

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

Metabolismo redox en *Trypanosoma cruzi*.
Estudio de vías metabólicas dependientes de glutatión

Lic. Vanina E. Márquez

Director: Dr. Sergio A. Guerrero

Lugar de realización: Laboratorio de Bioquímica Microbiana.

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (FBCB-UNL-CONICET)

2014

Agradecimientos

Quisiera agradecer sinceramente a las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo de Tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por las oportunidades de estudiar, enseñar e investigar. Al Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biológicas y a la Dirección de Posgrado de esta Facultad.

Al Dr. Sergio Guerrero, por la oportunidad de concretar este trabajo, por sus valiosas enseñanzas, por el entusiasmo y la motivación transmitidos. Gracias también por generar un ambiente ameno y propicio para trabajar libremente.

Al Dr. Alberto Iglesias por contribuir a mi formación con valiosos aportes de conocimiento.

A la Universidad Nacional del Litoral y al CONICET, por otorgarme las becas doctorales que me permitieron llevar adelante este trabajo.

A las instituciones que financiaron los proyectos en que se enmarca esta tesis: CONICET, ANPCyT y UNL.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica Microbiana y del Laboratorio de Enzimología Molecular, gracias a cada uno por los momentos y experiencias compartidos y por su amistad.

Al Dr. Carlos Robello y los integrantes de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo.

A mi familia, gracias por la motivación y el apoyo. A mi esposo por alentarme, por su comprensión y su incondicional ayuda.

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Microbiana, bajo la dirección del Dr. Sergio Guerrero. Parte de los resultados obtenidos fueron presentados en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

PUBLICACIONES

Marquez, V.E.; Arias, D.G.; Piattoni, C.V.; Robello, C.; Iglesias, A.A.; Guerrero, S.A. 2010. Cloning, Expression, and Characterization of a Dithiol Glutaredoxin from *Trypanosoma cruzi*. *Antiox redox signal* 12: 787-792 (ISSN: 1523-0864).

Arias, D.G.; Márquez, V.E.; Chiribao, M.L.; Gadelha, F.R.; Robello, Carlos; Iglesias, A.A.; Guerrero, S.A. 2013. Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: Functional characterization of tryparedoxins revisited. *Free Radic. Biol. Med.* 63: 65-77 (ISSN: 0891-5849).

Marquez, V.E., Arias, D.G., Chiribao, M.L.; Faral, P.; Robello, Carlos; Iglesias, A.A.; Guerrero, S.A. Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin dependent cellular pathways. Aceptado para su publicación en *Biochimie* (ISSN: 0300-9084).

REUNIONES CIENTÍFICAS

Márquez, V.E.; Arias, D.G.; Piattoni, C.V.; Iglesias, A.A.; Guerrero, S.A. Dithiol glutaredoxin from *Trypanosoma cruzi*: cloning, expresión and characterization. XLV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. 10 al 13 de noviembre de 2009. San Miguel de Tucumán, Argentina.

Márquez, V.; Arias, D.; Iglesias, A.; Guerrero, S. Rol de la glutaredoxina ditiólica en respuesta a las condiciones de estrés oxidativo en *Trypanosoma cruzi*. XXIV Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de de Protozoología 4 al 6 de Octubre de 2010. Ascochinga, Argentina.

Márquez, V.; Arias, D.; Iglesias, A.; Guerrero, S. Functional and Biochemical characterization of a dithiol glutaredoxin in *Trypanosoma cruzi*. Symposium: Thiol metabolism and redox regulation of cellular functions. 25 y 26 de marzo de 2011. Punta del Este, Uruguay

Márquez, V.; Arias, D.; Chiribao, L.; Faral, P.; Robello, C.; Iglesias, A.; Guerrero, S. Estudio de las características funcionales de una glutaredoxina ditiólica en *Trypanosoma cruzi*. Comunicación oral. XXVI Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de de Protozoología 4 al 24 y 25 de Octubre de 2013. Rosario, Argentina.

Indice

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	vi
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 BIOLOGÍA REDOX. EFECTOS Y FUNCIONES REDEFINIDAS DE LAS MOLÉCULAS OXIDANTES	1
1.1.1 Sistemas antioxidantes biológicos	3
1.1.2 Roles biológicos de especies reactivas y tioles.....	5
1.2 METABOLISMO REDOX EN <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.2.1 Los parásitos kinetoplastidos, <i>Trypanosoma cruzi</i> y la enfermedad de Chagas	9
1.2.2 Vías metabólicas dependientes de tripanotión en el metabolismo redox de <i>T. cruzi</i>	14
1.2.3 Vía de síntesis y reducción de tripanotión.....	15
1.2.4 Proteínas efectoras en el metabolismo antioxidante en <i>T. cruzi</i>	17
1.2.5 Vías dependientes de GSH en <i>T. cruzi</i>	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO	23
3.2 VECTORES PLASMÍDICOS	26
3.3 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>T. cruzi</i>	28
3.4 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	28
3.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	28
3.6 OLIGONUCLEÓTIDOS	29
3.7 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	29
3.8 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	30
3.9 DIGESTIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN	30
3.10 LIGACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN.....	30
3.11 MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA.....	30
3.12 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR EL MÉTODO DEL SHOCK TÉRMICO	31
3.13 TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS	31
3.14 TRANSFORMACIÓN DE PARÁSITOS	32
3.15 CULTIVOS DE <i>E. COLI</i> PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	33
3.16 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	33
3.17 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	34
3.18 ENSAYOS DE WESTERN BLOT	34
3.19 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS.....	35
3.20 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A METAL INMOVILIZADO (IMAC).....	36
3.21 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A AMILOSA.....	36
3.22 DIAFILTRACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	37
3.23 FILTRACIÓN POR GELES.....	37
3.24 EVALUACIÓN DE PRODUCTOS DE REACCIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (TLC).....	37
3.25 ENSAYOS ENZIMÁTICOS	38
3.26 ANÁLISIS DE LA GLUTATIONILACIÓN POR MARCACIÓN CON DI-E-GSSG.....	40
3.27 DETERMINACIÓN DE LOS POTENCIALES DE REDUCCIÓN	40
3.28 DETERMINACIÓN DE pKa DE LAS CISTEÍNAS POR ABSORCIÓN UV	41
3.29 DETERMINACIÓN DEL pKa DE CISTEÍNAS NUCLEOFÍLICAS POR ENSAYO DE REDUCCIÓN DE DTNB	41
3.30 ENSAYOS EN CULTIVOS DE <i>T. cruzi</i>	42
3.31 CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD.....	42
3.32 ENSAYOS DE RESISTENCIA AL ESTRÉS	42

3.33	ENSAYOS DE APOPTOSIS	42
3.34	OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES	43
3.35	ENSAYOS DE INFECCIÓN	44
3.36	INMUNOLocalIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN <i>T. cruzi</i>	45
3.37	PERMEABILIZACIÓN PARCIAL CON DIGITONINA.....	45
3.38	DEGLUTATIONILACIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS DE <i>T. cruzi</i>	46
3.39	ENSAYOS CON CULTIVOS DE <i>S. CEREVISIAE</i>	47
4.1	CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE UNA GLUTATIONIL	
	ESPERMIDINA SINTETASA PRESENTE EN EL GENOMA DE <i>T. cruzi</i>	48
4.1.1	INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO.....	48
4.1.2	OBJETIVO.....	50
4.1.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1.3.1	Características y aislamiento del gen que codifica para una <i>TcrGspS</i> en el genoma de <i>T. cruzi</i> . Expresión de la proteína recombinante.....	50
4.1.3.2	Ensayos de actividad sintetasa.....	54
4.1.3.3	Estudio de la expresión de la <i>TcrGspS</i> en <i>T. cruzi</i>	61
4.1.4	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1	63
4.2	CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE UNA GLUTARREDOXINA	
	MONOTIÓLICA EN <i>T. cruzi</i>	65
4.2.1	INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO.....	65
4.2.1.1	Glutarredoxinas monotiólicas. Definición y características	65
4.2.1.2	Glutarredoxinas monotiólicas en proteínas multidominio.....	68
4.2.2	OBJETIVO.....	69
4.2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
4.2.3.1	Identificación de las secuencias que codifican para glutaredoxinas monotiolicas en <i>T. cruzi</i>	69
4.2.3.2	Aislamiento del gen Tc00.1047053511179.100 y obtención de la <i>TcrGrx3</i> recombinante. 72	
4.2.3.3	Ensayos de caracterización cinética.....	73
4.2.3.4	Expresión de <i>Tcr-1C-Grx3</i> en diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> . Localización subcelular	77
4.2.3.5	Análisis fenotípico de cepas de <i>S. cerevisiae</i> expresando <i>Tcr-1C-Grx3</i>	81
4.2.4	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2	87
4.3	CAPÍTULO3. CARACTERIZACIÓN DE UNA GRX DITIÓLICA EN <i>T. cruzi</i>.....	89
4.3.1	INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO	89
4.3.1.1	S-glutationilación de proteínas.....	89
4.3.1.2	Glutarredoxinas ditiólicas.....	91
4.3.2	OBJETIVO.....	93
4.3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
4.3.3.1	Identificación y análisis de las secuencias de los genes codificantes para una glutaredoxina ditiólica en <i>T. cruzi</i>	93
4.3.3.2	Aislamiento de los genes codificantes para la <i>TcrGrx</i>	96
4.3.3.3	Estudios de oligomerización de <i>TcrGrx</i>	97
4.3.3.4	Caracterización cinética de <i>TcrGrx</i>	99
4.3.3.5	Propiedades fisicoquímicas	108
4.3.3.6	<i>TcrGrx</i> en la S-deglutationilación de proteínas	113
4.3.3.7	Estudios de expresión y localización subcelular de la <i>TcrGrx</i> en <i>T. cruzi</i>	123
4.3.3.8	Estudios de funcionalidad <i>In vivo</i>	131
4.3.4	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3	143
5	BIBLIOGRAFÍA	145

Lista de abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
APx	ascorbato peroxidasa
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CySNO	S-nitroso cisteína
CySS	cistina
cytC	citocromo C
DAPI	4',6'-diamidino-2fenilindol
DHA	dehidroascorbato
Di-E-GSSG	diosin-glutación disulfuro
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DO	densidad óptica
DTNB	5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FAD	flavina adenina dinucleótido
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FMN	flavina mononucleótido
GFP	proteína fluorescente verde
GlcK	glucoquinasa
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
Grx	glutarredoxina
GS	glutación sintetasa
GSH	glutación (forma reducida)
GSNO	S-nitroso glutación
Gsp	glutathionil espermidina
GspS	glutathionil espermidina sintetasa
GspSH	glutathionil espermidina (forma reducida)
GSSG	glutación (forma oxidada)
HBS	<i>buffer</i> HEPES salino
HED	2-hidroxietyl disulfuro
HEPES	ácido N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-2-etano-sulfónico

IDA	ácido iminodiacético
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	<i>Lisogenic Broth</i>
LDH	lactato deshidrogenasa
LiOAc	Acetato de litio
MBP	proteína de unión a maltosa
Met	metionina
MetSO	metionina sulfóxido
MOPS	ácido 3-(N-morpholino)propanosulfónico
MSR	metionina sulfóxido reductasa
NAD	nicotinamida-adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida-adenina dinucleótido reducido
NADP	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido
NO	óxido nítrico
NTPs	nucleótidos trifosfato
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	<i>buffer</i> fosfatos salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PEP	fosfoenolpiruvato
PK	piruvato quinasa
Px	peroxirredoxina
RFP	proteína fluorescente roja
RNS	especies reactivas del nitrógeno
ROOH	peróxidos
ROS	especies reactivas del oxígeno
RR	ribonucleótido reductasa
SDS	dodecilsulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SHF	suero humano fresco
SOD	superóxido reductasa
Sp	espermidina
T(SH) ₂	triptanotión (forma reducida)

TAE	Tris-Acético-EDTA
<i>Tae</i> GAPC	gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa de <i>Triticum aestivum</i>
TB	<i>Terrific broth</i>
<i>Tcr</i> Grx	glutarredoxina ditiólica de <i>T. cruzi</i>
<i>Tcr</i> UDP-Glc-PPasa	UDP-glucosa pirofosforilasa de <i>T. cruzi</i>
TE	Tris-EDTA
TLC	cromatografía en capa delgada
<i>Tm</i>	temperatura de fusión (<i>melting</i>)
TR	tripanotión reductasa
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trx	tiorredoxina
TS	tripanotión sintetasa
TS ₂	tripanotión (forma oxidada)
TXN	triparredoxina
TXNP _x	triparredoxina peroxidasa
TxnR	tiorredoxina reductasa
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
1C-Grx	glutarredoxina monotiólica
β-ME	β-mercapto etanol
γ-GC	gama-glutamilcisteína
γ-GCS	gama-glutamilcisteína sintetasa

Resumen

En todas las formas de vida existen aspectos estrechamente ligados a la biología redox. Muchas formas de vida han tenido que desarrollar diversos mecanismos para resistir al desafío impuesto por las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Por otra parte, otros mecanismos evolucionaron para utilizar a estas especies reactivas con fines de regulación o señalización. El delicado balance redox intracelular depende de la acción conjunta y coordinada de proteínas y compuestos de baja masa molecular. Dentro de estos actores que forman parte del metabolismo redox, podemos mencionar a los tioles de baja masa molecular, como el glutatión, y los sistemas tiorredoxina y glutarredoxina. En los parásitos tripanosomátidos, el metabolismo redox constituye una compleja red dependiente fundamentalmente de tripanotión, un tiol de baja masa molecular específico de este tipo de organismos. Sin embargo, otros tioles como la glutationil espermidina y el glutatión también están presentes en estos parásitos. En el marco de este trabajo de tesis, se han abordado objetivos vinculados a la caracterización cinética y funcional de enzimas y proteínas redox de *T. cruzi* que en otros organismos han sido relacionadas al glutatión por su dependencia con este tiol.

