepa Dm28c.pLEW13 con los plásmidos que contienen los genes salvaje y mutantes de *TcCOX15* en el vector pTcINDEX (secciones II.6.1 y II.3.7 de Materiales y Métodos). Luego del proceso de selección, se obtuvieron los parásitos transfectados con los diferentes plásmidos que mostraron un patrón de crecimiento similar en el medio de cultivo utilizado en ausencia de inducción. En el caso de los parásitos transfectados con pTcINDEX.*TcCOX15H206A.HIS*, estos presentaban un crecimiento disminuido en comparación con el presentado por las otras líneas transfectantes y por esto se decidió excluirlos de los estudios posteriores.

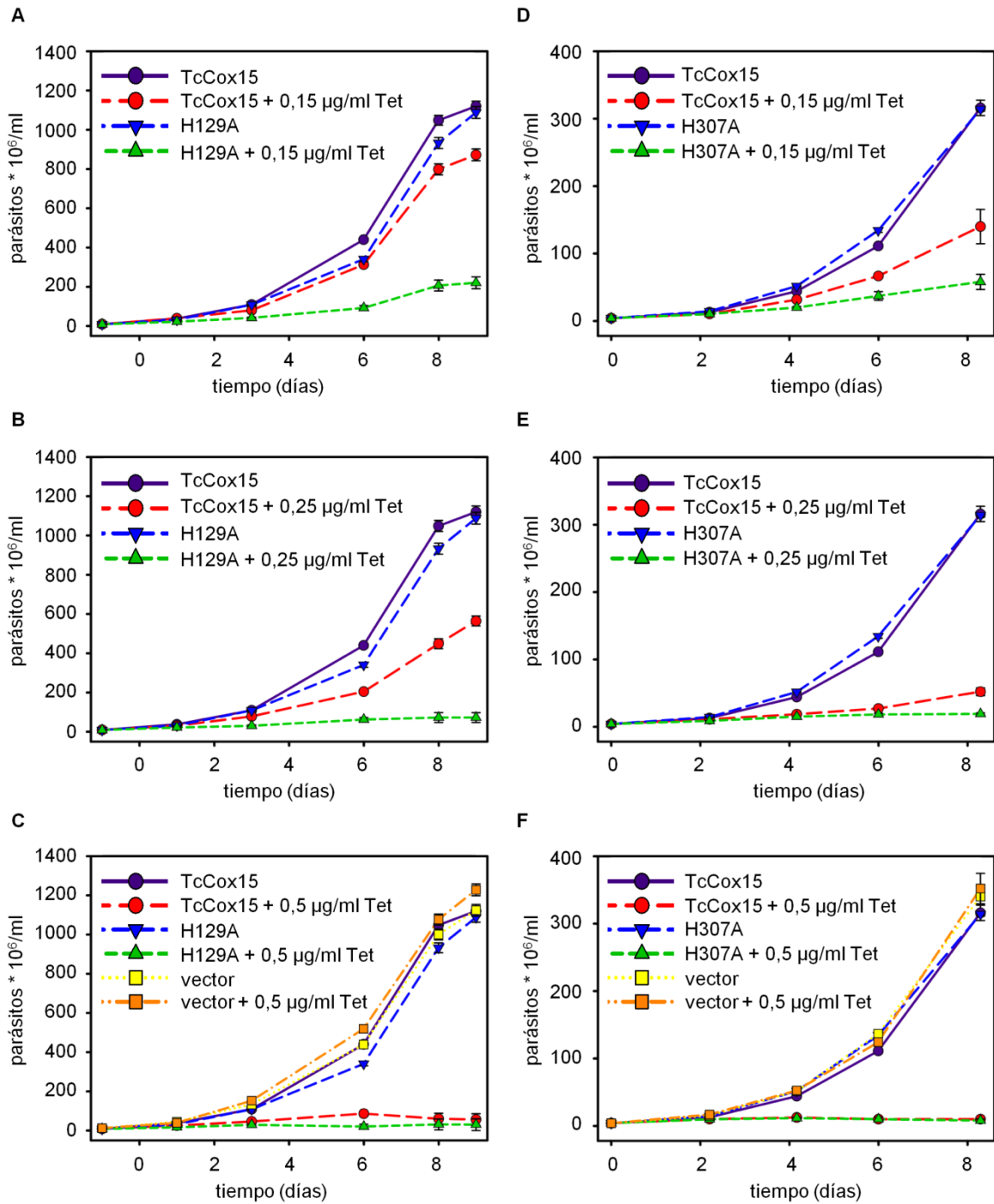
Taylor y Kelly reportaron que la inducción de proteínas desde el vector pTcINDEX aumenta durante las primeras 48 h y luego disminuye gradualmente. Además, se reportó

que la inducción de la expresión es dependiente de la concentración de tetraciclina: con 0,005 µg/ml de tetraciclina se observa un aumento de la expresión respecto de la expresión basal del gen, la inducción aumenta luego abruptamente y alcanza un máximo de expresión con concentraciones de 0,05 a 0,5 µg/ml de tetraciclina, observándose poca diferencia en este último rango de concentraciones; y luego la inducción disminuye a la mitad a concentraciones de 1 y 2 µg/ml de tetraciclina, pero a su vez la expresión se torna irreproducible. Por otro lado, el agregado de mayores concentraciones de tetraciclina causa un aumento en el tiempo de duplicación de los epimastigotes (Taylor y Kelly, 2006). Por otro lado, Moullan y colaboradores reportaron que la deoxiciclina, análogo de la tetraciclina pero más estable, tiene efectos en la traducción de proteínas mitocondriales en algunos organismos estudiados. En distintas líneas celulares las concentraciones de 0,5 a 1 µg/ml de deoxiciclina producen un desbalance a nivel de proteínas mitocondriales y además se produce una disminución de la respiración en un 50% con el agregado de una concentración de 6,3 µg/ml de deoxiciclina. El mismo fenómeno se observa en otros organismos (*Drosophila melanogaster*, *C. elegans*, *A. thaliana* y *Mus musculus*) pero utilizando concentraciones de deoxiciclina de 1 a 25 µg/ml (Moullan *et al.*, 2015). Por estos motivos, en cada ensayo se utilizó como inductor la menor concentración de tetraciclina que permitió observar un fenotipo en el parásito, de manera que el efecto observado sea debido a la inducción de las proteínas en estudio y no por el agregado de tetraciclina. Se utilizaron parásitos transfectados con el vector pTcINDEX como control del agregado de tetraciclina, los cuales fueron sometidos a las mismas (o mayores) concentraciones de tetraciclina que los parásitos que contenían los genes *TcCOX15.HIS* y las mutantes.

La inducción de los genes *TcCOX15.HIS* y versiones mutantes (TcCox15HxxxA.His; xxx: 129 o 307) se evaluó agregando tetraciclina a distintas concentraciones (0,05; 0,15; 0,25 y 0,5 µg/ml) y siguiendo el crecimiento de los parásitos como se describe en la sección II.8.2. En las figuras 51.C y F se observa que el agregado de la máxima concentración de tetraciclina (0,5 µg/ml) no afectó el crecimiento de los parásitos transfectados con el vector pTcINDEX utilizados como control. La inducción de la expresión génica mediante el agregado de 0,05 µg/ml tetraciclina no afectó el crecimiento de ninguna de las líneas transfectadas (dato no mostrado). En cambio, utilizando mayores concentraciones de tetraciclina (0,15 y 0,25 µg/ml) se observó un efecto negativo de diferente magnitud en el crecimiento de los epimastigotes si el gen sobreexpresado correspondía a la versión salvaje de TcCox15.His o de

las mutantes no funcionales (TcCox15Hxxx.His). Como se observa en las figuras 51.A, B, D y E el efecto negativo causado por la expresión de TcCox15Hxxx.His fue mayor que el causado por la expresión de la forma salvaje, siempre comparados con la condición sin inducir. Por otro lado, el agregado de 0,5 µg/ml tetraciclina causó un severo efecto negativo en el crecimiento de todas las líneas sobreexpresantes (figura 51.C y F). En esta condición se observó también que la morfología de los epimastigotes se afectó severamente independientemente de la proteína que fue sobreexpresada. Esto nos permite proponer en primer lugar que la acumulación no controlada de una proteína transmembrana mitocondrial sería letal para el parásito y la sobreexpresión de mutantes no funcionales de TcCox15 afecta el crecimiento de epimastigotes.

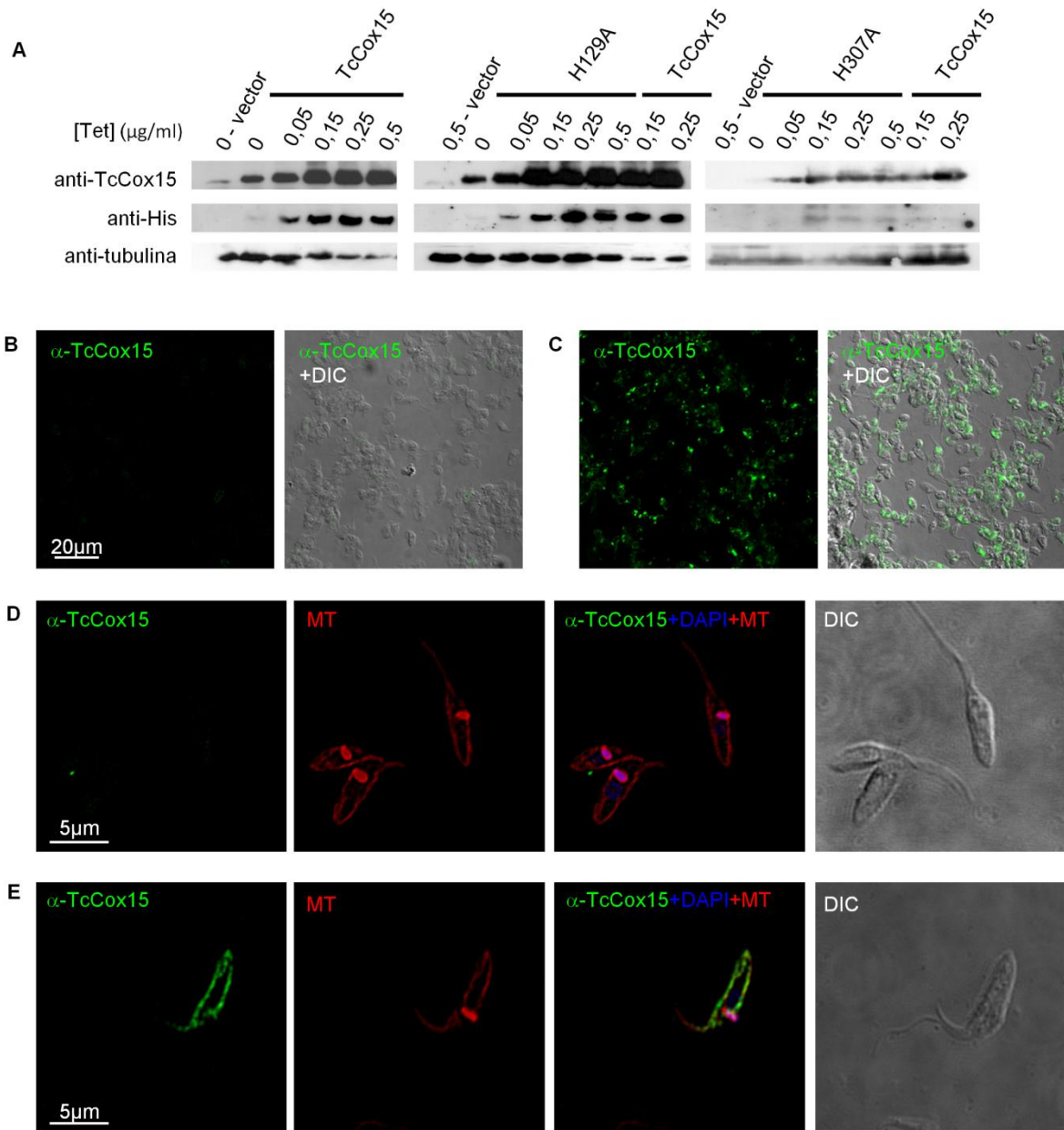
Durante este trabajo hemos observado que después de 3 a 6 meses de mantener ciertas líneas de epimastigotes transfectadas en cultivo, la sobreexpresión de los genes disminuía y se perdía el fenotipo en el crecimiento recién descrito. Este fenómeno se manifestó especialmente en las líneas transfectadas con los genes que codificaban para las proteínas mutantes. Suponemos que la expresión basal sin inductor (expresión *leaky*) de estos genes tiene un leve efecto negativo en los parásitos que llevan a la selección de los epimastigotes que tengan reducida la expresión de los genes introducidos o que habría algún mecanismo de silenciamiento. Es por esto que en todos los ensayos descritos siempre se verificó que la línea de parásitos transfectada mantenga el efecto negativo en el crecimiento ante el agregado de tetraciclina, en especial con el agregado de 0,5 µg/ml que resultó letal para las líneas transfectantes; además de verificar la acumulación de proteínas de interés mediante la técnica de Western blot e Inmunofluorescencia indirecta. La disminución total en el crecimiento del cultivo indicaría que prácticamente toda la población de epimastigotes fue capaz de sobreexpresar los genes en estudio (aunque en el proceso de selección de transfectantes no se realizó una selección clonal).



**Figura 51. La presencia de las versiones mutantes TcCox15.His afectan el crecimiento de epimastigotes.** Curva de crecimiento de epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX (vector), pTcINDEX.*TcCOX15.HIS* (TcCox15) y pTcINDEX.*TcCOX15H129A.HIS* (H129A) (A, B y C) o pTcINDEX.*TcCOX15H307A.HIS* (H307A) (D, E y F) inducidos con 0,15; 0,25 o 0,5 µg/ml tetraciclina al día 0. Las células son mantenidas en fase exponencial de crecimiento por diluciones 1/2 cada 2 días. Los datos son expresados como el promedio ± DS de tres replicas independientes de cada condición.

Además, se determinó la cantidad de proteína sobreexpresada en función de la concentración de tetraciclina agregada mediante ensayos de Western blot (secciones II.7.3 y

II.7.6.2 de Materiales y Métodos). Teniendo en cuenta que Taylor y Kelly reportaron que se necesita 48 h de inducción para llegar al máximo de expresión (Taylor y Kelly, 2006) y como en nuestros ensayos la sobreexpresión de *TcCOX15HxxxA.HIS* afectaba severamente el crecimiento de los epimastigotes a partir del tercer o cuarto día de inducción, las muestras para hacer los extractos totales se tomaron 3 días posteriores a la inducción. En la figura 52.A se muestra el resultado obtenido mediante la técnica de Western blot donde se observa la señal correspondiente a la proteína TcCox15 endógena del parásito en las calles que corresponden a los extractos de epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX, cuando se utilizaron los anticuerpos anti-TcCox15 como anticuerpos primarios. En las calles correspondientes a extractos que provienen de las tres líneas transfectantes – *TcCOX15.HIS* y *TcCOX15HxxxA.HIS* – se observó una expresión basal sin el agregado de tetraciclina, y en todos estos casos se muestra que el aumento de la concentración de tetraciclina (0,05; 0,15; 0,25 y 0,5 µg/ml) está acompañado por un aumento en la intensidad de la señal correspondiente a la proteína, fenómeno que fue similar en las distintas líneas. Hay que destacar que aún en las condiciones de menor agregado de tetraciclina ensayado (0,05 µg/ml), también se observó un aumento de la intensidad de la señal correspondiente a TcCox15.His, aunque en estas condiciones el crecimiento de los epimastigotes no fue afectado. También se verificó la sobreexpresión de las distintas formas de TcCox15 mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (sección II.9.3 de Materiales y Métodos). En las figuras 52.B y C se muestran las imágenes de microscopía confocal obtenidas de epimastigotes transfectados con pTcINDEX.*TcCOX15H129A.HIS* en condiciones de ausencia de inducción y de inducción (0,25 µg/ml de tetraciclina), observándose la señal fluorescente verde correspondiente a la proteína mutante. Por otro lado, en la figura 52.E se observa que la señal correspondiente a TcCox15H129A.His se superpone con la señal de Mitotracker (secciones II.9.2 y II.9.3 de Materiales y Métodos), hecho que indica que la proteína se localizaría en la mitocondria del parásito. Resultados similares se obtuvieron con epimastigotes transfectados con pTcINDEX.*TcCOX15H307A.HIS* (dato no mostrado). Estos resultados muestran que las mutaciones introducidas en TcCox15 (H129A y H307A) no afectarían la localización celular de la proteína.



**Figura 52. Las mutantes de TcCox15 se localizan en la mitocondria.** Inmunoblot de extractos totales de epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX (vector), pTcINDEX.*TcCOX15.HIS* (TcCox15), pTcINDEX.*TcCOX15H129A.HIS* (H129A) y pTcINDEX.*TcCOX15H307A.HIS* (H307A) inducidos con una monodosis de 0,05; 0,15; 0,25 o 0,5 µg/ml tetraciclina por 3 días (A). Se utilizaron anticuerpos anti-His, anticuerpos policlonales de conejo anti-TcCox15 y anticuerpos anti-tubulina, estos últimos como control de carga de los extractos totales. Imágenes de microscopía confocal obtenida por Inmunofluorescencia Indirecta sobre epimastigotes transfectados con pTcINDEX.*TcCOX15H129A.HIS* sin inducir (B) e inducido con una monodosis de 0,25 µg/ml tetraciclina por 3 días (C). Se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-TcCox15 y anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con FITC. Las imágenes son representativas de múltiples campos tomados de tres experimentos independientes. Imágenes deconvolucionadas de microscopía confocal obtenida por Inmunofluorescencia Indirecta sobre epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX (D) o con pTcINDEX.*TcCOX15H129A.HIS* (E) inducido con una monodosis de 0,05 µg/ml tetraciclina por 3 días, incubados luego 1 h con 1 µM Mitotracker (MT) y tratados con anticuerpos policlonales de conejo anti-TcCox15 y anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con FITC. Las imágenes son representativas de múltiples campos tomados de tres experimentos independientes. Coeficientes del

análisis de colocalización (rojo:verde): coeficiente de correlación de Pearson's 0,927 y coeficientes de superposición de Manders 0,895 y 0,924.

La presencia de las mutantes no funcionales de TcCox15 (TcCox15H129A.His y TcCox15H307A.His) afectaron negativamente el crecimiento de los epimastigotes, sin embargo, no podemos afirmar que este efecto se deba a una alteración de la síntesis de hemo A y en consecuencia a una alteración de la actividad de la CcO de la cual es cofactor el hemo A. Para profundizar estos estudios, se evaluó la síntesis de hemo A a partir de su cuantificación por el método de la piridina básica luego de una purificación de hemo total con acetona ácida (secciones II.5.2 y II.5.3 de Materiales y Métodos) y además se evaluó la actividad de la CcO mediante medidas de consumo de oxígeno (sección II.8.3 de Materiales y Métodos). Estos ensayos se llevaron a cabo con epimastigotes transfectantes que contienen los plásmidos que codifican para la enzima TcCox15.His y TcCox15H307A.His. La inducción de la expresión génica se realizó utilizando 0,15 a 0,25  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina. Para estos ensayos se decidió trabajar solo con una de las mutantes, con TcCox15H307A.His, ya que ambas mostraron igual comportamiento en los ensayos de crecimiento.

En la tabla 8 se muestran las cantidades de hemo A intracelulares normalizadas por número de parásito (nmoles por  $1 \times 10^9$  células) de las muestras que fueron colectadas tres días posteriores a la inducción con 0,15  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina. Los parásitos sobreexpresantes de TcCox15.His presentaron una cantidad de hemo A similar a la del control (epimastigotes que contienen el vector pTcINDEX). En cambio la cantidad de hemo A en las células sobreexpresantes de la mutante no funcional TcCox15H307A.His es aproximadamente la mitad de la detectada en el control. También se reportan las cantidades de hemo B (nmoles por  $1 \times 10^9$  células) y la relación hemo B/hemo A como control de la purificación del hemo total. Este resultado apoya la hipótesis de que TcCox15 es responsable de la síntesis de hemo A en *T. cruzi*, verificándose su función como HAS en el parásito.

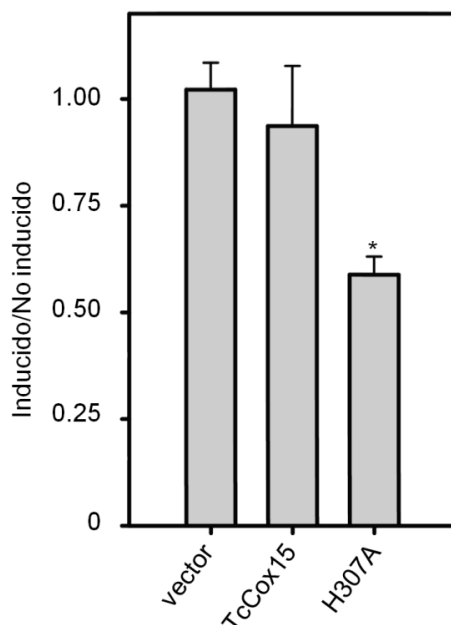
Se analizó también el efecto que produjo la inducción de la expresión de los genes *TcCOX15.HIS* y *TcCOX15H307A.HIS* en la actividad CcO mediante determinaciones del consumo de oxígeno en epimastigotes. Las muestras a analizar se tomaron 4 días posteriores al agregado de tetraciclina. En la figura 53 se muestran los resultados obtenidos, donde se grafica la relación de consumo de oxígeno de la condición inducida sobre no inducida de los distintos parásitos transfectantes. Tanto en los parásitos control transfectados con el plásmido pTcINDEX como los que sobreexpresan TcCox15.His, la inducción por tetraciclina

no afectó significativamente el consumo de oxígeno. Por otro lado la sobreexpresión de TcCox15H307A.His causó una disminución del 40 - 45% del consumo de oxígeno. Este resultado indica que la disminución de hemo A en epimastigotes debido a la presencia de la proteína no funcional TcCox15H307A.His induce una disminución de igual magnitud en el consumo de oxígeno.

	nmoles hemo A / $1.10^9$ células $\pm$ DS	nmoles hemo B / $1.10^9$ células $\pm$ DS	hemo B/hemo A $\pm$ DS
vector	0,036 $\pm$ 0,005	1,225 $\pm$ 0,046	34,0 $\pm$ 3,5
TcCox15 + 0,15 $\mu$ g/ml Tet	0,033 $\pm$ 0,003	1,477 $\pm$ 0,076	45 $\pm$ 2*
H307A + 0,15 $\mu$ g/ml Tet	0,0160 $\pm$ 0,0003 *	1,207 $\pm$ 0,002	73,7 $\pm$ 1,5 **