En el primer capítulo de este trabajo se presentan resultados obtenidos en ensayos realizados con el fin de caracterizar una glutationil espermidina sintetasa (*TcrGspS*), cuyo estudio resulta interesante ya que solo se encontraría en algunos tripanosomátidos. El gen que codifica para esta *TcrGspS* fue amplificado desde el ADN del parásito y luego clonado para obtener la proteína recombinante. La enzima recombinante se empleó en ensayos cinéticos, pero no fue posible detectar actividad sintetasa. Por otra parte, a través de un ensayo de western blot se pudo concluir que en el parásito, la enzima se expresa en el estadio replicativo en el huésped.

En el segundo capítulo de esta tesis se presentan los estudios sobre una glutarredoxina monotiólica (1C-Grx) que forma parte de una proteína multidominio (tiorredoxina-glutarredoxina). El gen que codifica esta proteína (*Tcr-1C-Grx3*) fue amplificado a partir del ADN genómico de *T. cruzi*, y luego clonado para su expresión recombinante en un huésped procariota. Se realizaron ensayos de caracterización cinética valiéndose de la proteína recombinante. En estos ensayos se pudo establecer la capacidad de *Tcr-1C-Grx3* para catalizar la reducción de sustratos como el 2-hidroxietyl disulfuro y el glutatión disulfuro. Se pudo establecer que el tripanotión es un sustrato reductor

fisiológico en el parásito de la *Tcr-1C-Grx3*. Respecto a la reducción de disulfuros proteicos, no se evidenció la transferencia de equivalentes de reducción desde la *Tcr-1C-Grx3* hacia este tipo de disulfuros. La transferencia de equivalentes de reducción en las reacciones evaluadas se pueden relacionar al dominio 1C-Grx. Se presentan estudios de localización subcelular de esta proteína multidominio, en los que se estableció su ubicación en el citoplasma. A través de ensayos de complementación en levaduras se obtuvieron resultados que nos permitieron apoyar nuestra hipótesis sobre posibles funciones de esta proteína multidominio (*Tcr-1C-Grx3*) en el parásito.

En el tercer capítulo de esta tesis se abordó el estudio de una glutarredoxina ditiólica en *T. cruzi* (*TcrGrx*). Mediante el análisis *in silico*, se ha podido establecer la presencia de dos genes que codifican para esta proteína, en el genoma del parásito. Residuos aminoacídicos presentes en otras Grx previamente caracterizadas, han sido identificadas en la *TcrGrx*. La obtención de la proteína recombinante, producida en un hospedero procarionta, fue una herramienta que permitió la caracterización de esta proteína a través de ensayos cinéticos. Como resultado de estos ensayos fue posible identificar diversos sustratos de baja masa molecular que podrían ser blanco de la actividad tioltransferasa en esta proteína. Asimismo, se ha encontrado que sus posibles reductores fisiológicos podrían ser tanto el glutatión, el tripanotión o la glutationilpermidina. Se estudiaron aspectos de una modificación postraduccional escasamente abordados en el marco del metabolismo redox de los tripanosomátidos como es la glutationilación. Se estudió que esta modificación de las proteínas, con fines de protección, regulación y de señalización, involucra a la *TcrGrx* en *T. cruzi*. Desde una perspectiva *in vivo*, se presentan ensayos para poner de manifiesto los roles que podría cumplir esta Grx en procesos vinculados con el ciclo de vida del parásito como el estrés oxidativo, la apoptosis y la infección de células hospedadoras.

Considerando el escenario metabólico redox tan particular en tripanosomátidos en general, y en *T. cruzi* en particular, los resultados obtenidos constituyen un aporte al conocimiento de los distintos componentes de este escenario metabólico y serán de utilidad para avanzar en el conocimiento de la fisiología de este parásito.

Abstract

Aspects that are closely related to redox biology exist in all forms of life. Many forms of life have developed mechanisms to resist to the challenge of reactive oxygen and nitrogen species. On the other hand, other mechanisms evolved to use these reactive species for regulation or signalling purposes. The intracellular redox balance depends on the coordinate action of proteins and low molecular mass compounds, including low molecular weight thiols, such as glutathione, and thioredoxin and glutaredoxin systems. In trypanosomatid parasites, redox metabolism is a complex network based on trypanothione (a low molecular weight thiol belonging specifically to trypanosomatids). However, other low molecular weight thiols such as glutathionylspermidine and glutathione are also present in the parasite. In this work, we have addressed objectives related to the kinetic and functional characterization of enzymes and redox proteins from *T. cruzi*, which were linked to glutathione metabolism as they were characterized as glutathione-dependent enzymes.

Chapter one of this thesis deals on the results obtained in assays performed with the aim to characterize a glutathionylspermidine synthetase (*TcrGspS*). The main interest in the study of this enzyme lies in the fact that it would be detected only in *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* and *Leishmania infantum*. The gene coding *TcrGspS* was amplified by PCR from the parasite genomic DNA, and then it was cloned to obtain the recombinant protein. The recombinant enzyme was used in kinetic assays, but no synthetase activity could be detected. The protein was detected in extracts of amastigote stage of the parasite, through western blot assays.

The second chapter of this thesis shows the studies about a monothiolic glutaredoxin (1C-Grx) included in a multidomain protein (thioredoxin-glutaredoxin). The gene coding for this protein (*Tcr-1C-Grx3*) was amplified from *T. cruzi* genomic DNA, and then cloned for recombinant expression of the protein in a prokaryote host. Kinetics assays were performed, utilizing the recombinant protein. In these assays it was established the capacity of the *Tcr-1C-Grx3* to catalyze the reduction of substrates such as 2-hydroxyethyl-disulphide and glutathione disulphide. Trypanothione was found as a reducer agent, and it is possibly the physiological reducer for this protein in the parasite context.

No reduction equivalents were transferred from *Tcr-1C-Grx3* to protein disulphides. The transfer of reduction equivalents in the reactions studied, were fundamentally linked to 1C-Grx domain. Localization studies performed in the parasite indicate that *Tcr-1C-Grx3* is located in the cytoplasm. Results obtained from yeast complementation assays support the hypothesis of the possible functions of this multidomain protein in the parasite.

In the last chapter of the thesis, the study of a dithiolic glutaredoxin (*TcrGrx*) is addressed. Through an *in silico* analysis it was established that two genes coding the same Grx are present in *T. cruzi* genome. The aminoacidic residues, previously determined as important for the catalytic functions, were identified in *TcrGrx*. The recombinant protein, obtained in a prokaryote host, was a useful tool to achieve the characterization of the protein in kinetic assays. As a result of this characterization, we identified several low molecular weight substrates that could be target of the thioltransferase activity of *TcrGrx*. Moreover, glutathione, tripanothione and glutathionylspermidine were identified as physiological probable reducer agents. Aspects of a posttranslational modification of proteins, such as the glutathionylation, with protection, regulation and signalling purposes, were scarcely studied in *T. cruzi* previously. Glutathionylation was linked to *TcrGrx* as a result of studies addressed through different strategies in this work. By means of *in vivo* assays, it was possible to reveal roles for *TcrGrx* in relevant processes for the parasite life cycle, such as oxidative stress, apoptosis and replication in host cells.

Considering the peculiarities of the redox metabolism in *T. cruzi*, the results presented constitute a contribution to the knowledge of the functionality of all components of this metabolic pathway, and will be useful to promote the understanding of the physiology of this parasite.

1 Introducción General

1.1 Biología redox. Efectos y funciones redefinidas de las moléculas oxidantes

En todas las formas de vida existen aspectos estrechamente ligados a la biología redox. Por ejemplo la oxidación de sustratos para obtener energía, la reducción de compuestos oxidados para utilizarlos como materia prima en las rutas de biosíntesis de componentes celulares, la necesidad de mantener un ambiente reductor (en ciertos compartimientos subcelulares) para el correcto funcionamiento de muchas enzimas, la necesidad de mantener la homeostasis de compuestos involucrados en el metabolismo redox para evitar las situaciones de stress celular, etc. La flexibilidad de los mecanismos sensores del estado redox y la regulación redox de una vasta cantidad de efectores en la célula han sido procesos clave en los distintos tipos celulares durante el curso de la evolución.

El oxígeno apareció en cantidades significativas en la atmósfera de la tierra unos 2200 millones de años atrás, como subproducto de la recientemente evolucionada fotosíntesis a cargo de primitivas cianobacterias (Halliwell, 2006). Esta aparición del oxígeno fue ventajosa en varios sentidos: condujo a la formación de la capa de ozono, que protege a los organismos vivientes de la radiación UV-C, y fue un elemento clave en la remoción del hierro (en la forma de Fe^{2+}) de los medios acuáticos (Banerjee, 2008). Los primeros organismos sobre la tierra disponían de una atmósfera con mucho N_2 , CO_2 y poco O_2 , los metabolismos de éstos eran primordialmente anaerobios. Cuando el O_2 se incrementó, muchos organismos murieron, mientras que otros evolucionaron mecanismos de defensa antioxidantes, aunque debieron confinarse a nichos anaerobios (McCord, 2000). La evolución también dirigió a muchos de los organismos que adaptaron su tolerancia al O_2 a utilizarlo para diferentes transformaciones metabólicas (Luikenhuis y col., 1998; Halliwell, 2006; Banerjee, 2008). Así, habría surgido el papel facilitador del O_2 en la producción de energía, empleando cadenas de transporte de electrones con O_2 como aceptor final, una adaptación que significó un incremento en el rendimiento de ATP obtenido a partir de las moléculas empleadas como combustibles celulares (por ejemplo glucosa). Detrás de esta eficiente utilización, subyace el hecho de que el O_2 es un potente oxidante, por lo que la evolución simultánea de mecanismos

antioxidantes fue necesaria para garantizar la supervivencia de las diferentes formas de vida (McCord, 2000).

En el año 1894 H. J. H. Fenton demostró que el peróxido de hidrógeno en combinación con hierro era capaz de oxidar biomoléculas, pocos años después se demostró la existencia del radical hidroxilo (Koppenol, 1993; Halliwell, 2006). Tuvieron que pasar unos 50 años para que fuese posible detectar radicales libres en sistemas biológicos y algún tiempo después se comenzó a sospechar del rol de los radicales derivados del oxígeno en los efectos observados frente a eventos como la exposición a radiaciones ionizantes (Gerschman y col., 1954). En 1954, Chance y Williams reportaron sobre la generación de H_2O_2 en la mitocondria como consecuencia de la respiración (Chance y Williams, 1956).

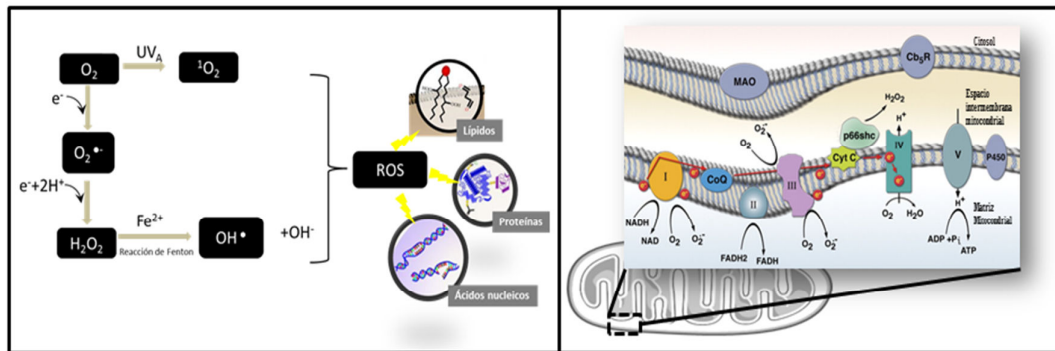


Fig. 1.1: Producción de ROS en sistemas biológicos. A) Algunos de los mecanismos de producción de ROS y componentes celulares afectados por su efecto oxidante. B) Producción de ROS en la mitocondria durante la respiración.