**Tabla 8. La expresión de TcCox15H307A.His afecta negativamente los niveles de hemo A en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.** Contenido de hemo determinado por el método de piridina básica de epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX (vector), pTcINDEX.TcCOX15.HIS (TcCox15) o pTcINDEX.TcCOX15H307A.HIS (H307A) inducidos con 0,15  $\mu$ g/ml tetraciclina por 3 días. La cuantificación se realizó sobre el hemo extraído con acetona ácida. Las concentraciones de hemo B y hemo A fueron estimadas usando los coeficientes de extinción molar 23,98  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (557 nm) y 25,02  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (588 nm) respectivamente. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres experimentos independientes de cada condición. \*p < 0,05 y \*\*p < 0,01 comparado con la condición control - parásitos transfectados con el vector pTcINDEX (análisis de varianza ANOVA de un factor seguido por post-test de comparaciones múltiples de Tukey)

En un trabajo realizado por Silva y colaboradores se propone que el consumo de oxígeno en epimastigotes depende de la cepa utilizada y varía en las distintas fases de crecimiento del cultivo de epimastigotes: se observó un aumento del consumo de oxígeno en fase estacionaria con respecto a las muestras que se encontraban en fase exponencial (Silva *et al.*, 2011). Para verificar que la disminución de nuestras medidas de consumo de oxígeno de cultivos de epimastigotes que expresan *TcCOX15H307A.HIS* en presencia de tetraciclina se debió a la disminución en la síntesis de hemo A y no a que los cultivos se encuentran en distinta fase de crecimiento, realizamos los mismos ensayos pero para cada cultivo se partió de un número inicial diferente de parásitos de modo que a los 4 días posteriores a la inducción todos ellos llegaran aproximadamente al mismo número de parásitos, en la misma fase de crecimiento (fase exponencial tardía). Luego se cuantificó el consumo de oxígeno y en el cultivo de epimastigotes que expresaban *TcCox15H307A.HIS* se observó una disminución del 40 - 45%, como en el caso anterior (dato no mostrado), verificándose que la disminución de la actividad CcO fue debido a la caída en la cantidad de hemo A por la presencia de la mutante no funcional TcCox15H307A.His.



**Figura 53. La presencia de la enzima no funcional TcCox15H307A.His disminuye la velocidad de consumo de oxígeno en epimastigotes.** Consumo de oxígeno de epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX (vector), pTcINDEX.*TcCOX15.HIS* (TcCox15) o pTcINDEX.*TcCOX15H307A.HIS* (H307A) en TSB-EGTA con 5 mM succinato como fuente de carbono. Los parásitos fueron crecidos en LIT 10% SFB con 20  $\mu$ M hemina y 0,25  $\mu$ g/ml tetraciclina por 4 días. El consumo fue normalizado por número de parásitos y el consumo del cultivo sin inducir fue tomado como referencia para cada transfectante (100% de consumo). Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres experimentos independientes. Cada condición fue analizada por prueba t de *Student* pareada a dos colas: \* $p < 0,01$ .

En levaduras, Cox10 y Cox15 forman homo-oligómeros y para Cox10 estos complejos son esenciales para su actividad catalítica (la oligomerización de Cox15 no ha sido estudiada exhaustivamente) (Bestwick *et al.*, 2010). En este contexto, analizando nuestros resultados, proponemos que la sobreexpresión de las mutantes de TcCox15 formarían complejos no funcionales con la TcCox15 endógena del parásito causando un efecto dominante negativo. Esto causaría la inhibición de la síntesis de hemo A en epimastigotes y así la disminución de la actividad de la CcO y del consumo de oxígeno. Otra posibilidad es que las mutantes no funcionales tomen y retengan el hemo O recién sintetizado, interaccionen con los diferentes componentes involucrados en la síntesis de hemo A o en la entrega del hemo O (la chaperona o TcCox10), interaccionen con la ferredoxina Yah1 que entrega los electrones o el intermediario temprano del ensamblado de la CcO; desplazando a la TcCox15 activa. En este contexto, más experimentos son necesarios para elucidar cuál es la etapa que se obstaculiza. Sin embargo, sí podemos concluir que TcCox15 depende de la interacción con otras proteínas para ser funcional y es por eso que se observa el efecto dominante negativo con

las mutantes no funcionales en epimastigotes, como también se observó en los ensayos de complementación en levaduras *cox15Δ* con TcCox15.His.GFP.

Por otro lado se ha propuesto que en epimastigotes la CcO del tipo *aa<sub>3</sub>* es la oxidasa terminal principal y la responsable del 95% del consumo de oxígeno (Silva *et al.*, 2011), que corresponde con el porcentaje de inhibición con azida obtenidos en nuestros ensayos (dato no mostrado). Como se detalló en la sección I.3.5 de la Introducción, el consumo de oxígeno residual no es por un aumento de la producción de EROs (Silva *et al.*, 2011); y si bien se ha propuesto una cadena respiratoria ramificada con una posible citocromo *o* y una TAO como oxidasas terminales, los resultados al respecto son controversiales (Affranchino *et al.*, 1986; Engel *et al.*, 1990; Felix *et al.*, 1978; Rogerson y Gutteridge, 1977; Rogerson y Gutteridge, 1979; Stoppani *et al.*, 1980). Nuestros resultados confirman que la CcO del tipo *aa<sub>3</sub>* es la oxidasa terminal principal en epimastigotes y proponemos que tal vez sea la única enzima que cumpla este rol. Si bien no fue posible conseguir una inhibición del 100% con azida, la especificidad de los inhibidores debería ser revisada: en epimastigotes de *T. cruzi* tampoco se logra inhibir completamente el complejo II de la cadena respiratoria con el agregado de malonato en exceso, que es capaz de inhibir al mismo complejo de otras eucariotas. Por otro lado, en un estudio donde se aisló el complejo II de epimastigotes, se logró determinar que formaban parte de este subunidades inusuales. Una explicación posible es que la constante de inhibición del complejo II en *T. cruzi* sea mucho más alta que en otros organismos, y esto se debe a las diferencias estructurales que tiene el complejo con respecto a los de mamíferos (Carranza *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2009). Los resultados que obtuvimos a partir de los ensayos de consumo de oxígeno, muestran que el consumo decreció alrededor del 40% en las muestras tratadas con tetraciclina comparadas con las no tratadas. Luego, el agregado de azida produjo una inhibición de alrededor del 95% en todas las muestras, es decir en parásitos inducidos y sin inducir, debiéndose agregar un exceso de azida (20 veces) a las muestras de epimastigotes comparada con la cantidad necesaria para obtener el efecto inhibitorio en levaduras (experimentos mostrados en las figuras 43.B y 49.B). A pesar de que la sobreexpresión de TcCox15 no funcional afectó la actividad de la CcO, no se observó algún tipo de mecanismo de compensación en la actividad de la cadena respiratoria en el parásito. Entonces es posible que el consumo residual de oxígeno (aproximadamente un 5 %) no se deba a la actividad de otra oxidasa terminal.

Por otro lado, Wang y colaboradores observaron que en levaduras, Cox10 se expresa en menor cantidad que Cox15 (10 veces menos en niveles de ARNm y 8 veces en niveles de proteína) y han propuesto que Cox10 catalizaría el paso limitante de la biosíntesis de hemo A. A pesar de la regulación a nivel de proteína, la síntesis de hemo A parecería regularse por la actividad de las enzimas y la liberación del hemo A desde Cox15 que, a su vez, depende de los niveles de Cox1 (Wang *et al.*, 2009). En caso de proceder un mecanismo similar en *T. cruzi*, esta podría ser la razón que justifique la falta de un incremento en la producción de hemo A cuando se sobreexpresó la enzima TcCox15 salvaje.

En resumen, nuestros resultados muestran que la presencia de las mutantes no funcionales de TcCox15.His causaron una disminución en la síntesis de hemo A, confirmándose la actividad HAS de TcCox15 en *T. cruzi*. Esta disminución de hemo A generó una pérdida de actividad de la CcO determinado a través de mediciones de consumo de oxígeno. Como consecuencia esta disminución de actividad CcO podría ser la responsable del efecto deletéreo observado en el crecimiento de epimastigotes. Como este fenotipo se observó cuando las mutantes no funcionales de TcCox15.His se expresaron en un entorno salvaje, y teniendo en cuenta que las enzimas Cox10 y Cox15 formarían complejos relevantes para su actividad, podemos afirmar que la presencia de una versión no funcional de la enzima TcCox15 produjo un efecto dominante negativo en epimastigotes de *T. cruzi*. Estos resultados apoyan la hipótesis que plantea que la CcO sería la oxidasa terminal principal para epimastigotes de *T. cruzi* cumpliendo un rol esencial en este estadio.

#### **III.2.6.4. Análisis del efecto de la expresión de TcCox15H307A.His en la infectividad de tripomastigotes y en la replicación intracelular de amastigotes**

Para estudiar el rol de la síntesis de hemo A y de la actividad CcO durante el proceso de infección y de replicación intracelular de *T. cruzi*, se analizó el efecto que produce en estos la presencia de la mutante no funcional de TcCox15: TcCox15H307A.His. Para ello, se diseñaron ensayos de infección de un cultivo en monocapa de la línea celular Vero con parásitos transfectados con el plásmido pTcINDEX.TcCOX15H307A.HIS, y como controles los transfectados con el vector pTcINDEX y con el plásmido pTcINDEX.TcCOX15.HIS. En primer lugar se favoreció la diferenciación de los epimastigotes en tripomastigotes metacíclicos por envejecimiento del cultivo y estos luego fueron utilizados para infectar una monocapa de células Vero. Esta primer infección se realizó con una mezcla de tripomastigotes y

epimastigotes, debido a esto no se estimó el MOI (*Multiplicity of infection*, número de tripomastigotes por célula Vero). Esta infección se mantuvo hasta la liberación de tripomastigotes, denominados tripomastigotes derivados de células (sección II.3.5 de Materiales y Métodos). Estos conforman una población constituida mayoritariamente por tripomastigotes que luego se utilizaron para realizar los ensayos de infección como se describe en la sección II.8.4 de Materiales y Métodos y poder evaluar el efecto de TcCox15H307A.HIS en la infección y la replicación intracelular de amastigotes. Brevemente, estos ensayos consistieron en la incubación de los tripomastigotes derivados de célula con una monocapa de células Vero durante 16 h (infección) en una MOI de 10, luego se procedió al lavado de la monocapa de células para eliminar los parásitos no internalizados y las células infectadas se mantuvieron durante 2 días a temperatura y atmósfera adecuada. Para evaluar la infección y replicación intracelular, las células fueron teñidas con Giemsa de manera de visualizar los amastigotes intracelulares por microscopía óptica dos días posteriores a la infección. La eficiencia de la infección se determinó calculando el porcentaje de células infectadas en cultivos inducidos en comparación con los no inducidos, mientras que para evaluar el efecto en la replicación intracelular se determinó el número de amastigotes por célula infectada también en cultivos inducidos en comparación con los no inducidos. Para estos ensayos, la inducción de la expresión de los genes en estudio se realizó mediante el agregado de 0,20 µg/ml tetraciclina durante la infección (+/-), durante la replicación intracelular (-/+) o durante ambos procesos (+/+). Para la condición que evalúa el efecto de la inducción durante la infección (+/- o +/+), los tripomastigotes se incubaron 30 min con tetraciclina antes de iniciar el ensayo. Además se mantuvo una muestra sin inducir con tetraciclina (-/-) para comparar con las muestras tratadas.

Cuando se analizó el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada en los ensayos realizados con los parásitos transfectados con el plásmido pTcINDEX, no se observó un cambio significativo entre la condición inducida respecto a la no inducida (dato no mostrado). Tampoco se observaron cambios significativos cuando se analizaron los mismos parámetros en los ensayos realizados con parásitos transfectados con el plásmido pTcINDEX.TcCOX15.HIS entre la condición de inducido en comparación con no inducido como se muestra en las figuras 54.A y B. En la figura 54.C se muestran imágenes de microscopía representativas del ensayo. Por otro lado, la inducción de la expresión del gen *TcCox15H307A.HIS* redujo aproximadamente un 50% el porcentaje de células infectadas

cuando el agregado del inductor se realizó previamente y durante la infección (+/- y +/+), pero no se observó efecto cuando la tetraciclina fue agregada luego de la etapa de infección: 16 h posteriores a la infección y posterior al lavado (-/+ (figura 54.D). Como se desprende de los datos presentados en la figura 54.D, cuando el inductor se agregó previo a la infección y se mantuvo durante el ensayo (+/+), el porcentaje de células infectadas fue levemente menor que en la condición +/-, aunque esta diferencia no es significativa. Al analizar el número de amastigotes por célula infectada se observó que la inducción de la expresión del gen *TcCOX15H307A.HIS* causó una reducción de aproximadamente del 50% del número de amastigotes por célula infectada (comparando las medianas) en todos los casos (+/+, +/- y -/+) en comparación con la condición de no inducción (-/-) como se muestra en la figura 54.E. En la figura 54.F se muestran imágenes de microscopía representativas del ensayo. Si bien en la condición +/- la tetraciclina es retirada de la infección mediante lavados y se pretende evaluar la inducción solo durante la infección, se observó también una disminución del número de amastigotes por células. Esto probablemente se deba a que la inducción de los genes se mantiene temporalmente luego de retirar la tetraciclina del medio, como ya se había reportado previamente (Taylor y Kelly, 2006).

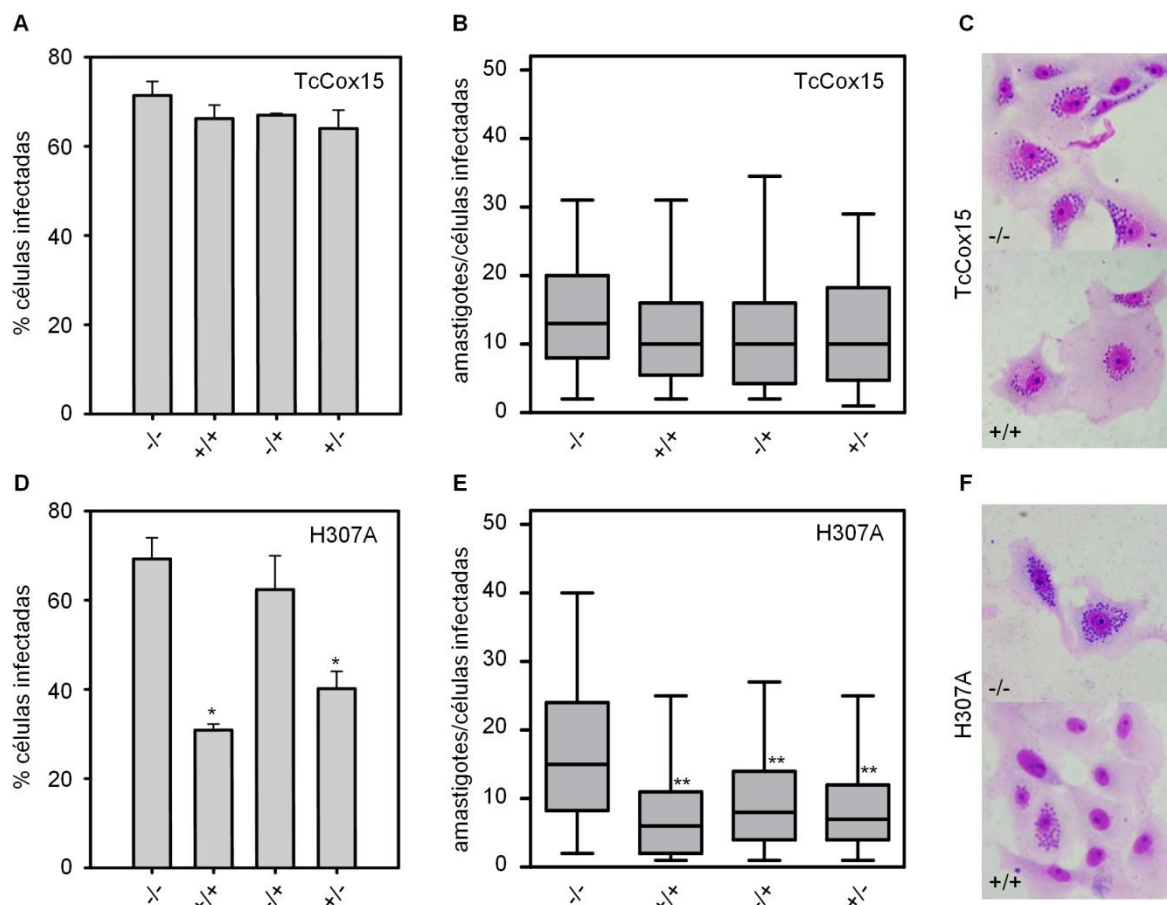
Estos resultados muestran que la presencia de la mutante no funcional de TcCox15 (*TcCox15H307A.His*) afectó negativamente tanto la infectividad de tripomastigotes a la línea celular utilizada como la replicación intracelular de amastigotes. Teniendo en cuenta que la presencia de *TcCox15H307A.His* afectó la síntesis de hemo A y en consecuencia la actividad CcO en epimastigotes, es razonable proponer que también afectaría la síntesis de hemo A en tripomastigotes y en amastigotes, y lo que originaría una disminución de la actividad CcO de estos estadios.

Si bien se determinó que la mutante no funcional de TcCox15 afecta el proceso de infección, estos experimentos nos permiten identificar qué etapa sería la afectada. En la infección por tripomastigotes de *T. cruzi* pueden diferenciarse varias etapas: unión a la célula, internalización en la vacuola parasitófaga y por último escape de la misma para establecerse en el citosol como amastigote (sección I.3.2 de Introducción). La internalización es reversible, si los tripomastigotes no se establecen en el citosol como amastigotes abandonan nuevamente de la célula. Esto fue observado por Andrade y colaboradores en experimentos donde se bloqueó con inhibidores la fusión de la vacuola parasitófaga a los lisosomas cuando los tripomastigotes infectan células no fagocíticas por el mecanismo

fosfoinositol 3-quinasa (PI3Q) dependiente, y observaron que el número de parásitos internalizados disminuye en las primeras horas luego de la infección (Andrade y Andrews, 2004; Woolsey y Burleigh, 2004). En cuanto a la relación entre el metabolismo energético y el proceso de infección, no hay estudios realizados al respecto. En cambio está reportado el vínculo con los procesos de diferenciación: la L-prolina es necesaria para la diferenciación de amastigotes a tripomastigotes, arrestándose la diferenciación en la forma *epimastigote-like* cuando hay escasez de la misma (Tonelli *et al.*, 2004); la metacicloogénesis es sensible a azúcares y a aminoácidos (Adroher *et al.*, 1988; Homsy *et al.*, 1989; Krassner *et al.*, 1990) e *in vitro* el pasaje de amastigotes – epimastigotes es reversible y dependiente de glucosa (Tyler y Engman, 2000). Planteamos entonces la posibilidad de que haya una vinculación entre metabolismo energético con la diferenciación de tripomastigotes a amastigotes. Si la síntesis de hemo A es esencial para la síntesis de nueva CcO y esto permite la diferenciación de tripomastigote a amastigotes, un bloqueo de la misma podría afectar la diferenciación y el tripomastigote en vez de establecerse en el citosol como amastigote podría salir de la célula como tripomastigote.

Entonces, teniendo en cuenta estas evidencias y para profundizar el estudio de la infección por tripomastigotes llevada a cabo en el laboratorio, nos propusimos determinar qué etapa era afectada por TcCox15H307A.His en la infección; en especial si el efecto es durante la entrada del tripomastigote o en la permanencia del mismo dentro de la célula y su pasaje a amastigotes. Para ello se realizó un ensayo de infección con parásitos transfectados con pTcINDEX.TcCOX15H307A.HIS con algunas modificaciones con respecto al ensayo anterior: primero los tripomastigotes se incubaron con las células Vero durante una hora a una mayor relación tripomastigotes por célula (MOI de 30), se lavaron las células y se registró el porcentaje de células infectadas en función del tiempo post-infección. Cuando el ensayo se realizó con tripomastigotes sin inducir (control), se obtuvo un porcentaje de  $24,4 \pm 1\%$  de células infectadas luego de la infección (tiempo 0 post-infección) y este porcentaje se mantuvo luego de 1, 5 o 16 horas (ON) post-infección. Cuando el ensayo se realizó con tripomastigotes que fueron previamente incubados con tetraciclina, se obtuvo un porcentaje inicial de células infectadas de  $8,0 \pm 1,5\%$  (disminución del 67% con respecto al control sin inducir) y este porcentaje no varió con el tiempo post-infección. Este resultado muestra que la inducción de la forma no funcional de TcCox15 afectaría las etapas iniciales de la infección,

posiblemente la adhesión a las células o la invasión, y no el proceso de establecimiento del amastigote en el citosol.



**Figura 54. La sobreexpresión de TcCox15H307A.His afecta negativamente la infección de tripomastigotes y la replicación intracelular de amastigotes.** Células Vero infectadas con tripomastigotes transfectados con el vector pTcINDEX.TcCOX15.HIS (TcCox15) y pTcINDEX.TcCOX15H307A.HIS (H307A). Se incubaron los tripomastigotes con las células Vero durante 16 h con MOI de 10. Se agregó 0,20  $\mu\text{g/ml}$  tetraciclina durante la infección (+/-), post-infección (-/+) o durante ambas etapas (+/+); y un control sin tetraciclina durante toda la infección (-/-). El porcentaje de células Vero infectadas (A y D) fue determinado contando 200 células por muestra. Los porcentajes de infección están expresados como el promedio  $\pm$  DS de tres réplicas independientes de cada condición ensayada. Cada experimento se analizó por un análisis de varianza ANOVA de un factor seguido por post-test de comparaciones múltiples de Dunnett (\* $p < 0,001$ ). El número de amastigotes por célula infectada (B y E) de las muestras se grafica en un gráfico de caja y bigote donde la caja indica el primer cuartil, la mediana y el tercer cuartil; y los bigotes el percentilo 5 y 95. Cada experimento se analizó por la prueba Kruskal-Wallis seguido por post-test de comparaciones múltiples de Dunn (\*\* $p < 0,001$ ). Imágenes representativas de algunas condiciones de células Vero infectadas con amastigotes y teñidas con Giemsa (C y F).