Actualmente es un hecho aceptado que tanto células procariotas como eucariotas producen ROS (especies reactivas del oxígeno) como consecuencia de reacciones metabólicas esenciales, principalmente a través de la respiración aeróbica (Fig. 1.1), y otras reacciones como por ejemplo la oxidación de toxinas a nivel del citocromo P450 (Banerjee, 2008), o la oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas (Dansen y Wirtz, 2001). ROS (Fig.1.1) es un término que denomina colectivamente a especies no radicales derivadas del O_2 , como el H_2O_2 así como también radicales libres derivados del O_2 como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), los radicales hidroxilo (HO^{\bullet}), peroxi- (RO_2^{\bullet}) y alcoxi- (RO^{\bullet}) (Circu y Aw, 2010). La reactividad con la que generalmente se describe a estas especies, y otras especies reactivas como las del nitrógeno, es un término relativo, ya algunas de estas especies tienen cierta selectividad para reaccionar, mientras que

otras son bastante menos selectivas, pero en general suelen estar todas involucradas en reacciones muy rápidas (Halliwell, 2006). Cuando estas reacciones ocurren en el interior de las células, las especies reactivas del oxígeno pueden causar daños sobre diferentes componentes (ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, etc) (Halliwell, 2006; Banerjee, 2008; Circu y Aw, 2010). El paradigma vigente durante muchos años acerca del rol unívoco, nocivo que las ROS y RNS (especies reactivas del nitrógeno) cumplían en las células está siendo alterado por la creciente evidencia sobre las funciones que estas especies desempeñan en las vías de transducción de señales, en condiciones normales o basales (Aguirre y col., 2005; Halliwell, 2006; Dalle-Donne y col., 2009; Circu y Aw, 2010). Cada vez existe más evidencia que apoyan otras funciones para las ROS como para las RNS, en aspectos tan importantes como la respuesta inmune, la regulación de la proliferación, la diferenciación celular, y en la transducción de señales (Circu y Aw, 2010). Es decir que las especies reactivas cumplirían roles tanto deletéreos como regulatorios, dependiendo fundamentalmente de las concentraciones en las que se presenten. Generalmente, pequeñas concentraciones, en regiones muy focalizadas de la célula, son suficientes para llevar adelante las funciones regulatorias, y así se previene el daño que mayores concentraciones son capaces de causar.

1.1.1 Sistemas antioxidantes biológicos

A grandes rasgos, es posible generalizar sobre la composición de los sistemas antioxidantes indicando que estos se componen de moléculas no proteicas antioxidantes, cofactores redox y enzimas antioxidantes. Las características de estos componentes y la presencia de todos o solo algunos, son particularidades de cada organismo.

Dentro del grupo de las moléculas antioxidantes se encuentran glutatión (GSH), ascorbato, β -caroteno, ácido dihidrolipoico, α -tocoferol, flavonoides y ácido úrico, entre otros. Algunos tioles de baja masa molecular, característicos de ciertos organismos, también se agrupan dentro de esta categoría, como por ejemplo el tripanotión (en tripanosomátidos) (Irigoín y col., 2008), el micotiol (en actinomicetes) (Newton y col., 1996), el bacilitiol (bacterias del género bacillus) (Gaballa y col., 2010). Estas moléculas antioxidantes cumplen funciones en el mantenimiento de la homeostasis redox en la célula, algunas de ellas actuando como *buffers* redox, también en la remoción o desactivación de oxidantes radicales o no radicales (Barycki, 2008).

1.1.2 Roles biológicos de especies reactivas y tioles

El grupo tiol en el aminoácido cisteína es un grupo funcional altamente sensible a la oxidación lo cual hace a este residuo por un lado vulnerable, pero desde otra perspectiva muy útil con fines estructurales y regulatorios. Los tioles biológicos pueden ser clasificados como tioles de baja masa molecular como por ejemplo el tripéptido GSH (Fig. 1.3- A) (Zhang y Forman, 2012), la cisteína y el ácido dihidrolipoico (Krauth-Siegel y Leroux, 2012), y tioles de elevada masa molecular, como son los tioles en proteínas (ejemplo en una tioredoxina como la que se ilustra en la Fig. 1.3- B) (Dalle-Donne y col., 2009). Como se comentó anteriormente, los tioles pueden actuar en los sistemas de detoxificación de especies radicales o no radicales espontáneamente, o pueden llevar a cabo su acción catalíticamente, como ocurre con los sistemas enzimáticos, muchos de los cuales también se basan en la oxidorreducción de grupos tioles en la molécula de la proteína.

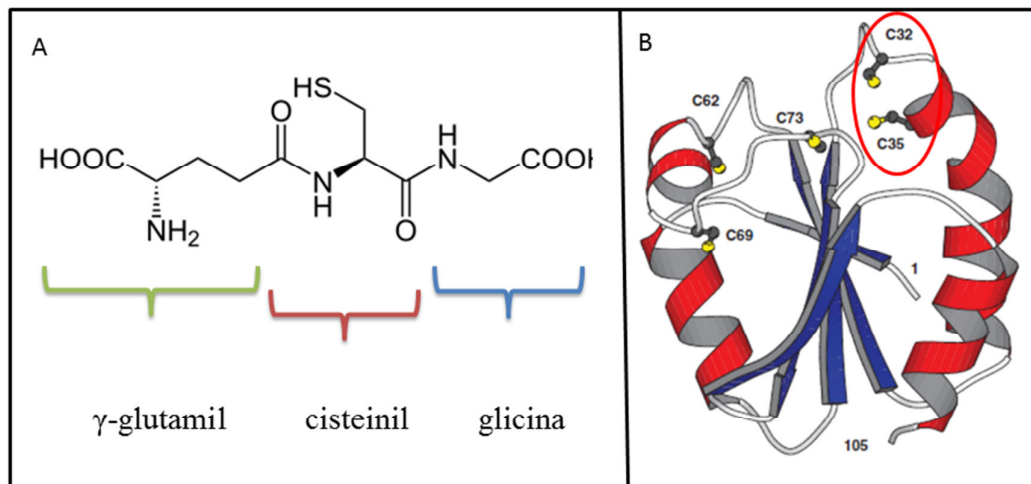


Fig. 1.3: Ejemplos de tioles relevantes en sistemas biológicos. A) Molécula del tripéptido glutatión. B) Tiorredoxina 1 en mamíferos, en la elipse roja se destacan los residuos que contienen tioles en el sitio activo [adaptado de (Holmgren, 2008)].

Al sufrir modificaciones oxidativas, los tioles pueden generar una variedad de especies oxidadas, dependiendo de las características y concentraciones de los agentes oxidantes que generen estas modificaciones (Dalle-Donne y col., 2009). En el caso de los tioles presentes en proteínas, los cambios que resultan de estas oxidaciones pueden afectar características estructurales o funcionales o ambas en la molécula. En la Fig. 1.4 se esquematizan las especies oxidadas más comunes que pueden ocurrir en los tioles

situados en proteínas y se representan las vías posibles por las que pueden ocurrir estas modificaciones. Concentraciones crecientes del agente oxidante, pueden hacer que la oxidación del tiol resulte en la formación de ácido sulfénico, sulfínico o sulfónico (Zaffagnini y col., 2007). Mientras la formación de ácido sulfénico puede ser revertida, la generación de las otras dos especies es usualmente irreversible, con algunas excepciones (Jönsson y col., 2005). También puede formarse el radical tío, que por su naturaleza de radical es una especie reactiva, y tiende a reaccionar con otros tioles para formar otras especies. En otra situación, la oxidación en proteínas conduce a la formación de disulfuros que pueden ser intra-moleculares (entre cisteínas de la misma molécula), intermoleculares (entre cisteínas de dos moléculas) o pueden ser disulfuros mixtos, entre el tiol de la proteína y un tiol de baja masa molecular (una forma de la proteína que se denomina S-tiolada). Si el tiol es el glutatión, la proteína está glutatiónilada (Giustarini y col., 2005). En presencia de RNS, los tioles pueden ser modificados por S-nitrosación para generar proteínas S-nitrosadas.

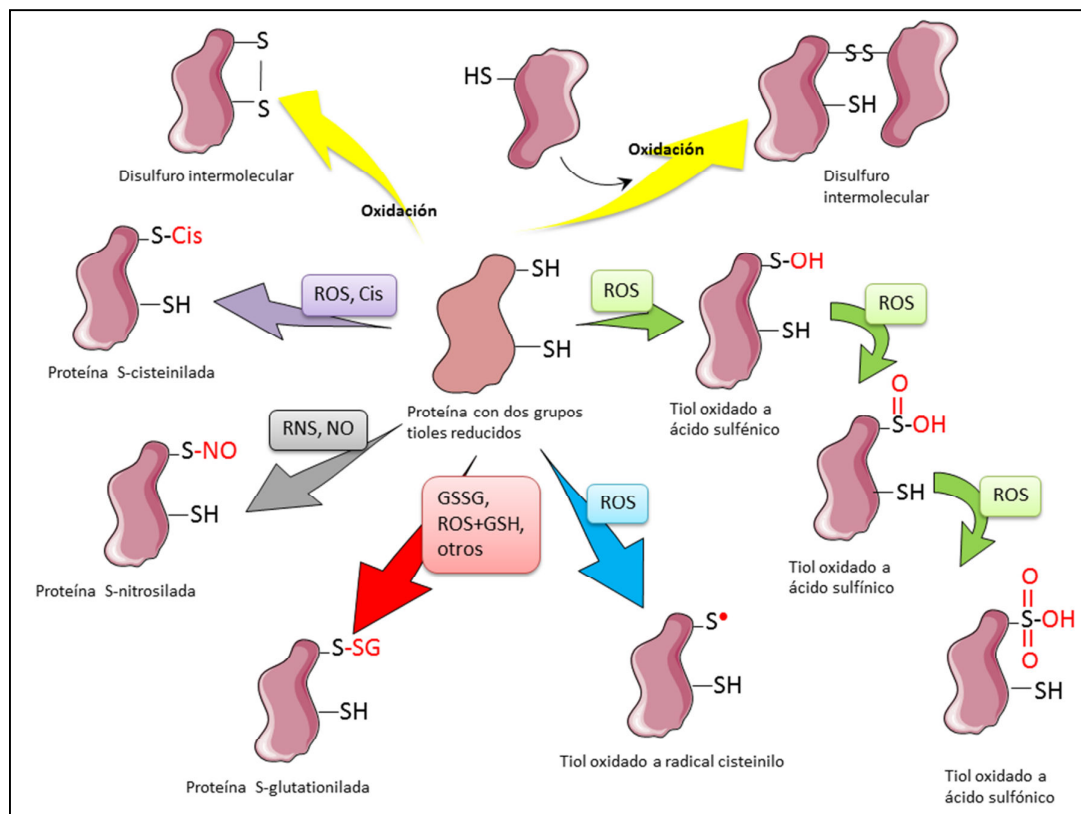
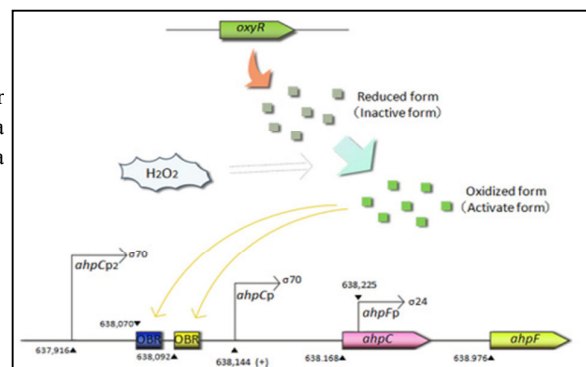


Fig. 1.4: Especies formadas por diversos mecanismo de oxidación de los tioles presentes en proteínas.