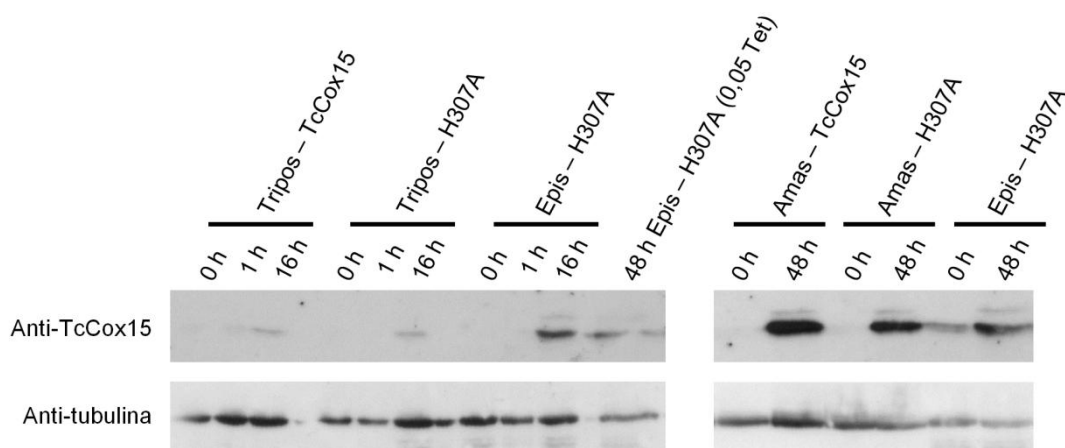
Para verificar si la presencia de la proteína no funcional afecta la viabilidad de los tripomastigotes, se mantuvo una alícuota de los mismos tripomastigotes incubados con tetraciclina en medio DMEM 2% SFB y se analizó la cantidad de tripomastigotes móviles observados por microscopía. Luego de 4 horas de incubación, se observó una disminución

del  $21,0 \pm 2,3\%$  de los tripomastigotes móviles en la muestra con tetraciclina con respecto a los que no fueron incubados con tetraciclina. Si bien este es un porcentaje importante, no justifica la caída del 67% de las células infectadas (que incluso se produce en menor tiempo de incubación con tetraciclina).

Para verificar los niveles de expresión de la proteína TcCox15H307A.His en amastigotes y tripomastigotes luego de la inducción con  $0,20 \mu\text{g/ml}$  tetraciclina a los tiempos de incubación utilizados en los ensayos anteriores, se realizaron extractos de tripomastigotes inducidos 1 y 16 h, y amastigotes inducidos 2 días (sección II.7.4 de Materiales y Métodos) y se analizaron mediante la técnica de Western blot (II.7.6.2 de Materiales y Métodos). Se incluyeron en el ensayo (a fines de comparar intensidad de señal) extractos de epimastigotes inducidos en las mismas condiciones y como control un extracto de epimastigotes que fue inducido durante 2 días con  $0,05 \mu\text{g/ml}$  de tetraciclina, condición que no afectara el crecimiento de los epimastigotes. En la figura 55 se muestran los resultados obtenidos y se observa que en los extractos de tripomastigotes la señal detectada correspondiente a TcCox15 (salvaje y mutante) aumentó luego de 16 h de inducción, no así luego de 1 h de inducción (figura 55). Este mismo resultado se observó a partir del análisis de la señal correspondiente a TcCox15H307A.His en los extractos de epimastigotes, la señal correspondiente a esta proteína aumentó luego de 16 h de inducción; sin embargo la intensidad de señal obtenida en los extractos de epimastigotes fue mayor que en tripomastigotes. También se observó un aumento de la señal correspondiente a TcCox15H307A.His en extractos de amastigotes luego de 2 días de inducción y es comparable a la señal obtenida en epimastigotes inducidos también 2 días.

Si bien a nivel cualitativo observamos que la señal detectada correspondiente a TcCox15H307A.His fue menos intensa en tripomastigotes que en epimastigotes, podemos suponer que la cantidad presente de proteína fue suficiente para afectar la síntesis de hemo A y en consecuencia el proceso de infección. Una razón para ello podría deberse a que, de acuerdo a nuestros resultados, los tripomastigotes presentarían menor cantidad de TcCox15 nativa en relación a los otros estadios (figura 40), y entonces una menor cantidad de enzima no funcional sería suficiente para afectar la actividad HAS. Incluso la señal obtenida en tripomastigotes fue menor a la obtenida en el control de epimastigotes inducidos con  $0,05 \mu\text{g/ml}$  tetraciclina (condición que no afectó el crecimiento en los ensayos anteriores). En cambio en el estadio de epimastigote al presentar mayor cantidad de proteína endógena, se

necesitaría mayor cantidad de las formas no funcionales para interferir significativamente con la síntesis de hemo A. Igualmente destacamos el efecto causado en la infección producida por tripomastigotes. En este estadio no replicativo, no hay síntesis de nueva mitocondria como si lo hay en los estadios replicativos. A pesar de ello, está reportado que hay actividad de CcO en tripomastigotes aunque sería menor que en epimastigotes. En cambio, si se ha documentado una mayor actividad del Complejo II y III de la cadena respiratoria y también mayor producción de EROs (Goncalves *et al.*, 2011). Entonces, un leve efecto en la síntesis de hemo A y en la actividad CcO remanente, podría afectar gravemente la homeostasis de la mitocondria al producir un aumento aún mayor de la producción de EROs.



**Figura 55. Detección de la proteína TcCox15 recombinante (salvaje y mutante) en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.** Inmunoblot de extractos totales de tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX.*TcCOX15.HIS* (TcCox15) y el vector pTcINDEX.*TcCOX15H307A.HIS* (H307A) inducidos con una monodosis de 0,20 µg/ml tetraciclina por el tiempo que se indica en cada caso. Como control se sembró una muestra de extractos totales de epimastigotes transfectados con el vector pTcINDEX.*TcCOX15H307A.HIS* (H307A) inducidos con una monodosis de 0,05 µg/ml tetraciclina por 48 h. Se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-TcCox15 y anticuerpos anti-tubulina, estos últimos como control de carga de los extractos totales.

Los resultados presentados en esta sección muestran que la presencia de las versiones no funcionales de TcCox15 también afecta los procesos de infección de tripomastigotes y la replicación intracelular de amastigotes. En síntesis, podemos concluir que TcCox15 es la enzima HAS de *T. cruzi* y que esta actividad sería relevante para la proliferación e infectividad del parásito. Además, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la CcO sería la oxidasa terminal principal y que su actividad sería esencial para todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.

#### **IV. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis nos han permitido construir las siguientes conclusiones.

1. Del estudio del transporte de hemo en epimastigotes de *T. cruzi*, se puede concluir que:

➤ los epimastigotes de *T. cruzi* mantenidos en medios de cultivo fueron capaces de captar e incorporar una cantidad limitada de hemo, siendo esta utilizada para suplir las necesidades del cofactor y poder cumplir con las funciones celulares más un exceso (limitado) que pudo ser almacenado como reserva y luego utilizado ante situaciones desfavorables, por ejemplo cuando fueron desafiados a crecer en un medio de menor concentración de hemina. Esta evidencia nos permite proponer que estas reservas limitadas le permitirían una proliferación acotada en condiciones deficientes y podrían formar parte de un mecanismo estratégico del parásito para sobrevivir hasta encontrarse en un medio más favorable.

➤ en cultivos axénicos, los epimastigotes tuvieron la capacidad de regular la cantidad de hemo intracelular independientemente de la concentración de hemina disponible en el medio (dentro de cierto rango), sugiriendo que el control de la concentración intracelular se controla a través del transporte. Donde además el exceso de hemina en el medio de cultivo causó un efecto tóxico en los epimastigotes.

➤ los epimastigotes de la cepa Dm28c resultaron más sensibles a los cambios de hemina del medio (aumento o disminución) que la cepa CL Brener.

➤ el crecimiento de epimastigotes en medio LIT 10% SFB no presentó diferencias apreciables ante la utilización de 5 o 20  $\mu\text{M}$  hemina tanto en el crecimiento como en el contenido intracelular de hemo.

➤ los epimastigotes de *T. cruzi* no pudieron utilizar protoporfirina IX (PP) y hierro para sintetizar hemo, es decir, confirmamos que no presentan actividad ferroquelatasa (FeCH), la última enzima de la vía de síntesis de hemo.

➤ ambas cepas estudiadas presentaron diferentes tolerancias y especificidades respecto a los AHs ensayados, esto apoya la hipótesis de que el transporte estaría mediado por un complejo proteico especializado, que sería selectivo, siendo capaz de discriminar entre compuestos de estructura similar. La diferencia en el comportamiento de ambas cepas

probablemente se deba a diferencias estructurales entre los transportadores de hemo o en las proteínas accesorias al transportador.

➤ el SnMP mostró un comportamiento no esperado: no fue incorporado por ninguna de las cepas estudiadas pero si fue capaz de bloquear el transporte de hemo. Entonces el SnMP puede ser un compuesto atractivo para el estudio de la inhibición del transporte de hemo en *T. cruzi* y que a diferencia de otros compuestos solo afectaría el transporte de hemo y no causaría otros efectos (inhibidores de transportadores tipo ABC).

2. Con respecto a la síntesis de hemo A y del ensamblado del CcO en *T. cruzi*, podemos concluir que:

➤ la enzima TcCox15 posee las 4 histidinas conservadas en las secuencias de las HAS: H129, H206, H307 y H370 (según la numeración de *T. cruzi*), presentaría 8 posibles regiones transmembranas que concuerdan con las regiones transmembranas predichas en CtaA de *B. subtilis* y un posible péptido señal con un sitio de corte posterior al aminoácido 46 (figura 35).

➤ se identificaron en el genoma de *T. cruzi* genes que podrían participar junto a TcCox15 en la síntesis de hemo A y que son necesarias para la actividad HAS: una posible ferredoxina Yah1 y una posible ferredoxina reductasa Arh1. Además se identificaron secuencias con homología a Shy1 que participa en el ensamblado del CcO (tabla 7). Aunque resta la comprobación experimental para confirmar dichas funciones.

➤ se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo específicos para reconocer un segmento de TcCox15, denominado P1TcCox15, herramienta que permitió estudiar los niveles y la localización de TcCox15 en el parásito.

➤ la enzima TcCox15 fue detectada en los distintos estadios del parásito, siendo más alta su expresión en los estadios replicativos, epimastigotes y amastigotes, en comparación con el estadio infectivo de tripomastigote; pero la mayor expresión se observó en estadio de epimastigote.

➤ se comprobó la localización mitocondrial de TcCox15 en epimastigotes, al igual que en las eucariotas estudiadas.

➤ la fusión de GFP al C-terminal de TcCox15 afectó la función de la enzima, ya sea porque afecta la actividad de la enzima, porque afecta la interacción con los diferentes intermediarios del ensamblado de la CcO, la formación de los propios oligómeros

funcionales de TcCox15 o la estabilidad de la enzima. En levaduras afectó la función de la HAS endógena generando un efecto dominante negativo y no fue posible obtener epimastigotes transfectantes estables.

➤ los residuos H129, H206 y H307 fueron esenciales para la actividad HAS de TcCox15. Si bien su sustitución por residuos de alanina afectan la actividad de la enzima, no afectan la estabilidad de la misma.

➤ la sobreexpresión en epimastigotes de las versiones mutantes no funcionales de TcCox15 afectaron el crecimiento de los mismos, además provocan una disminución de la síntesis de hemo A y la concomitante caída de la actividad CcO como se evidencia en la disminución del consumo de oxígeno.

➤ la CcO del tipo *aa3* es la oxidasa terminal principal en epimastigotes de *T. cruzi* y no se evidenció que haya otra oxidasa terminal que compense la actividad mitocondrial cuando se afecta su funcionamiento de la CcO en epimastigotes.

➤ la presencia de la mutante no funcional de TcCox15 afectó negativamente la infección de tripomastigotes y además la replicación intracelular de amastigotes. Si bien la expresión en tripomastigotes sería muy baja, sería suficiente para afectar los primeros pasos de la infección: adhesión a la célula e invasión. Estas evidencias nos permiten proponer que también se afectaría la síntesis de hemo A en tripomastigotes y en amastigotes y como consecuencia se originaría una disminución de la actividad CcO de estos estadios, siendo esto la causa de la disminución en la eficiencia de la infectividad y la replicación intracelular.

En síntesis, los resultados presentados en este trabajo de Tesis de doctorado han permitido profundizar el conocimiento general sobre la biología y la bioquímica del *T. cruzi*, siendo estos novedosos y especialmente porque permiten comprender procesos esenciales como lo son el transporte de hemo y su utilización en la mitocondria de este parásito relevante para la salud humana. El transporte de hemo y su conversión en hemo A en la mitocondria de *T. cruzi* son esenciales para el desarrollo del parásito. Completar la elucidación de estas vías, como así también el transporte de hemo hacia la mitocondria, hacia TcCox10 y el traspaso de Hemo O desde TcCox10 a TcCox15, permitirían identificar nuevos blancos moleculares que puedan ser utilizados como estrategias para la inhibición de la proliferación de *T. cruzi*.

**V. BIBLIOGRAFÍA**

- Adroher, F.J., Lupianez, J.A., y Osuna, A. (1988). Influence of saccharides and sodium chloride on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Differ* 22, 165-170.
- Affranchino, J.L., Schwarcz de Tarlovsky, M.N., y Stoppani, A.O. (1986). Terminal oxidases in the trypanosomatid *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B* 85, 381-388.
- 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., *et al.* (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 201, 1308-1315.
- Albert Clark, D.B., Pamela O'Hashi, Fred Hart, Michael Schunk, Andrew Fletch, Gilly Griffin (2002). Guidelines on: Antibody Production. Canadian council on animal care.
- Allen, J.W., Ginger, M.L., y Ferguson, S.J. (2004). Maturation of the unusual single-cysteine (XXXCH) mitochondrial c-type cytochromes found in trypanosomatids must occur through a novel biogenesis pathway. *Biochem J* 383, 537-542.
- Andrade, L.O., y Andrews, N.W. (2004). Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med* 200, 1135-1143.
- Andrade, L.O., y Andrews, N.W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol* 3, 819-823.
- Andrews, N.W., Hong, K.S., Robbins, E.S., y Nussenzweig, V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 64, 474-484.
- 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.
- Antonicka, H., Leary, S.C., Guercin, G.H., Agar, J.N., Horvath, R., Kennaway, N.G., Harding, C.O., Jaksch, M., y Shoubridge, E.A. (2003a). Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum Mol Genet* 12, 2693-2702.
- Antonicka, H., Mattman, A., Carlson, C.G., Glerum, D.M., Hoffbuhr, K.C., Leary, S.C., Kennaway, N.G., y Shoubridge, E.A. (2003b). Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 72, 101-114.
- Anzaldi, L.L., y Skaar, E.P. (2010). Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect Immun* 78, 4977-4989.
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B.P., Carrington, M., Depledge, D.P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., *et al.* (2010). TriTrypDB: a functional genomic resource for the *Trypanosomatidae*. *Nucleic Acids Res* 38, 457-462.
- 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.
- 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.

- Bareth, B., Dennerlein, S., Mick, D.U., Nikolov, M., Urlaub, H., y Rehling, P. (2013). The heme a synthase Cox15 associates with cytochrome c oxidase assembly intermediates during Cox1 maturation. *Mol Cell Biol* 33, 4128-4137.
- 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.
- Barros, M.H., Carlson, C.G., Glerum, D.M., y Tzagoloff, A. (2001). Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *FEBS Lett* 492, 133-138.
- Barros, M.H., Nobrega, F.G., y Tzagoloff, A. (2002). Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277, 9997-10002.
- Barros, M.H., y Tzagoloff, A. (2002). Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 516, 119-123.
- 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.
- 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.
- Bestwick, M., Khalimonchuk, O., Pierrel, F., y Winge, D.R. (2010). The Role of Coa2 in Hemylation of Yeast Cox1 Revealed by its Genetic Interaction with Cox10. *Molecular and Cellular Biology* 30, 172-185.
- Bowman, I.B.R., Tobie, E.J., y Von Brand, T. (1963). CO<sub>2</sub> fixation studies with the culture form of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 9, 105-114.
- Bringaud, F., Riviere, L., y Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 149, 1-9.
- Brown, B.M., Wang, Z., Brown, K.R., Cricco, J.A., y Hegg, E.L. (2004a). Heme O synthase and heme A synthase from *Bacillus subtilis* and *Rhodobacter sphaeroides* interact in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 43, 13541-13548.
- Brown, K.R., Allan, B.M., Do, P., y Hegg, E.L. (2002). Identification of novel hemes generated by heme A synthase: evidence for two successive monooxygenase reactions. *Biochemistry* 41, 10906-10913.
- Brown, K.R., Brown, B.M., Hoagland, E., Mayne, C.L., y Hegg, E.L. (2004b). Heme A synthase does not incorporate molecular oxygen into the formyl group of heme A. *Biochemistry* 43, 8616-8624.
- Buchensky, C., Almirón, 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 Microbiology Letters* 312, 133-141.
- Bugiani, M., Tiranti, V., Farina, L., Uziel, G., y Zeviani, M. (2005). Novel mutations in COX15 in a long surviving Leigh syndrome patient with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet* 42, e28.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. i. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 12, 93-100.
- 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.
- Carneiro, M., y Caldas, R.A. (1982). Evidence for three respiratory terminals in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Trop* 39, 41-49.

- Carranza, J.C., Kowaltowski, A.J., Mendonca, M.A., de Oliveira, T.C., Gadelha, F.R., y Zingales, B. (2009). Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *J Bioenerg Biomembr* 41, 299-308.
- Carvalho, S., Cruz, T., Santarém, N., Castro, H., Costa, V., y Tomás, A.M. (2009). Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. *Acta Tropica* 109, 131-135.
- Cazzulo, J.J. (1992). Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem* 18, 235-257.
- Cazzulo, J.J. (1994). Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr* 26, 157-165.
- Ciccarelli, A., Araujo, L., Batlle, A., y Lombardo, E. (2007). Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 1-7.
- Claros, M.G., y Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241, 779-786.
- Clayton, J. (2010a). Chagas disease 101. *Nature* 465, S4-5.
- Clayton, J. (2010b). The promise of *T. cruzi* genomics. *Nature* 465, S16-17.
- Costanzo, M.C., Seaver, E.C., y Fox, T.D. (1986). At least two nuclear gene products are specifically required for translation of a single yeast mitochondrial mRNA. *Embo J* 5, 3637-3641.
- 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.
- Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A., y Miles, M.A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18, 171-176.
- Coura, J.R., y Vinas, P.A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465, S6-7.
- 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.
- Cupello, M.P., Souza, C.F., Menna-Barreto, R.F., Nogueira, N.P., Laranja, G.A., Sabino, K.C., Coelho, M.G., Oliveira, M.M., y Paes, M.C. (2014). Trypanosomatid essential metabolic pathway: new approaches about heme fate in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 449, 216-221.
- Cupello, M.P., Souza, C.F.d., Buchensky, C., Soares, J.B.R.C., Laranja, G.A.T., Coelho, M.G.P., 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 Tropica* 120, 211-218.
- Chaudhuri, M., Ott, R.D., Saha, L., Williams, S., y Hill, G.C. (2005). The trypanosome alternative oxidase exists as a monomer in *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Parasitol Res* 96, 178-183.
- 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.
- 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.
- De Boiso, J.F., Docampo, R., y Stoppani, A.O. (1979). Cytochromes in epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Argent Microbiol* 11, 22-36.
- De Lima, A.R., Navarro, M.C., Arteaga, R.Y., y Contreras, V.T. (2008). Cultivation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in low glucose axenic media shifts its competence to differentiate at metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol* 119, 336-342.
- de Souza, W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 8, 269-285.

- de Souza, W. (2008). An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des* 14, 822-838.
- de Souza, W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 89-100.
- de Souza, W., Attias, M., y Rodrigues, J.C. (2009). Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2069-2080.
- de Souza, W., de Carvalho, T.M., y Barrias, E.S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* 2010, 29.
- Denicola-Seoane, A., Rubbo, H., Prodanov, E., y Turrens, J.F. (1992). Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 54, 43-50.
- Denicola, A., Rubbo, H., Haden, L., y Turrens, J.F. (2002). Extramitochondrial localization of NADH-fumarate reductase in trypanosomatids. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 133, 23-27.
- Diekert, K., de Kroon, A.I., Kispal, G., y Lill, R. (2001). Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* 65, 37-51.
- Dobson, L., Remenyi, I., y Tusnady, G.E. (2015). CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Res* 43, W408-412.
- Edelheit, O., Hanukoglu, A., y Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol* 9, 61.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Wortley, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409-415.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., y von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300, 1005-1016.
- Engel, J.C., Doyle, P.S., y Dvorak, J.A. (1990). Isolate-dependent differences in the oxidative metabolism of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 39, 69-76.
- Fang, J., y Beattie, D.S. (2002). Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: isolation and characterization. *Biochemistry* 41, 3065-3072.
- Felix, C.R., de Araujo Caldas, R., Ceron, C.R., y Roitman, I. (1978). Cyanide-sensitive and insensitive respiration of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 72, 89-91.
- Ferella, M., Nilsson, D., Darban, H., Rodrigues, C., Bontempi, E.J., Docampo, R., y Andersson, B. (2008). Proteomics in *Trypanosoma cruzi* - localization of novel proteins to various organelles. *Proteomics* 8, 2735 - 2749.
- 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.
- Fernandes, M.C., Cortez, M., Flannery, A.R., Tam, C., Mortara, R.A., y Andrews, N.W. (2011). *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med* 208, 909-921.
- Fontanesi, F., Soto, I.C., y Barrientos, A. (2008). Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life* 60, 557-568.
- Galbraith, R.A., y McElrath, M.J. (1988). Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 29, 47-53.
- Gao, T., y O'Brian, M.R. (2005). Iron-dependent cytochrome c1 expression is mediated by the status of heme in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 187, 5084-5089.