Cabe mencionar entonces que algunas de las modificaciones que pueden sufrir los tioles son reversibles, mientras que otros no, y son aquellas formas de oxidación reversibles las que son más aplicables e interesantes desde punto de vista de la regulación y la señalización redox (Dalle-Donne y col., 2007; Lillig y col., 2008). Los tioles presentes en las proteínas pueden actuar como interruptores sensibles al entorno redox, cumpliendo funciones centrales en la regulación de la función de esa proteína, como podría ser la actividad enzimática. Este es el caso, por citar un ejemplo, de algunas gliceraldehído-3-P-deshidrogenasas (Zaffagnini y col., 2007). Se ha estudiado en plantas que la regulación de la actividad de estas enzimas en respuesta al H_2O_2 es capaz de inducir un *switch* metabólico, desde la síntesis de compuestos necesarios para el anabolismo hacia la generación de NADPH, como respuesta a una situación de estrés en que las células necesitan generar poder reductor (Piattoni y col., 2013).

Otro caso paradigmático que ejemplifica la función de los tioles en la señalización intracelular lo constituye la regulación transcripcional ejercida por el factor OxyR, en bacterias. Este sería un ejemplo de una proteína que oficia de sensor de los niveles de H_2O_2 dentro de una célula y las traduce en respuesta molecular (Dröge, 2002), como la regulación de la expresión de genes, llevando a cabo sus funciones a través de los tioles. OxyR es una proteína, cuyos niveles de expresión no se ven alterados frente a la inducción con oxidantes. Sin embargo, al oxidarse esta proteína se convierte a su forma activa (Dröge, 2002). Estudios más detallados han demostrado que las formas oxidadas y reducidas de OxyR interactúan de manera diferente con el ADN. Solo esta forma oxidada es capaz de interactuar con determinadas regiones promotoras en el ADN de ciertas bacterias que lo poseen, para activar la transcripción de diversos genes vinculados en la respuesta frente a este tipo de estrés como son peroxidasas, reductasas, tiorredoxinas, glutarredoxinas, etc (Fig. 1.5).

Fig. 1.5: Regulación de la expresión génica por el factor OxyR, sobre el gen *ahpC* que codifica para una alquil hidroperóxido reductasa bacteriana (Tomado de <http://igem.org>).



Como se comentó anteriormente, muchos tipos celulares producen H_2O_2 con propósitos de señalización intracelular (Aguirre y col., 2005; Halliwell, 2006; Finkel, 2011). Para evitar el daño que estas especies pueden producir en otros niveles, la producción es localizada, un ejemplo de cómo esta sectorización es alcanzada lo constituyen NADPH oxidasas en células de mamíferos, estratégicamente ubicadas en *rafts* de membranas, y que son activadas en respuesta a alguna señal del receptor que corresponda a la vía de señalización en cuestión (Aguirre y col., 2005; Finkel, 2011). El H_2O_2 producido actúa como una molécula mensajera, oxidando residuos de cisteína críticos en las proteínas efectoras de la cascada de señalización que los implica, como por ejemplo las que conducen a la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento como el EGF (*E*pidermal *G*rowth *F*actor), KGF (*K*eratinocyte *G*rowth *F*actor) y otros (Fig. 1.6). La comprensión de estas vías de señalización revela paulatinamente el amplio significado y el potencial que tiene la modificación de tioles en proteínas en las funciones que llevan a cabo los diferentes tipos celulares.

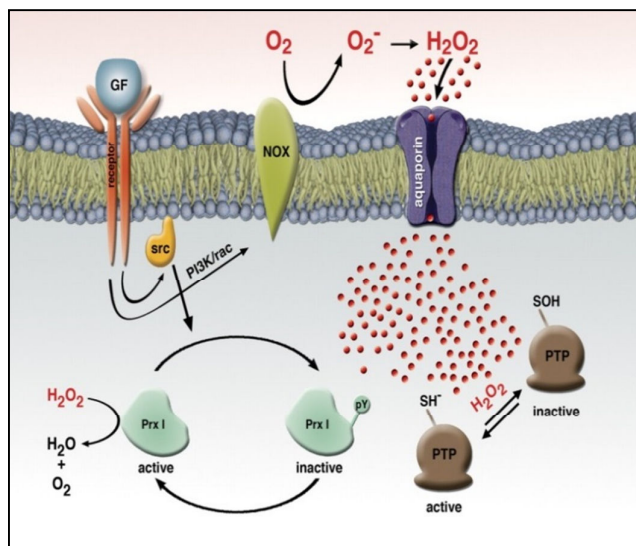


Fig. 1.6: Mecanismo propuesto para la acumulación de ROS en áreas discretas dentro de la célula. Un factor de crecimiento (GF) estimula al receptor, que interacciona con la NOX (oxidasa dependiente de NADPH) con generación de superóxido. Las ROS generadas ingresan por acuaporinas. En el citoplasma, parte de estas especies serán detoxificadas, pero la inactivación local de las peroxiredoxinas en la región cercana al receptor permitirá una acumulación localizada de las ROS permitiendo la interacción con los *targets* modulados vía oxido-reducción. Tomado de (Finkel, 2011).

Por otra parte, la S-tiolación de proteínas es una modificación que ha cobrado gran relevancia a causa las funciones en la señalización celular que se le atribuyen. Consiste en la formación de un disulfuro mixto con otro tiol (Fig. 1.4), por ejemplo el de la cisteína en el caso de la cisteinilación, o el glutatión en el caso de la glutatiónilación (evento bioquímico que abordaré con más detalle más adelante). La S-nitrosilación y la S-glutatiónilación son mecanismos frecuentemente investigados de transducción de señales redox u óxido nítrico dependientes (Aesif y col., 2010). La S-nitrosilación puede

ser mediada por varias especies como el NO o varias RNS (Dalle-Donne y col., 2009). Si bien se han detectado casos de proteínas que cumplen un amplio espectro de funciones y que son sujetos de regulación por S-nitrosilación (Hess y col., 2005), existen ejemplos paradigmáticos en algunos sistemas de ejecución de ciertas modificaciones post-transduccionales, como es el caso de como algunas kinasas y fosfatasa (Reynaert y col., 2004). También proteínas ejecutoras de importantes funciones en el destino de la célula, como la apoptosis. Este es el caso de las caspasas 3 y 9 en células endoteliales de mamíferos, con una marcada inhibición de su actividad cuando se encuentran nitrosiladas (Mannick, 2007; Circo y Aw, 2010). Por otra parte la de-nitrosilación ha sido reportada como una actividad proapoptótica a este nivel (Circo y Aw, 2010).

Como se ha detallado, es bastante amplio el panorama sobre los efectos deletéreos y las funciones regulatorias de las ROS y RNS y los alcances de estos deben ser estudiados en el marco del metabolismo redox de cada tipo de célula en particular. Por este motivo se introduce a continuación una revisión sobre este metabolismo en *T. cruzi*, organismo en estudio en el marco de esta tesis.

1.2 Metabolismo redox en *Trypanosoma cruzi*

1.2.1 Los parásitos kinetoplásticos, *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas

Los kinetoplásticos son un grupo de parásitos protozoarios unicelulares flagelados que se caracterizan por poseer una única mitocondria de gran tamaño, en la que se sitúa una región que contiene ADN (circular y altamente organizado), región denominada kinetoplasto (Stuart y col., 2008). Las enfermedades más comunes causadas por los parásitos del orden *kinetoplastidia* se clasifican dentro de las denominadas enfermedades desatendidas, y son consideradas enfermedades relacionadas con el escaso desarrollo socioeconómico de las poblaciones afectadas, estas enfermedades son las tripanosomosis y las leishmaniosis (<http://www.who.int>). Las tripanosomosis africanas, son causadas por la infección con diversas sub-especies de *Trypanosoma brucei*, la tripanosomosis americana o enfermedad de Chagas es causada por *Trypanosoma cruzi*, mientras que diferentes especies del género *Leishmania* causan distintas formas clínicas de leishmaniosis (Murray y col.; Barrett y col., 2003).

Trypanosoma cruzi, fue descubierto en el año 1909, en Minas Gerais (Brasil), en el intestino del insecto vector, por Carlos Chagas, quien lo relacionó con una enfermedad desconocida que padecían habitantes de la región (Coura y Borges-Pereira, 2010). Fue nombrado en honor al mentor de Chagas, el epidemiólogo Oswaldo Cruz (Andrade y Andrews, 2005). Su descubrimiento fue escasamente tenido en cuenta, hasta que años después desde la Misión de Estudios de Patología Regional, Salvador Mazza y sus colaboradores sistematizaron estudios clínicos y patológicos que revelaron la existencia y prevalencia de esta enfermedad en Argentina (Gürtler y col., 2008). La enfermedad de Chagas afecta entre 7 a 8 millones de personas en el mundo, siendo endémica en América Latina (<http://www.who.int>- consulta del 25-01-14, datos relevados en marzo de 2013). Se estima que en Argentina un millón y medio de personas están afectadas, lo que lo constituye en uno de los principales problemas de salud pública (<http://www.msal.gov.ar/chagas/index.php/informacion-para-ciudadanos/el-chagas-en-el-pais-y-america-latina>, consulta del 25-01-2014)

Al igual que en el caso de otros protozoarios de la familia *Trypanosomatidae*, *T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo, involucrando estadios que se diferencian en lo que respecta a la morfología, fisiología, bioquímica, etc. (Barrett y col., 2003; Stuart y col., 2008). Este ciclo de vida requiere dos tipos de hospedadores, un hospedador mamífero definitivo y un hospedador insecto intermediario. En la Fig. 1.7 se representa esquemáticamente el ciclo de vida de *T. cruzi*. Es posible definir las siguientes características para los estadios considerados principales (De Souza, 2002):

- ☞ **Amastigotes**: Esta forma del parásito se encuentra en el interior de las células del hospedador mamífero de morfología redondeada característica, no flagelada. Es una forma replicativa por mitosis e infectiva para otras células del hospedador mamífero.
- ☞ **Epimastigotes**: tienen forma alargada, ligeramente piriforme, flagelados, que se encuentran en el intestino del insecto vector, esta forma no es infectiva. En este estadio los parásitos replican por mitosis y pueden ser mantenidos en cultivos axénicos.
- ☞ **Tripomastigotes**: Es la forma flagelada, infectiva y no replicativa. Se denominan **tripomastigotes sanguíneos** a la forma circulante en el hospedador mamífero, y **tripomastigotes metacíclicos** a la forma diferenciada encontrada en el insecto vector, luego del proceso denominado metaciclologénesis (que refiere a la transformación de epimastigotes en tripomastigotes). Pueden encontrarse

tripomastigotes compatibles con las características de los sanguíneos en el medio de cultivos infectados, aunque estos son generalmente denominados tripomastigotes derivados de células. En cultivos axénicos de epimastigotes, durante la fase estacionaria, pueden encontrarse tripomastigotes metacíclicos.

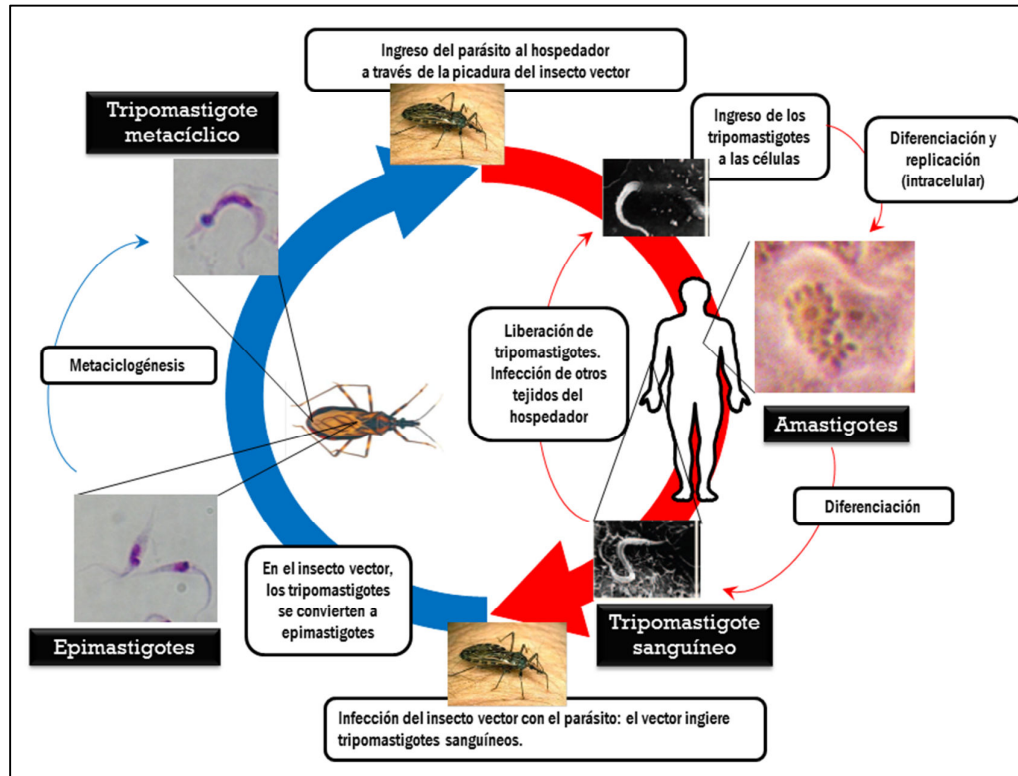


Fig. 1.7: Transmisión a través del insecto vector y ciclo de vida de *T. cruzi*.