- Garcia, M.N., Hernandez, D., Gorchakov, R., Murray, K.O., y Hotez, P.J. (2015a). The 1899 United States Kissing Bug Epidemic. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0004117.
- Garcia, M.N., Woc-Colburn, L., Aguilar, D., Hotez, P.J., y Murray, K.O. (2015b). Historical Perspectives on the Epidemiology of Human Chagas Disease in Texas and Recommendations for Enhanced Understanding of Clinical Chagas Disease in the Southern United States. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003981.
- Geer, L.Y., Domrachev, M., Lipman, D.J., y Bryant, S.H. (2002). CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Res* 12, 1619-1623.
- 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.
- Glerum, D.M., Muroff, I., Jin, C., y Tzagoloff, A. (1997). COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 272, 19088-19094.
- Glerum, D.M., Shtanko, A., y Tzagoloff, A. (1996a). Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 271, 14504-14509.
- Glerum, D.M., Shtanko, A., y Tzagoloff, A. (1996b). SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 20531-20535.
- Goncalves, R.L., Barreto, R.F., Polycarpo, C.R., Gadelha, F.R., Castro, S.L., y Oliveira, M.F. (2011). A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr* 43, 651-661.
- Gonzalez, J.M., Meini, M.R., Tomatis, P.E., Medrano Martin, F.J., Cricco, J.A., y Vila, A.J. (2012). Metallo-beta-lactamases withstand low Zn(II) conditions by tuning metal-ligand interactions. *Nat Chem Biol* 8, 698-700.
- Grisard, E.C., Teixeira, S.M., de Almeida, L.G., Stoco, P.H., Gerber, A.L., Talavera-Lopez, C., Lima, O.C., Andersson, B., y de Vasconcelos, A.T. (2014). *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome Announc* 2.
- Gutteridge, W.E., Cover, B., y Gaborak, M. (1978). Isolation of blood y intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* from rats and other rodents and preliminary studies of their metabolism. *Parasitology* 76, 159-176.
- Haanstra, J.R., van Tuijl, A., Kessler, P., Reijnders, W., Michels, P.A., Westerhoff, H.V., Parsons, M., y Bakker, B.M. (2008). Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17718-17723.
- Haley, K.P., y Skaar, E.P. (2012). A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes Infect* 14, 217-227.
- Hall, B.F., Webster, P., Ma, A.K., Joiner, K.A., y Andrews, N.W. (1992). Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J Exp Med* 176, 313-325.
- 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.
- Hannappel, A., Bundschuh, F.A., y Ludwig, B. (2012). Role of Surf1 in heme recruitment for bacterial COX biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1817, 928-937.
- Harrison, D.E. (1972). A study of the effect of growth conditions on chemostat-grown *Klebsiella aerogenes* and kinetic changes of A 500-nm absorption band. *Biochim Biophys Acta* 275, 83-92.
- Hederstedt, L. (2012). Heme A biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1817, 920-927.

- Hederstedt, L., Lewin, A., y Throne-Holst, M. (2005). Heme A synthase enzyme functions dissected by mutagenesis of *Bacillus subtilis* CtaA. *J Bacteriol* 187, 8361-8369.
- Hendriksen, C.F. (2005). Introduction: laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities. *ILAR J* 46, 227-229.
- Homsy, J.J., Granger, B., y Krassner, S.M. (1989). Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* 36, 150-153.
- 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.
- Jani, D., Nagarkatti, R., Beatty, W., Angel, R., Slebodnick, C., Andersen, J., Kumar, S., y Rathore, D. (2008). HDP-a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathog* 4, e1000053.
- Kayser, H., Wray, V., y Nimtz, M. (2014). Structure of a novel farnesylated bilin from an insect - formation by alpha-cleavage of heme A of mitochondrial cytochrome c oxidases? *FEBS J* 281, 2366-2376.
- Keel, S.B., Doty, R.T., Yang, Z., Quigley, J.G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P.D., De Domenico, I., Vaughn, M.B., Kaplan, J., *et al.* (2008). A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319, 825-828.
- Khalimonchuk, O., Bestwick, M., Meunier, B., Watts, T.C., y Winge, D.R. (2010). Formation of the redox cofactor centers during Cox1 maturation in yeast cytochrome oxidase. *Mol Cell Biol* 30, 1004-1017.
- Khalimonchuk, O., Kim, H., Watts, T., Perez-Martinez, X., y Winge, D.R. (2012). Oligomerization of Heme o Synthase in Cytochrome Oxidase Biogenesis Is Mediated by Cytochrome Oxidase Assembly Factor Coa2. *J Biol Chem* 287, 26715-26726.
- Khan, A.A., y Quigley, J.G. (2011). Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochim Biophys Acta* 1813, 668-682.
- Kim, D., Yukl, E.T., Moenne-Loccoz, P., y OrtizdeMontellano, P.R. (2006). Fungal Heme Oxygenases: Functional Expression and Characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry* 45, 14772-14780.
- 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.
- Korený, L., Lukes, J., y Oborník, M. (2010). Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all? *International Journal for Parasitology* 40, 149-156.
- Koreny, L., Obornik, M., y Lukes, J. (2013). Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites. *PLoS Pathog* 9, e1003088.
- Koreny, L., Sobotka, R., Kovarova, J., Gnipova, A., Flegontov, P., Horvath, A., Obornik, M., Ayala, F.J., y Lukes, J. (2012). Aerobic kinetoplastid flagellate *Phytomonas* does not require heme for viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3808-3813.
- Krassner, S.M., Granger, B., Phermsangngnam, P., Le, T., y Linden, V. (1990). Further studies on substrates inducing metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* 37, 128-132.
- 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.

- Krishnamurthy, P., Xie, T., y Schuetz, J.D. (2007). The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther*.
- Krishnamurthy, P.C., Du, G., Fukuda, Y., Sun, D., Sampath, J., Mercer, K.E., Wang, J., Sosa-Pineda, B., Murti, K.G., y Schuetz, J.D. (2006). Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* 443, 586-589.
- Kumar, S., y Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 157, 175-188.
- Kusel, J.P., y Storey, B.T. (1973). CO-binding pigments and the functional terminal oxidase of the trypanosomatid hemoflagellate *Crithidia fasciculata*. *Biochim Biophys Acta* 314, 164-177.
- 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., *et al.* (2007). Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 355, 16-22.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- 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.
- Leprohon, P., Legare, D., Girard, I., Papadopoulou, B., y Ouellette, M. (2006). Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* 5, 1713-1725.
- Letoffe, S., Heuck, G., Delepelaire, P., Lange, N., y Wandersman, C. (2009). Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Lewin, A., y Hederstedt, L. (2006). Compact archaeal variant of heme A synthase. *FEBS Lett* 580, 5351-5356.
- Ley, V., Andrews, N.W., Robbins, E.S., y Nussenzweig, V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med* 168, 649-659.
- Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V., y Andrews, N.W. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med* 171, 401-413.
- Liu, Y., y Ortiz de Montellano, P.R. (2000). Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 275, 5297-5307.
- 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.
- Lubel, J.S., Herath, C.B., Velkoska, E., Casley, D.J., Burrell, L.M., y Angus, P.W. (2008). Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity in fetal calf serum: implications for cell culture research. *Cytotechnology* 58, 119-126.
- Machado-de-Assis, G.F., Diniz, G.A., Montoya, R.A., Dias, J.C., Coura, J.R., Machado-Coelho, G.L., Albajar-Vinas, P., Torres, R.M., y Lana, M. (2013). A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108, 873-880.
- Mansilla, N., Garcia, L., Gonzalez, D.H., y Welchen, E. (2015). AtCOX10, a protein involved in haem o synthesis during cytochrome c oxidase biogenesis, is essential for plant embryogenesis and modulates the progression of senescence. *J Exp Bot* 66, 6761-6775.
- Martin, E., y Mukkada, A.J. (1979). Identification of the terminal respiratory chain in kinetoplast mitochondrial complexes of *Leishmania tropica* promastigotes. *J Biol Chem* 254, 12192-12198.

- Matsson, M., Tolstoy, D., Aasa, R., y Hederstedt, L. (2000). The distal heme center in *Bacillus subtilis* succinate:quinone reductase is crucial for electron transfer to menaquinone. *Biochemistry* *39*, 8617-8624.
- Maugeri, D.A., Cannata, J.J., y Cazzulo, J.J. (2011). Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Essays Biochem* *51*, 15-30.
- McDonald, A.E. (2008). Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed 'cyanide-resistant' terminal oxidase. *Functional Plant Biology* *35*, 535-552.
- McEwen, J.E., Ko, C., Kloeckner-Gruissem, B., y Poyton, R.O. (1986). Nuclear functions required for cytochrome *c* oxidase biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of mutants in 34 complementation groups. *J Biol Chem* *261*, 11872-11879.
- 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.
- Michels, P.A., Bringaud, F., Herman, M., y Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*.
- Miguel, D.C., Flannery, A.R., Mittra, B., y Andrews, N.W. (2013). Heme uptake mediated by LHR1 is essential for *Leishmania amazonensis* virulence. *Infect Immun* *81*, 3620-3626.
- Minning, T., Weatherly, D.B., Atwood, J., Orlando, R., y Tarleton, R. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* *10*, 370.
- Mogi, T. (2003). Biosynthesis and role of heme O and heme A. In *The Porphyrin Handbook*, K. Kadish, Guillard, R., y Smith, K, ed. (San Diego, Academic Press), pp. 157–181.
- Mogi, T. (2009a). Over-expression and characterization of *Bacillus subtilis* heme O synthase. *J Biochem* *145*, 669-675.
- Mogi, T. (2009b). Probing structure of heme A synthase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis. *J Biochem* *145*, 625-633.
- Moraes, C.T., Diaz, F., y Barrientos, A. (2004). Defects in the biosynthesis of mitochondrial heme c and heme a in yeast and mammals. *Biochim Biophys Acta* *1659*, 153-159.
- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Omura, S., y Kita, K. (2009). Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of twelve peptides including a heterodimeric Ip subunit. *J Biol Chem*.
- Morillo, C.A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Jr., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., *et al.* (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* *373*, 1295-1306.
- Mortara, R.A., Andreoli, W.K., Taniwaki, N.N., Fernandes, A.B., Silva, C.V., Fernandes, M.C., L'Abbate, C., y Silva, S. (2005). Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *An Acad Bras Cienc* *77*, 77-94.
- Moullan, N., Mouchiroud, L., Wang, X., Ryu, D., Williams, E.G., Mottis, A., Jovaisaite, V., Frochaux, M.V., Quiros, P.M., Deplancke, B., *et al.* (2015). Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. *Cell Rep*.
- 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.
- 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.