T. cruzi infecta a humanos así como también a animales domésticos y salvajes. En áreas endémicas la fuente más frecuente de infección y más difundida es la vectorial, siendo los insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae los vectores más importantes en el cono sur. Luego de que un insecto portador de los parásitos se alimenta de la sangre del humano, libera en las deyecciones los tripomastigotes metacíclicos. La misma picadura produce prurito, que lleva a la persona a facilitar el contacto de los parásitos con la herida, produciéndose la infección. El ingreso de los parásitos también puede ocurrir a nivel de las mucosas bucal o conjuntiva. Una vez en el hospedador vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos pueden infectar cualquier tipo de células nucleadas, especialmente macrófagos aunque también invaden células no fagocíticas de otros tejidos cercanos a la zona de entrada. En el interior de las células infectadas los

tripomastigotes son contenidos en una estructura denominada vacuola parasitófora, desde la cual escapan para diferenciarse a amastigotes, en el citosol de la célula hospedera y allí comenzar a replicarse por división binaria. Luego de un cierto número de generaciones, los amastigotes generados se diferencian a tripomastigotes del tipo sanguíneo, que son liberados luego de la lisis de la célula hospedadora y alcanzarán el torrente sanguíneo para diseminar la infección hacia otros tejidos, infectando otras células (tejido cardíaco, musculo esquelético, sistema digestivo, tejido adiposo, etc.). Pero los parásitos liberados a la circulación también pueden ser ingeridos por un insecto triatomino no infectado al alimentarse. Al ingresar al aparato digestivo del insecto se diferencia al estadio epimastigote, que se duplica en el intestino medio, y algunos de los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos a nivel de la ampolla rectal del insecto vector, cerrándose el ciclo biológico cuando este insecto se alimenta de la sangre de un individuo sano. Además de la transmisión por vectores, existen otras fuentes de infección con *T. cruzi* en humanos, que junto a los métodos principales de control son resumidas en la Fig. 1.8.

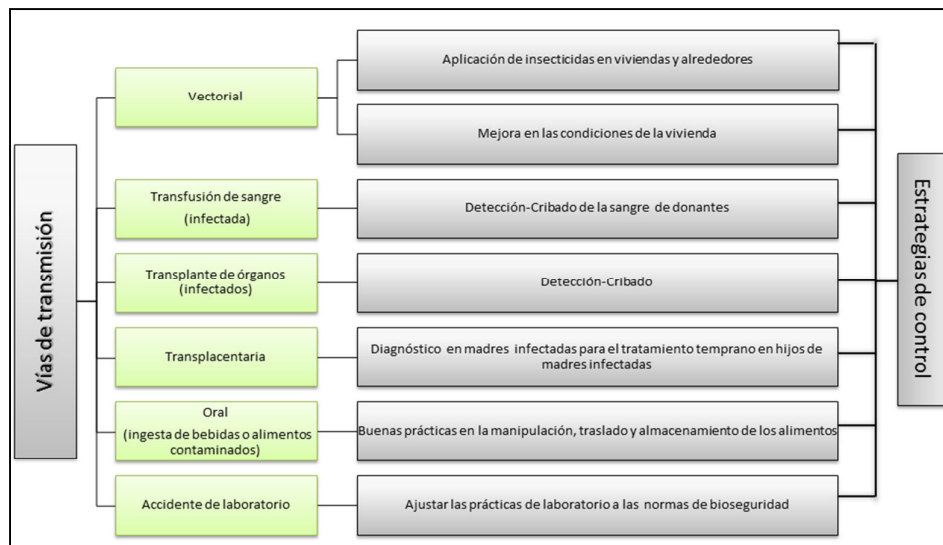


Fig. 1.8: Transmisión de *T. cruzi*: Vías (mecanismos de infección) y medidas de control relacionadas.

En el hospedador vertebrado, la enfermedad se desarrolla en dos fases, aguda y crónica, cada una de ellas con características clínicas y criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes (Coura y Borges-Pereira, 2010). El proceso de amplificación intracelular de los parásitos y liberación de tripomastigotes es el responsable de la fase aguda de la

enfermedad. Luego de esta fase, el número de parásitos circulantes disminuye y comienza la fase crónica o indeterminada, una situación en la que el hospedador humano puede permanecer por varios años, luego de los que se pueden desarrollar síntomas clínicos a causa del daño severo que sufren los tejidos afectados (Andrade y Andrews, 2005; Rassi Jr y col., 2010), no solo como consecuencia de la diseminación del parásito en sí, sino también como consecuencia de la respuesta inmune del huésped. El grado de compromiso de los sistemas circulatorio, digestivo depende del grado del daño a los tejidos de estos sistemas y determina la morbilidad y mortalidad de la enfermedad (Rassi Jr y col., 2010).

En cuanto a los tratamientos actuales una vez producida la infección, las únicas drogas autorizadas para la quimioterapia son benznidazol y nifurtimox (Rassi Jr y col., 2010). Estas drogas fueron desarrolladas en el año 1960, en el caso de nifurtimox, y el benznidazol en 1970. El éxito de estos tratamientos depende de varios factores: i) la edad de los pacientes (siendo más efectivo en pacientes menores de 17 años), ii) el tiempo transcurrido entre la infección y el inicio del mismo, iii) la susceptibilidad de la cepa de *T. cruzi* a la droga en cuestión. Uno de los principales inconvenientes de estas drogas es su inefectividad en el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad (Barrett y col., 2003). El otro gran inconveniente es la intensidad y la frecuencia de efectos adversos (de tipos digestivos, neurológicos, dermatológicos, y a nivel de los parámetros bioquímicos) (Barrett y col., 2003). La aparición de estos efectos adversos conlleva en muchos casos a la necesidad de discontinuar el tratamiento. Nuevas drogas son necesarias para prevenir, además de los efectos adversos, los casos de resistencia que han emergido, aumentando la eficacia y previendo su aplicación en tratamientos menos prolongados, apostando incluso a una terapia combinada utilizando diferentes principios activos (Fairlamb y col., 2003). Los kinetoplastidos patógenos de mamíferos están exquisitamente adaptados a sus hospederos, para evadir la respuesta inmune y para persistir luego de invadir células y órganos (De Souza y col., 2010; DosReis, 2011). Con la oportunidad que se vislumbra del incipiente análisis de los proyectos genoma, se progresa en la comprensión de funciones, rutas metabólicas, fisiología y patogénesis de los kinetoplastidos que sientan las bases para el potencial desarrollo de las herramientas necesarias (vacunas, métodos de diagnósticos, drogas, etc.) para la intervención en esta problemática de salud pública (Stuart y col., 2008).

1.2.2 Vías metabólicas dependientes de tripanotión en el metabolismo redox de *T. cruzi*

Entre muchas otras particularidades a nivel bioquímico y genético que distinguen a los tripanosomátidos, las vías que protegen del estrés oxidativo a estos parásitos difiere significativamente de aquella encontrada en mamíferos (Barrett y col., 2003). Durante la etapa aguda de la infección, los macrófagos residentes en la zona de la infección son invadidos por *T. cruzi*, el mecanismo por el que ocurre la infección de este tipo de fagocitos profesionales implica que el parásito debe sobrevivir y evadir el ambiente altamente oxidativo generado dentro del fagosoma para poder establecer la infección (Piacenza y col., 2012). De aquí que el estudio de este metabolismo ha suscitado interés como potencial fuente de blancos para nuevas drogas, así como otras vías metabólicas que son cruciales para la infección y la supervivencia del parásito.

Una de las principales diferencias encontradas en tripanosomátidos, respecto a otros organismos, radica en el rol central que cumple el tripanotión [T(SH)₂], en el metabolismo redox (Krauth-Siegel y Comini, 2008). El T(SH)₂ es un ditiol de baja masa molecular presente exclusivamente en los tripanosomátidos, que consiste en dos moléculas de GSH covalentemente unidos a una molécula de la poliamina espermidina (Sp) (Krauth-Siegel y Leroux, 2012; Arias y col., 2013a). Aunque los potenciales de reducción son bastante similares (Fairlamb y Cerami, 1992), el T(SH)₂ es un agente reductor más eficiente que el GSH, una propiedad que radica en parte en el menor valor de *pKa* del ditiol (Moutiez y col., 1994). Por otra parte, la formación del disulfuro intramolecular que ocurre en el ditiol al transferir los equivalentes de reducción está cinéticamente favorecida frente a la formación de un disulfuro intermolecular, en el caso del GSH, en una situación parecida (Irigoin y col., 2008). En la Fig. 1.9, se esquematizan las reacciones vinculadas al metabolismo redox dependiente de tripanotión, descriptas hasta el momento.

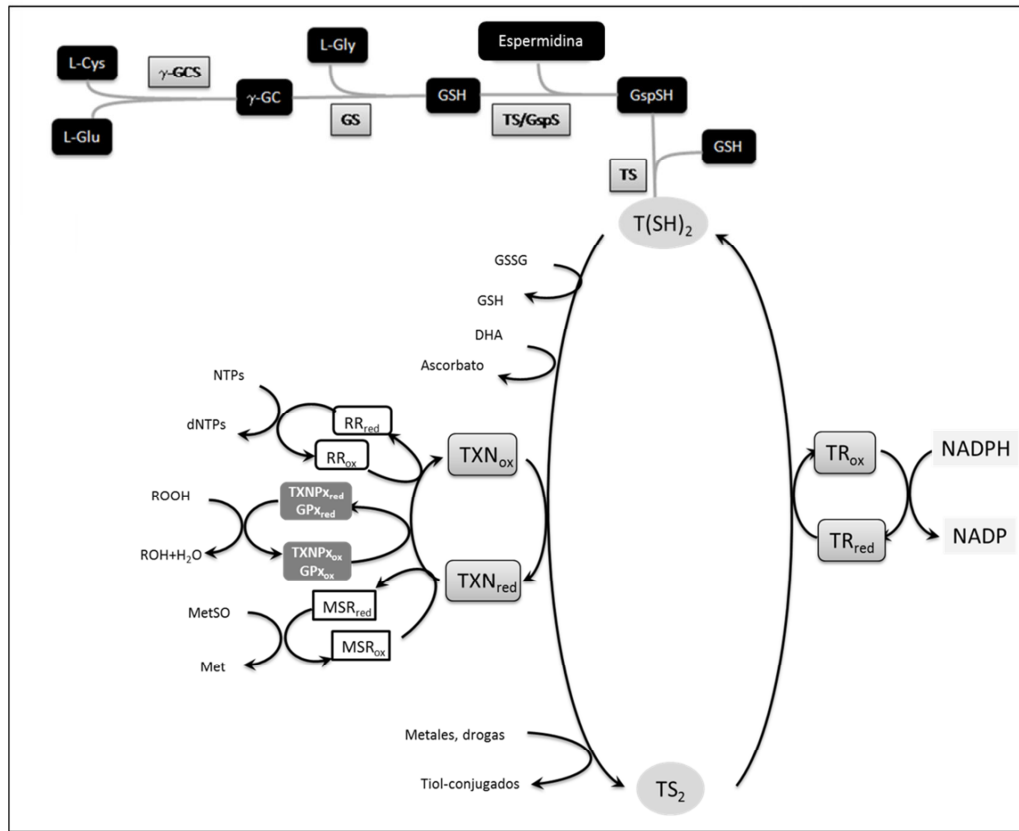


Fig. 1.9: Reacciones destacadas en relación al metabolismo redox dependiente de tripanotión en *T. cruzi*. L-cys: L-cisteína; L-glu: L-glutamato; L-gly: L-glicina; γ -GCS: gama-glutamilcisteína sintetasa; γ -GC: gama-glutamilcisteína; GS: glutatión sintetasa; GSH glutatión; TS: tripanotión sintetasa; GspS glutatiónil espermidina sintetasa; GspSH: glutatiónil espermidina (forma reducida); T(SH)₂ tripanotión (forma reducida); TS₂ tripanotión (forma oxidada); TR: tripanotión reductasa; GSSG: glutatión (forma oxidada); DHA dehidroascorbato; TXN: triparredoxina; RR: ribonucleótido reductasa; NTPs: nucleótidos trifosfato; dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato; TXNPx: triparredoxina peroxidasa; GPx: glutatión peroxidasa; ROOH peróxidos; MSR: metionina sulfóxido reductasa; Met: metionina; MetSO: metionina sulfóxido.

1.2.3 Vía de síntesis y reducción de tripanotión

En la parte superior de la Fig. 1.9, se pueden identificar las reacciones relacionadas con la síntesis de GSH y tripanotión en *T. cruzi*. La síntesis de tripanotión implica a la vez a las vías de síntesis de sus precursores GSH y espermidina (Sp). La vía biosintética de GSH a partir de sus aminoácidos precursores (L-glutamato, L-cisteína y L-glicina), no ha sido estudiada en profundidad en *T. cruzi*, a diferencia de *T. brucei*, en el que se ha probado que comprende las mismas reacciones que las descritas en el caso de

mamíferos (Arias y col., 2013a). La primera enzima en la vía es la γ -glutamilcisteína sintetasa, que cataliza la reacción de ligación de L-glutamato con L-cisteína. También se ha reportado la utilización de butionina sulfoximida en ratones, donde los autores proponen la acción de este compuesto como inhibidor de la γ -glutamilcisteína sintetasa en el parásito (Faundez y col., 2005). En el segundo paso, la reacción es catalizada por la GSH sintetasa, para producir GSH. Respecto a la regeneración cíclica del GSH a su forma reducida, en *T. cruzi* ha sido reportado que la reducción espontánea por T(SH)₂ es una de las vías posibles para mantener los niveles de GSH en su estado reducido (Irigoin y col., 2008). La procedencia de la Sp necesaria para la síntesis de T(SH)₂, es materia de controversias aún. Existen evidencias que sugieren que *T. cruzi* es auxótrofo para Sp, aunque esto fue experimentado solo con el estadio epimastigote, se postula que la incapacidad de la síntesis estaría a nivel de la carencia de una ornitina decarboxilasa, necesaria para la síntesis de poliaminas a partir de arginina (Heby y col., 2007). De modo que el suministro de espermidina (así como también otras poliaminas) depende del transporte desde el medio extracelular (Carrillo y col., 2006).

En *T. cruzi* (como en otros tripanosomátidos), la síntesis de T(SH)₂ ocurre por la unión secuencial y covalente de dos moléculas de GSH a los grupos NH₂ de una molécula de Sp, y se consumen dos moléculas de ATP en este proceso. En la primera etapa el producto formado es la Gsp (glutationileespermidina), la segunda etapa rinde como producto T(SH)₂ (Fairlamb y col., 1985). Las evidencias encontradas hasta el momento indican que en *T. cruzi* las reacciones en ambas etapas estarían catalizadas por una única enzima, presente también en otros tripanosomátidos, la TS (tripanotión sintetasa) (Oza y col., 2002b; Comini y col., 2003; Comini y col., 2005; Oza y col., 2005). Esto ha sido demostrado por identificación del producto de la reacción catalizada por esta enzima a partir de GSH y Sp (Oza y col., 2002b). En el caso de *Crithidia fasciculata*, un tripanosomátido patógeno de insectos, existe además una GspS (glutationilespemidina sintetasa), que puede catalizar la primera reacción de unión del GSH a la Sp, para generar Gsp (Comini y col., 2005). Si bien la TS de *C. fasciculata* es capaz de catalizar ambas reacciones, el *Km* de la GspS para la espermidina es aproximadamente 15 veces mayor, y por ese motivo ésta ha sido propuesta como la responsable de catalizar el primer paso de la biosíntesis de T(SH)₂ en *C. fasciculata* (Oza y col., 2002a; Comini y col., 2005). En *T. cruzi* existe un gen que codifica para una *TcrGspS* (El-Sayed y col., 2005b), así como también en *Leishmania infantum* (Sousa y col., 2014), mientras que en

T. brucei no hay evidencia de este gen y en *Leishmania major* ha sido reportado la presencia de un pseudogen (Krauth-Siegel y Comini, 2008). Tanto la expresión génica, como esencialidad del gen que codifica para la GspS en *L. infantum* fueron estudiadas en una publicación reciente (Sousa y col., 2014). Por otra parte, en *T. cruzi* no ha sido demostrada la expresión del gen que codificaría para esta *TcrGspS*, ni tampoco se ha reportado su expresión recombinante y caracterización.

La reducción del TS₂ (la forma oxidada del tripanotión), es llevada a cabo en los tripanosomátidos en general, por una enzima llamada TR (tripanotión reductasa) que conecta el metabolismo redox con el NADPH (Ariyanayagam y col., 2003). TR comparte muchas características con la GR (Glutación reductasa) de mamíferos (Ariyanayagam y col., 2003), una enzima que no está presente en tripanosomátidos. Se trata de una flavina adenina dinucleótido (FAD) oxidorreductasa, cuyo rol esencial en la viabilidad de los tripanosomátidos ha conducido la hipótesis de esta enzima como blanco interesante para el diseño racional de drogas (Jockers-Scherubl y col., 1989; Hunter y col., 1992).

1.2.4 Proteínas efectoras en el metabolismo antioxidante en *T. cruzi*

Triparrredoxinas. En la mayoría de los organismos tanto eucariotas como procariotas, los sistemas GSH/GR y Trx/TxnR son los encargados de transferir electrones a las diferentes peroxirredoxinas, así como también de transferir equivalentes de reducción a la mayoría de las reacciones del metabolismo redox (Holmgren, 1989). En tripanosomátidos, no existen al momento evidencias de la existencia de una GR o de una TrxR (Krauth-Siegel y Comini, 2008). Las tiorredoxinas y las triparrredoxinas (TXNs) de tripanosomátidos comparten solo un pequeño porcentaje de identidad de secuencia, pero comparten varias propiedades bioquímicas y funcionales. También con algunas glutarrredoxinas hay algunas propiedades en común. Las TXNs son disulfuro oxidorreductasas pertenecientes a la superfamilia de las tiorredoxinas, aunque representan un grupo diferente dentro de las oxidorreductasas que poseen los residuos WCPPC en su sitio activo. En los tripanosomátidos, las TXNs son mantenidas en estado reducido a expensas de T(SH)₂ (Lopez y col., 2000; Arias y col., 2013b). Estas TXNs pueden transferir equivalentes de reducción a diferentes ramas de la compleja red del metabolismo redox en tripanosomátidos (Fig. 1.9), por ejemplo hacia las diferentes peroxirredoxinas (Gommel y col., 1997; Ludemann y col., 1998; Guerrero y col., 1999;

Flohe y col., 2002; Reckenfelderbaumer y Krauth-Siegel, 2002), así como a la glutatión peroxidasa tipo I (Wilkinson y col., 2002a), es decir hacia proteínas efectoras cuyas funciones se comenta más adelante. También transfieren electrones a la ribonucleótido reductasa (Dormeyer y col., 2001), para la reducción de los ribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN, lo que relaciona directamente a esta TXN con la proliferación de los parásitos. En *T. cruzi*, dos TXNs han sido identificadas y caracterizadas (Wilkinson y col., 2002a; Arias y col., 2013b).

Peroxirredoxinas. *T. cruzi* posee dos peroxirredoxinas de dos cisteínas típicas, denominadas triparredoxinas peroxidasa (TXNPxs) (Wilkinson y col., 2000b), un rasgo común a otros tripanosomátidos. Son capaces de descomponer, peroxinitritos y en menor medida hidroperóxidos orgánicos. Ambas son isoformas, una de ellas se encuentra localizada en el citoplasma (cTXNPx) y la otra en la mitocondria (mTXNPx) (Wilkinson y col., 2000b). La regeneración de la forma reducida de estas enzimas está a cargo de la TXN (Fig. 1.9). Estas peroxirredoxinas serían importantes en la defensa antioxidantes frente a ROS y RNS generados tanto dentro del parásitos como por el hospedador afectado (Piacenza y col., 2008). Se ha estudiado en *T. cruzi* pertenecientes a diferentes cepas, que estarían relacionadas a la virulencia en estos parásitos (Piñeyro y col., 2008).

Ascorbato peroxidasa. Esta es una hemoperoxidasa capaz de descomponer H_2O_2 , e incapaz de detoxificar peróxidos orgánicos (Wilkinson y col., 2002b), mientras que su capacidad de catalizar la reducción de peroxinitritos es materia a ser investigada (Trujillo y col., 2013). Se ha demostrado su localización en el retículo endoplasmático del parásito (Wilkinson y col., 2002b). Los equivalentes de reducción necesarios para regenerar la enzima reducida son obtenidos a través del ascorbato, que el parásito también es capaz de sintetizar, según ha sido demostrado. El ascorbato generado podría ser reducido por $T(SH)_2$ (Krauth-Siegel y Ludemann, 1996), pero también por otras vías como la catalizada por la oxidorreductasa Tc52 (Moutiez y col., 1997).

Peroxidasas dependientes de glutatión. *T. cruzi* posee dos tipos de glutatión peroxidasa (GPx), las que presentan algunas similitudes con las de mamíferos (Wilkinson y Kelly, 2003). La diferencia primordial radica en que las GPxs de tripanosomátidos carecen de la selenocisteína característica de la enzima de mamíferos (Wilkinson y col., 2000a). En *T. cruzi* dos de ellas son de tipo I (GPxI), localizadas en

el citosol y también en glicosomas (Wilkinson y col., 2002a). Ambas descomponen peróxidos orgánicos, y no H_2O_2 , por lo que se les ha atribuido principalmente funciones en la reducción de los peróxidos derivados de fosfolípidos y ácidos grasos (Wilkinson y col., 2002a). La otra es de tipo II y se encuentra localizada en el retículo endoplasmático del parásito (Wilkinson y col., 2002c). Ha sido reportado que la GPxII es reducida por GSH, mientras que las GPxI requieren la actividad de la TXN (Fig. 1.9) para la transferencia de equivalentes de reducción (Wilkinson y Kelly, 2003).

Superóxido dismutasas. Existen en este parásito cuatro superóxido dismutasas, las cuales han sido clonadas, e investigadas con énfasis en su localización subcelular en el parásito (Mateo y col., 2008) y algunas de ellas fueron mejor estudiadas desde una perspectiva bioquímica y funcional (Ismail y col., 1997). Se ha establecido que las SOD en tripanosomátidos contienen hierro (FeSOD), a diferencia de las de mamíferos que contienen cobre, zinc o manganeso (Dufernez y col., 2006). Estas SOD son capaces de detoxificar superóxido, en el citosol, glicosomas y mitocondria, acorde a la localización de cada cual (Dufernez y col., 2006). En el caso de la isoforma localizada en la mitocondria, esta podría estar además implicada en la detoxificación de especies reactivas del nitrógeno, aunque esta capacidad está siendo aún evaluada (Trujillo y col., 2013). Además, en *T. cruzi* se ha demostrado que la FeSOD mitocondrial tendría un efecto protector frente a la muerte celular programada, una interesante relación entre el metabolismo redox en el parásito y este mecanismo de muerte autodirigido (Piacenza y col., 2007).

Metionina sulfóxido reductasa. El parásito contiene varios genes relacionados con la reducción de diferentes formas de metionina sulfóxido (El-Sayed y col., 2005a). Se ha probado que la reducción de L-metionina (S) sulfóxido es llevada a cabo por una MSR tipo A (Arias y col., 2011) y que la recuperación de esta enzima nuevamente a su estado reducido es dependiente del sistema $T(SH)_2$ /TXNs (Arias y col., 2011; Arias y col., 2013b) (Fig. 1.9).

1.2.5 Vías dependientes de GSH en *T. cruzi*.

Si bien en los tripanosomátidos la red de detoxificación dependiente de $T(SH)_2$ es eficiente, cumple un rol preponderante y su inhibición a la altura de algunas de las vías involucradas ha demostrado su esencialidad, también es interesante tener presente que

estos parásitos tienen cierta cantidad de GSH no conjugado, como se detalla en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Contenido de tioles (mayoritarios) de bajo peso molecular en los diferentes estadios de *T. cruzi*. Adaptado de (Ariyanayagam y Fairlamb, 2001), * datos reportados en (Ariyanayagam y col., 2003).