- Nogueira, F.B., Ruiz, J.C., Robello, C., Romanha, A.J., y Murta, S.M. (2009). Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol Res* 104, 835-844.
- Nogueira, N.P.d.A., Souza, C.F.d., Saraiva, F.M.d.S., Sultano, P.E., Dalmau, S.R., Bruno, R.E., de Lima Sales Gonçalves, R., Laranja, G.A.T., Leal, L.H.M., Coelho, M.G.P., *et al.* (2011). Heme-Induced ROS in *Trypanosoma cruzi* Activates CaMKII-Like That Triggers Epimastigote Proliferation. One Helpful Effect of ROS. *PLoS One* 6, e25935.
- Okada, K. (2009). The novel heme oxygenase-like protein from *Plasmodium falciparum* converts heme to bilirubin IXalpha in the apicoplast. *FEBS Lett* 583, 313-319.
- Oquendo, C.E., Antonicka, H., Shoubbridge, E.A., Reardon, W., y Brown, G.K. (2004). Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome. *J Med Genet* 41, 540-544.
- Paiva-Silva, G.O., Cruz-Oliveira, C., Nakayasu, E.S., Maya-Monteiro, C.M., Dunkov, B.C., Masuda, H., Almeida, I.C., y Oliveira, P.L. (2006). A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8030-8035.
- Panek, H., y O'Brian, M.R. (2002). A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* 148, 2273-2282.
- Parodi-Talice, A., Monteiro-Goes, V., Arrambide, N., Avila, A.R., Duran, R., Correa, A., Dallagiovanna, B., Cayota, A., Krieger, M., Goldenberg, S., *et al.* (2007). Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J Mass Spectrom* 42, 1422-1432.
- Pecoul, B., Batista, C., Stobbaerts, E., Ribeiro, I., Vilasanjuan, R., Gascon, J., Pinazo, M.J., Moriana, S., Gold, S., Pereiro, A., *et al.* (2016). The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004343.
- Perally, S., Lacourse, E.J., Campbell, A.M., y Brophy, P.M. (2008). Heme Transport and Detoxification in Nematodes: Subproteomics Evidence of Differential Role of Glutathione Transferases. *J Proteome Res* 7, 4557-4565.
- Perez-Morga, D., Vanhollebeke, B., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., Lins, L., Homble, F., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Poelvoorde, P., *et al.* (2005). Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. *Science* 309, 469-472.
- Petherick, A. (2010a). Country by country. *Nature* 465, S10-11.
- Petherick, A. (2010b). Chagas disease in the Chaco. *Nature* 465, S18-20.
- Prescott, D.M. (1975). *Methods in Cell Biology, Volume 12: Yeast Cells* (New York, New York, Academic Press).
- 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.
- Protchenko, O., Shakoury-Elizeh, M., Keane, P., Storey, J., Androphy, R., y Philpott, C.C. (2008). Role of PUG1 in inducible porphyrin and heme transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 7, 859-871.
- Puri, S., y O'Brian, M.R. (2006). The hmuQ and hmuD genes from *Bradyrhizobium japonicum* encode heme-degrading enzymes. *J Bacteriol* 188, 6476-6482.
- Puustinen, A., y Wikstrom, M. (1991). The heme groups of cytochrome *o* from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6122-6126.
- Quigley, J.G., Yang, Z., Worthington, M.T., Phillips, J.D., Sabo, K.M., Sabath, D.E., Berg, C.L., Sassa, S., Wood, B.L., y Abkowitz, J.L. (2004). Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118, 757-766.

- 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., *et al.* (2008). Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*.
- 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.
- Rassi, A., Jr., Rassi, A., y Marin-Neto, J.A. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-1402.
- Rawlinson, W.A., y Hale, J.H. (1949). Prosthetic groups of the cytochromes present in *Corynebacterium diphtheriae* with especial reference to cytochrome *a*. *Biochem J* 45, 247-255, pl.
- Reisenman, C.E., Lawrence, G., Guerenstein, P.G., Gregory, T., Dotson, E., y Hildebrand, J.G. (2010). Infection of kissing bugs with *Trypanosoma cruzi*, Tucson, Arizona, USA. *Emerg Infect Dis* 16, 400-405.
- 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.
- Ribeiro, M., Nitz, N., Santana, C., Moraes, A., Hagstrom, L., Andrade, R., Rios, A., Sousa, A., Dallago, B., Gurgel-Goncalves, R., *et al.* (2016). Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp Parasitol* 162, 1-6.
- Rodriguez, A., Rioult, M.G., Ora, A., y Andrews, N.W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol* 129, 1263-1273.
- Rogerson, G.W., y Gutteridge, W.E. (1977). The action of respiratory inhibitors on the culture epimastigote, blood trypomastigote and intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 75.
- Rogerson, G.W., y Gutteridge, W.E. (1979). Oxidative metabolism in mammalian and culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem* 10, 1019-1023.
- Romano, P.S., Arboit, M.A., Vazquez, C.L., y Colombo, M.I. (2009). The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy* 5, 6-18.
- Romano, P.S., Cueto, J.A., Casassa, A.F., Vanrell, M.C., Gottlieb, R.A., y Colombo, M.I. (2012). Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. *IUBMB Life* 64, 387-396.
- 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.
- Saiki, K., Mogi, T., Ogura, K., y Anraku, Y. (1993). In vitro heme O synthesis by the cyoE gene product from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268, 26041-26044.
- 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.
- Sakamoto, J., Hayakawa, A., Uehara, T., Noguchi, S., y Sone, N. (1999). Cloning of *Bacillus stearothermophilus* CtaA and heme A synthesis with the CtaA protein produced in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 96-103.
- Salzman, T.A., y Batlle, A.M. (1986). Heme synthetase in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B* 85, 537-541.
- Salzman, T.A., Batlle, A.M., y de Souza, W. (1986). Heme synthesis in *Trypanosoma cruzi*: influence of the strain and culture medium. *Comp Biochem Physiol B* 83, 57-61.

- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd. Edition. edn (New York, Cold Spring Harbor).
- San Francisco, B., Bretsnyder, E.C., y Kranz, R.G. (2013). Human mitochondrial holocytochrome *c* synthase's heme binding, maturation determinants, and complex formation with cytochrome *c*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E788-797.
- Sant'Anna, C., de Souza, W., y Cunha-e-Silva, N. (2004). Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal* 10, 637-646.
- Schnauffer, A., Clark-Walker, G.D., Steinberg, A.G., y Stuart, K. (2005). The F1-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function. *Embo J* 24, 4029-4040.
- 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.
- Schofield, C.J., Jannin, J., y Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22, 583-588.
- Schuster, F.L., y Sullivan, J.J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin Microbiol Rev* 15, 374-389.
- Severance, S., y Hamza, I. (2009). Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chem Rev* 109, 4596-4616.
- 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.
- Sharrocks, A.D. (1994). A T7 expression vector for producing N- and C-terminal fusion proteins with glutathione S-transferase. *Gene* 138, 105-108.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., *et al.* (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122, 789-801.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., y Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360, 1-16.
- Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D.K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E.O., Nara, T., Aoki, T., *et al.* (2013). Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- 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.
- Silva, T.M., Peloso, E.F., Vitor, S.C., Ribeiro, L.H., y Gadelha, F.R. (2011). O<sub>2</sub> consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. *J Bioenerg Biomembr*.
- Skaar, E.P., Gaspar, A.H., y Schneewind, O. (2006). *Bacillus anthracis* IsdG, a heme-degrading monooxygenase. *J Bacteriol* 188, 1071-1080.
- Soto, I.C., Fontanesi, F., Liu, J., y Barrientos, A. (2012). Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome *c* oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta* 1817, 883-897.

- Srivastava, P., Sharma, G.D., Kamboj, K.K., Rastogi, A.K., y Pandey, V.C. (1997). Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem* 171, 65-68.
- Stecon-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.
- Stoppani, A.O.M., Docampo, R., De Boiso, J.F., y Frascch, A.C.C. (1980). Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* respiration and growth. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2, 3-21.
- Svensson, B., Lubben, M., y Hederstedt, L. (1993). *Bacillus subtilis* CtaA and CtaB function in haem A biosynthesis. *Mol Microbiol* 10, 193-201.
- Svensson, B. y Hederstedt, L. (1994). *Bacillus subtilis* CtaA is a heme-containing membrane protein involved in heme A biosynthesis. *J Bacteriol* 176, 6663-6671.
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E., y Andrews, N.W. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 71, 1117-1130.
- Taylor, M.C., y Kelly, J.M. (2006). pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol* 6, 32.
- Taylor, M.C., y Kelly, J.M. (2010). Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology* 137, 899-917.
- Tenney, T.D., Curtis-Robles, R., Snowden, K.F., y Hamer, S.A. (2014). Shelter dogs as sentinels for *Trypanosoma cruzi* transmission across Texas. *Emerg Infect Dis* 20, 1323-1326.
- Tielens, A.G., y van Hellemond, J.J. (2009). Surprising variety in energy metabolism within *Trypanosomatidae*. *Trends Parasitol* 25, 482-490.
- 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.
- Tonelli, R.R., Silber, A.M., Almeida-de-Faria, M., Hirata, I.Y., Colli, W., y Alves, M.J. (2004). L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol* 6, 733-741.
- Tong, Y., y Guo, M. (2009). Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch Biochem Biophys* 481, 1-15.
- 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.
- 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.
- Tyler, K.M., y Engman, D.M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 31, 472-481.
- Ullu, E., Tschudi, C., y Chakraborty, T. (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 6, 509-519.
- Valnot, I., von Kleist-Retzow, J.C., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Taanman, J.W., Mehaye, B., Rustin, P., Tzagoloff, A., Munnich, A., y Rotig, A. (2000). A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 9, 1245-1249.
- 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., et al. (2003). Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 422, 83-87.

- Vanhollebeke, 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.
- Vanhollebeke, 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.
- Vargas, C., McEwan, A.G., y Downie, J.A. (1993). Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal Biochem* 209, 323-326.
- Vercesi, A.E., Bernardes, C.F., Hoffmann, M.E., Gadelha, F.R., y Docampo, R. (1991). Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J Biol Chem* 266, 14431-14434.
- Visser, W., van Spronsen, E.A., Nanninga, N., Pronk, J.T., Gijs Kuenen, J., y van Dijken, J.P. (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67, 243-253.
- Walker, D. (1987). The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis (Sheffield, U.K., Robert Hill Institute, University of Sheffield).
- Wandersman, C., y Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58, 611-647.
- Wang, Z., Wang, Y., y Hegg, E.L. (2009). Regulation of the heme A biosynthetic pathway: Differential regulation of heme A synthase and heme O synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 284, 839-847.
- 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.
- Warren, M.J., y Smith, A.G. (2009a). Tetrapyrroles: Birth, Life, and Death. (Austin, Texas, USA, Landes Bioscience), pp. 160-183.
- Warren, M.J., y Smith, A.G. (2009b). Tetrapyrroles: Birth, Life, and Death. (Austin, Texas, USA, Landes Bioscience), pp. 89-100.
- Warren, M.J., y Smith, A.G. (2009c). Tetrapyrroles: Birth, Life, and Death. (Austin, Texas, USA, Landes Bioscience), pp. 29-87.
- Warren, M.J., y Smith, A.G. (2009d). Tetrapyrroles: Birth, Life, and Death. (Austin, Texas, USA, Landes Bioscience), p. 235.
- Warren, M.J., y Smith, A.G. (2009e). Tetrapyrroles: Birth, Life, and Death. (Austin, Texas, USA, Landes Bioscience), pp. 101-115.
- Warren, M.J., y Smith, A.G. (2009f). Tetrapyrroles: Birth, Life, and Death. (Austin, Texas, USA, Landes Bioscience), p. 286.
- Warren, M.J., y Smith, A.G. (2009g). Tetrapyrroles: Birth, Life, and Death. (Austin, Texas, USA, Landes Bioscience), pp. 74-88.
- Westermann, B., y Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 1421-1427.
- Wilkinson, S.R., Obado, S.O., Mauricio, I.L., y Kelly, J.M. (2002). *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13453-13458.

- Wilks, A., y Burkhard, K.A. (2007). Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme. *Nat Prod Rep* 24, 511-522.
- Wilks, A., y Ikeda-Saito, M. (2014). Heme utilization by pathogenic bacteria: not all pathways lead to biliverdin. *Acc Chem Res* 47, 2291-2298.
- Woolsey, A.M., y Burleigh, B.A. (2004). Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiol* 6, 829-838.
- Woolsey, A.M., Sunwoo, L., Petersen, C.A., Brachmann, S.M., Cantley, L.C., y Burleigh, B.A. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci* 116, 3611-3622.
- Wu, R., Skaar, E.P., Zhang, R., Joachimiak, G., Gornicki, P., Schneewind, O., y Joachimiak, A. (2005). *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes with structural similarity to monooxygenases. *J Biol Chem* 280, 2840-2846.
- Zee, J.M., y Glerum, D.M. (2006). Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast. *Biochem Cell Biol* 84, 859-869.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., *et al.* (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1051-1054.