<i>Estadio</i>	<i>Contenido de tioles (nmol/10⁸ cel)</i>		
	<i>GSH</i>	<i>GspSH</i>	<i>T(SH)₂</i>
Epimastigote	2.1 (± 0.2)	0.8 (± 0.1)	6.4 (± 0.2)
Tripomastigotes (derivados de cultivos celulares)	0.41 (± 0.3)	0.17 (± 0.1)	0.95(± 0.34)
Amastigote * (células en cultivo)	0.42 (± 0.04)	0.07 (± 0.01)	0.12 (± 0.04)

Las funciones que el GSH libre podría llegar a cumplir, además de la síntesis de T(SH)₂ han sido escasamente abordadas, aunque existen estudios aislados que aportan datos al respecto. Como ya se comentó anteriormente, las GPxs en *T. cruzi* se caracterizan por no ser capaces de recibir equivalentes de reducción directamente del T(SH)₂. En el caso de la GPxI, se ha encontrado que tiene más afinidad por TXNI que por GSH (Wilkinson y col., 2002a). De hecho, en comparación con las GPxs de otros organismos, las de los tripanosomátidos parecen carecer de los residuos del motivo de unión a GSH. Este puede ser el motivo que justifique la baja afinidad encontrada en las GPxs de *T. cruzi*. Por otra parte, también ha sido reportado que el GSH sería el dador de electrones principal para estas GPxs en ciertas localizaciones particulares, por ejemplo en glicosomas (GPxI) y retículo endoplasmático (GPxII) (Wilkinson y Kelly, 2003). Vinculada al metabolismo del GSH, una oxidoreductasa con homología a glutatión-S-transferasa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>), denominada Tc52, ha sido caracterizada en *T. cruzi* (Moutiez y col., 1995), aunque curiosamente esta proteína no es generalmente comentada en los trabajos de revisión sobre el metabolismo redox en *T. cruzi*. Moutiez y col. (1997) purificaron y secuenciaron esta proteína a partir del parásito, el estudio de caracterización cinética indicó en primera instancia que esta es

una enzima capaz de catalizar la reducción de GSSG a partir de T(SH)₂ (Moutiez y col., 1997). Posteriormente se verificó que esta tioltransferasa también era capaz de reducir disulfuros en proteínas, así como también reducir dehidroascorbato (Moutiez y col., 1997). Adicionalmente, se demostró que Tc52 no fue capaz de reducir disulfuros mixtos a expensas de T(SH)₂, aunque si pudo constatarse la actividad tiol transferasa a través del ensayo de reducción del disulfuro formado entre el HED (hidroxietildisulfuro) y el GSH (Moutiez y col., 1997).

La presencia de una red de compuestos y proteínas antioxidantes en *T. cruzi* provee al parásito de la capacidad de contrarrestar los efectos del entorno oxidante generado tanto por los mecanismos de defensa del sistema inmune del hospedador, como también por los sub-productos de la respiración aeróbica propia y de la célula hospedadora infectada. ROS y RNS provenientes de diferentes fuentes son capaces de promover la oxidación de tioles en el parásito. Estudios puntuales sobre la susceptibilidad de tioles de *T. cruzi* frente al estrés generado con peroxinitrito (una especie reactiva preponderantemente generada en macrófagos infectados), indica que luego del desafío oxidativo el tripanotión se encuentra en la forma oxidada (TS₂) dentro del parásito, mientras que el glutatión se encuentra principalmente en la forma de disulfuro mixto con proteínas (Thomson y col., 2003). Este tipo de observaciones sientan precedentes para fundar hipótesis sobre cuáles serían las funciones de los disulfuros mixtos en proteínas del parásito, y a través de qué mecanismos se recuperan las especies reducidas en *T. cruzi*, algunas cuestiones sobre las cuáles se han abordado los objetivos de esta tesis.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo fue la identificación y caracterización de proteínas involucradas en vías metabólicas dependientes del glutatión, en el marco del metabolismo redox en *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- ☞ Identificar y clonar, en *T. cruzi*, el gen que codifica para una glutatiónil espermidina sintetasa y caracterizar funcionalmente la proteína redox. Analizar sus posibles funciones en el metabolismo redox de *T. cruzi* (Capítulo 1).
- ☞ Identificar y clonar el gen que codifica para una glutarredoxina monotiólica en *T. cruzi*, y caracterizar funcionalmente la proteína redox recombinante (Capítulo 2).
- ☞ Identificar y clonar, en *T. cruzi*, el gen que codifica para una glutarredoxina ditiólica y caracterizar funcionalmente a la glutarredoxina ditiólica recombinante. Estudiar las reacciones en las que esta glutarredoxina, en *T. cruzi*, está involucrada (Capítulo 3).

3 Materiales y Métodos

Los reactivos químicos empleados para los procedimientos de biología molecular, purificación de proteínas, ensayos enzimáticos, etc., fueron suministrados por los representantes en Argentina de las firmas Invitrogen, Promega, Fermentas, GE-healthcare, Sigma-Aldrich, Merck. Los insumos utilizados para la preparación de medios de cultivo fueron adquiridos de la firma Britania (Argentina) o a través de los representantes en Argentina de las firmas Gibco y Becton, Dickinson y Compañía (BD).

3.1 Cepas y medios de cultivo

En el desarrollo de este trabajo se emplearon las siguientes cepas.

❖ Cepas bacterianas:

- *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen). Genotipo: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -
- *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene). Genotipo: endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ (lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)
- *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen). Genotipo: F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

En los cultivos de propagación de estas cepas bacterianas con fines de transformación o purificación de ADN plasmídico, se empleó el medio LB. En los cultivos con fines de producción de proteínas recombinantes se empleó el medio TB.

❖ Cepas de Levaduras:

Se emplearon las cepas de *S. cerevisiae* CML235, MML15, MML17, MML19, MML39 y MML41, cuya obtención se describe detalladamente en (Rodríguez-Manzaneque y col., 1999), y fueron gentilmente cedidas por el Dr. Enric Herrero (Universidad de Leida, España).

Los cultivos regulares de estas cepas se realizaron en medio YPD (igual que arriba). Luego de las transformaciones se empleó el medio definido SD-glucosa. En los ensayos

de fermentación de fuentes de carbono se emplearon alternativamente los medio SD-glucosa o SD-glicerol.

❖ Cepas de parásitos

Se utilizaron las cepas de *T. cruzi* CLBrenner y Dm28c, tanto para la obtención de extractos proteicos como para los ensayos de transfección. Las líneas fueron mantenidas por sub-cultivos en medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) cuya composición se detalla más adelante. Suspensiones de estos parásitos en suero fetal bovino inactivado, adicionados con DMSO 10% (v/v), fueron crio-preservados a -80°C como stocks correspondientes tanto a las cepas CLBrenner, Dm28c y líneas transformadas derivadas de estas.

❖ Líneas celulares de mamíferos.

- Línea celular VERO (Yasumura y Kawakita, 1963): Establecida a partir de riñón de mono verde africano, presentan un fenotipo epitelial. Son habitualmente empleadas como soporte para la obtención de las formas tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*.

- Línea celular HeLa (Scherer y col., 1953): se trata de un línea de origen epitelial procedente de adenocarcinoma de cérvix humano, presentan un fenotipo epitelial y son aptas para la infección con *T. cruzi* (Dvorak y Howe, 1976).

Para los cultivos de estas líneas de mamíferos se empleó el medio DMEM (Gibco) preparado según las instrucciones del proveedor, adicionado con Penicilina (Gibco) 100 U·mL⁻¹, streptomycin (Gibco) 100 µg·mL⁻¹ y suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor.

La composición de los medios de cultivos mencionados se detalla a continuación.

❖ LB (*Lysogenic Broth*)

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g·L⁻¹)</i>
Peptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
pH=7	

❖ LB-glucosa

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g·L⁻¹)</i>
Peptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Glucosa	20
pH=7	

❖ TB (*Terrific Broth*)

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g·L⁻¹)</i>
Peptona	12
Extracto de levadura	24
KH ₂ PO ₄	2,3
K ₂ HPO ₄	12,5
Glicerol	5
pH=7	

❖ YPD (*Yeast Peptone Dextrose*)

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g·L⁻¹)</i>
Peptona	20
Extracto de levadura	10
Glucosa	20

❖ Medio definido SD-glucosa

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g·L⁻¹)</i>
Yeast nitrogen base (BD)	17
(NH ₄) ₂ SO ₄	50
Glucosa	20
Uracilo	0,02
Histidina	0,02

❖ Medio definido SD-glicerol

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g·L⁻¹)</i>
Yeast nitrogen base (BD)	17
(NH ₄) ₂ SO ₄	50
Glicerol	30
Uracilo	0,02
Histidina	0,02

❖ Medio LIT

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g·L⁻¹)</i>
Infusión de hígado (Sigma)	5
Triptosa	5
KCl	0,4
Na ₂ HPO ₄	8
NaCl	4
Glucosa	2
Hemina	2·10 ⁻⁶
pH=7,4	

Para el cultivo de *T. cruzi* el medio LIT se suplementó con Penicilina (Gibco) 100 U·mL⁻¹, streptomycin (Gibco) 100 µg·mL⁻¹, y 10% de suero fetal bovino (Natocor) previamente inactivado por calor (a 60°C durante 30 min).

3.2 Vectores plasmídicos

Los siguientes plásmidos se utilizaron con el fin de crear construcciones para transformar diversos organismos empleados en el desarrollo de esta tesis.

- pGEM-TEasy (Promega): vector de clonado para fragmentos de PCR, de alto número de copia. Posee las secuencias promotoras T7 y SP6 a los lados del sitio de múltiple clonado, de utilidad para el mantenimiento de genes que se secuenciarán. La

inactivación insercional del α -péptido permite reconocer los clones recombinantes por el color de la colonia (α -complementación).

- pRSET-A (Invitrogen): vector de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, inducible por IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), bajo el control del promotor T7. El producto se puede expresar como fusión a un *tag* de seis histidinas.
- pET-28c (Novagen): vector de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, inducible por IPTG, bajo el control del promotor T7. El producto se puede expresar como fusión a un *tag* de seis histidinas.
- pMAL-c2X (New England Biolabs): vector de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, inducible por IPTG, bajo el control del promotor Lac. El gen de interés es clonado corriente abajo del gen que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP), y entre ambos productos proteicos se sitúa un sitio de clivaje para Factor Xa. Previo a su uso, este vector ha sido modificado en el laboratorio reemplazando el sitio de corte con Factor Xa por un sitio de clivaje para TEV proteasa.
- pET-32a (Novagen): vector diseñado para obtener altos niveles de expresión recombinante de la proteína codificada en el gen clonado, fusionada a la proteína Trx, además de un *tag* de seis histidinas. Entre ambas proteínas (la de interés y la Trx) se sitúa un sitio para el clivaje con enteroquinasa. En el laboratorio se modificó la secuencia original del vector pET-32 para obtener un sitio de clivaje para TEV proteasa, en lugar del original para enteroquinasa.
- pTEX (Kelly y col., 1992): vector *shuttle* para la expresión génica en *T. cruzi* y en *Leishmania*. Este vector es mantenido como episoma circular en los parásitos transformados, contiene las secuencias intergénicas correspondientes a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa glicosomal, a los lados del sitio de clonado y un marcador de resistencia para neomicina, que también confiere resistencia a geneticina (G428), siendo este último el que generalmente se emplea para la selección de los parásitos transformados. Si bien este es un vector para la expresión no inducible, es posible incrementar ligeramente los niveles de expresión cultivando los parásitos en cantidades crecientes de geneticina, lo que favorece la selección de aquellos parásitos conteniendo mayor número de copias del vector (Taylor y col., 2011).
- p425-GPD (Mumberg y col., 1995): vector para expresión de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*, bajo el control del promotor constitutivo de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (promotor GDP), posee el gen marcador de

selección LEU2, para seleccionar las levaduras transformadas por su capacidad de proliferar en medios carentes de leucina.

3.3 Extracción de ADN genómico de *T. cruzi*

El ADN genómico se obtuvo a partir de cultivos en fase exponencial de *T. cruzi* CL Brener ($1 \cdot 10^8$ parásitos en total), siguiendo la metodología descrita por (Sambrook, 2001).

3.4 Extracción de ADN plasmídico

Para extraer ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos se empleó el *kit* comercial *Wizard[®] plus SV minipreps DNA purification system* (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.5 Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación de los genes de interés se realizó empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las reacciones se realizaron en 50 μ L de volumen, conteniendo: *buffer* de amplificación (Fermentas) 1X, $MgCl_2$ 2,5 mM, desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 1mM de cada cual, oligonucleótidos (cuyas secuencias se detallan más adelante) 1 μ M de cada uno, Taq DNA polimerasa (Fermentas) 2U y ADN templado (plasmídico o genómico según corresponda) en cantidades variables entre 10 y 50 ng. Las reacciones se realizaron en un termociclador (Boeco, Alemania). Las condiciones generales de las reacciones fueron las indicadas a continuación:

- 1- 95° durante 5 min.
- 2- 95° durante 1 min.
- 3- *T_m* durante 1 min.
- 4- 72° durante 1-2,5 min. dependiendo de la longitud del gen aplicado.
- 5- 72° durante 10 min.

Los pasos 2 a 4 se reiteraron durante 30 ciclos. *T_m* fue seleccionada acorde a los oligonucleótidos empleados.

3.6 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados específicamente, considerando las secuencias de los genes de *T. cruzi* CLBrener, obtenidas a partir de la base de datos *Trityps* (<http://www.tritypdb.org/tritypdb/>). Las secuencias de oligonucleótidos diseñados fueron remitidas para su síntesis en la empresa Sigma. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican a continuación.

- *TcGrxFow*: 5' GGATCCATGAACAAAGCTTTAGATCC 3'
- *TcGrxRev*: 5' GAATTCTCACCGCCTCTCCAACGT 3'
- *TcGrxC31SFow*: 5' CCGCTACATATTCTGAATATTGTACAAAGCTG 3'
- *TcGrxC31SRev*: 5' CAGCTTTGTACAATATTCAGAATATGTAGCGG 3'
- *TcGrxC34SFow*: 5' TGTGAATATTCTACAAAGCTG 3'
- *TcGrxC34SRev*: 5' CAGCTTTGTAGAATATTCACA3'
- *TcPICOT100Δ34NFow*: 5' CATATGCGACGTGTCTTTCTTT 3'
- *TcPICOT100cFow*: 5' GGATCCATGGTATTCTTTTTTCCATC 3'
- *TcPICOT100/65Rev*: 5' AAGCTTCTAATGCTTCAATATAG 3'
- *TcPICOT65Δ34NFow*: 5' CATATGCGAAGTGTCTTTCTTT 3'
- *TcGspSFow*: 5' GGATCCCATATGGAAAACACTGACAAACAAC 3'
- *TcGspSRev*: 5' AAGCTTGATATCTCACACTTCTCCAGATGTCG 3'

3.7 Electroforesis en gel de agarosa

Para la separación electroforética de moléculas de ADN se emplearon geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE (Tris 40mM, ácido acético 40mM, EDTA 1mM pH 8), con el agregado del colorante *Gel Green*[®] (Biotium) según la dilución sugerida por el fabricante. Previo a la siembra en los pocillos del gel, las muestras se mezclaron con una pequeña cantidad de solución de siembra (azul de bromofenol 0,25% (p/v) y glicerol 20%). El desarrollo de la corrida electroforética se llevó a cabo en el sistema Mini-Sub[®] Cell GT (Bio-Rad). Los geles se examinaron en un transiluminador de luz azul (Dark Reader[®], Clare Chemical Research) para visualizar las bandas.

3.8 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Las bandas de interés fueron escindidas a partir de los geles de agarosa, y procesados con un *kit* comercial *Wizard[®] plus SV PCR preps DNA purification system* (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.9 Digestión de moléculas de ADN

Distintas digestiones de moléculas de ADN se realizaron empleando enzimas provistas por las firmas Promega o Fermentas, siguiendo las instrucciones del proveedor correspondiente. Como condición estándar para las reacciones de digestión se emplearon 37°C durante 3 hs.

3.10 Ligación de moléculas de ADN

Para las reacciones de ligación de moléculas de ADN se empleó una enzima T4 ADN ligasa (Fermentas), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las reacciones se incubaron *overnight* a 4°C.

3.11 Mutagénesis sitio dirigida

Para la generación de versiones mutantes de un gen de interés se empleó el protocolo correspondiente al *kit* comercial *QuickChange[®] Site-directed mutagenesis* (Stratagene). Brevemente, se emplearon los oligonucleótidos indicados anteriormente que contienen la base nitrogenada a ser mutada en la región central de su secuencia. La mezcla de reacción contenía como ADN molde el plásmido conteniendo el gen a mutar (10 ng); los oligonucleótidos (100 ng); dNTPs 0,2 mM (de cada uno); *Pfu* DNA polimerasa (Fermentas) 2,5 U; *buffer* de reacción (provisto por el fabricante de la polimerasa). El producto de la reacción de PCR fue tratado durante 3 h a 37°C con 10 U de la enzima *DpnI* (para degradar el ADN parental). Se transformaron células de *E. coli* con el plásmido conteniendo el producto obtenido, se aislaron clones y se secuenciaron los plásmidos extraídos a partir de éstos para confirmar el suceso del evento de mutagénesis.

3.12 Transformación de bacterias por el método del shock térmico

Para preparar las bacterias competentes se utilizó un cultivo de *E. coli* en fase exponencial ($DO_{600nm}=0,6$). Por cada evento de transformación se tomó una alícuota de 1 mL de este cultivo en tubos estériles. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. El *pellet* celular fue lavado con 0,5 volúmenes de ST1 (MOPS 100mM, KCl 10 mM, pH 7), y centrifugado nuevamente. El *pellet* celular obtenido fue suspendido en 0,5 volúmenes ST2 (MOPS 100mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 50mM, pH 6,5), y se incubó esta suspensión en hielo durante 15 min. Luego, la suspensión fue nuevamente centrifugada y el *pellet* se suspendió en 0,1 vol de ST2. A esta suspensión se agregó 2 μ L de la solución conteniendo el plásmido y se incubó durante 1 h en hielo. Posteriormente se realizó el *shock* térmico, incubando el tubo conteniendo las bacterias mezcladas con la solución del plásmido a 42°C durante 40 s, e inmediatamente en hielo durante 2 min. Se agregó a la suspensión 800 μ L de LB-glucosa (2% p/v) y se incubó a 37°C durante 1 h. Transcurrido ese período, la suspensión fue centrifugada nuevamente a 4600 rpm durante 5 min, posteriormente suspendiendo el *pellet* en 100 L de la fracción sobrenadante. Esta suspensión se sembró en placas conteniendo LB agarizado, adicionado del antibiótico que correspondiese al gen de resistencia presente en el plásmido (ampicilina 100 μ g·mL⁻¹, kanamicina 50 μ g·mL⁻¹). Las placas sembradas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias de las bacterias transformadas.

3.13 Transformación de levaduras

Se empleó un protocolo adaptado a partir del método químico descrito por Gietz y col. (Gietz y Schiestl, 2007). Brevemente, las levaduras competentes fueron obtenidas a partir de un cultivo en fase exponencial de las mismas en 50 mL de medio YPD ($DO_{600nm} = 1$). El cultivo obtenido fue centrifugado a 2000 rpm durante 5 min. El *pellet* celular fue suspendido en 10 mL de agua destilada estéril y centrifugado nuevamente. El *pellet* resultante fue suavemente suspendido en 5 mL de solución LiOAc/TE (LiOAc 100 mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 100 mM pH 7). Esta suspensión fue centrifugada a 2000 rpm durante 5 min. El *pellet* fue suspendido en 0,25 mL de la solución LiOAc/TE, homogeneizando suavemente. Por cada evento de transformación se tomó una alícuota de 50 μ L de esa suspensión, y se agregó a cada alícuota el plásmido correspondiente.

Entre estos eventos de transformación se incluyó la transformación con la construcción de interés (vector conteniendo el gen a estudiar), un experimento control incluyendo el vector sin inserto y un experimento sin vector, como control negativo. Luego de homogeneizar cada suspensión (separadamente) se agregaron 0,3 mL de PEG/LiOAc/TE (PEG 40% p/v, LiOAc 100 mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 100 mM pH 7). Se incubaron los tubos durante 30 min a 30°C. Luego se realizó una incubación a 42°C durante 15 min. Finalmente, de cada suspensión se sembraron aproximadamente 200 μ L en placas conteniendo medio SD glucosa (sin leucina). Las placas inoculadas fueron incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias de levaduras correspondientes al control positivo (transformadas con el vector vacío). La expresión del producto de interés se estudió mediante ensayos de western blot.

3.14 Transformación de parásitos

Para transformar epimastigotes de *T. cruzi* se empleó una adaptación del método descrito por Kelly y col. (Kelly y col., 1992). Brevemente, por cada evento de transformación se tomaron entre 1 a $5 \cdot 10^7$ epimastigotes de *T. cruzi* a partir de un cultivo en fase exponencial y se dispensaron en tubos estériles. Los parásitos se lavaron 3 veces con PBS estéril, frío, centrifugando a 2000 rpm durante 5 min. Se lavaron una vez con HBS (HEPES 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5mM, Glucosa 6mM, pH 7,4) estéril, frío y se centrifugaron nuevamente. El *pellet* fue suspendido en 300 μ L de HBS estéril y se mezcló cada suspensión con el plásmido correspondiente (100 μ g), resuspendido en 50 μ L de agua estéril. Además de la construcción plasmídica de interés, se incluyeron, un control negativo (sin plásmido), un control positivo (pTEX-GFP) y el plásmido solo (pTEX). Las suspensiones mezcladas con el correspondiente ADN se transfirieron a cubetas de electroporación de 2 mm de *gap* (Bio-Rad), pre-enfriadas en hielo, y se incubaron en hielo durante 10 min. Luego se realizaron tres pulsos (450V, 500 μ F) en un dispositivo electroporador *Celljet[®] Duo* (Hybaid). Las cubetas se mantuvieron 10 min a temperatura ambiente. El contenido de cada cubeta fue transferido a frascos de cultivo de 25 cm² de superficie *CellStar[®]* (Greiner Bio One), conteniendo 2 mL de medio LIT con 10% SFB. Transcurridas 24 hs, se inició el proceso de selección con 100 μ g·mL⁻¹ de G418 (geneticina). La concentración del antibiótico se aumentó gradualmente a partir de las 96 hs, con recambios de pequeñas proporciones del cultivo por medio fresco, hasta alcanzar una concentración de 500 μ g·mL⁻¹ de G418

hacia el final del proceso de selección. La expresión del producto de interés se estudió mediante ensayos de western blot.

3.15 Cultivos de *E. coli* para la expresión de proteínas recombinantes

Se realizaron cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido correspondiente en medio TB suplementado con ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) o kanamicina ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) según corresponda. Estos cultivos se iniciaron con una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,05 a partir de un cultivo inóculo crecido en el mismo medio durante 16 hs, y se incubaron a 37°C hasta que alcanzaron una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,8. Se indujo la producción de la proteína de interés por agregado de una solución estéril de IPTG a una concentración final de 0,1-1 mM, y se incubó a 25°C durante 5-16 hs, habiéndose optimizado previamente, en pequeña escala, la concentración del inductor y el tiempo para cada proteína. Finalizada la etapa de inducción la biomasa en los cultivos fueron cosechadas por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min.

3.16 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La separación electroforética de proteínas en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) se realizó acorde a la técnica descrita por Laemmli (1970) (Laemmli, 1970), empleando geles de poliacrilamida de concentraciones entre 9-15% y un sistema *Mini-Protean II*[®] (Bio-Rad). Las muestras fueron desnaturizadas antes de su siembra mediante el agregado de SDS 0,1% (p/v), 2-mercapto etanol 100 mM en Tris-HCl 50mM pH 6.8 y su posterior calentamiento a 100°C durante 5 min. En caso de tratarse de una electroforesis en condiciones no desnaturizantes, se omitió el agregado del reductor.

Una vez finalizadas las corridas electroforéticas los geles fueron teñidos con una solución de Coomassie Blue R-250 al 0,2% disuelto en 30% de metanol. Posteriormente los geles fueron incubados en una solución de metanol 30% y ácido acético 10%, en sucesivos cambios hasta lograr la decoloración conveniente del fondo y visualización de las bandas correspondientes a las proteínas.

En ciertos casos particulares se realizó la coloración argéntica del gel. Para esto, el gel obtenido luego de la corrida electroforética se incubó durante 1 h en agitación lenta en

solución de fijación (ácido acético 12% v/v; etanol 50% v/v; 0,0185 % p/v). A continuación se realizaron 3 lavados con solución de lavado (etanol 50% v/v) de 5, 10 y 15 min de duración. Posteriormente se realizó un enjuague con solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, y se lavó brevemente con agua de calidad mili Q en tres cambios sucesivos. El gel se incubó 20 min con solución de plata (AgNO_3 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; Formaldehído 0,027% p/v). Se realizaron a continuación tres lavados con agua de calidad mili Q. Se incubó con una solución de revelado (Na_2CO_3 3% p/v; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y formaldehído 0,0185% p/v), hasta visualizar las bandas. Se realizó a continuación una incubación en solución de fijación durante 5 min, y luego con solución de lavado. El gel se conservó en una solución de etanol 25% (v/v) y glicerol 3% (p/v).

3.17 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando soluciones de albúmina sérica bovina como patrones. Las lecturas de las absorbancias a 595 nm se realizaron en un espectrofotómetro (S26 Spectrophotometer, Boeco).

3.18 Ensayos de western blot

Se realizó la electrotransferencia de proteínas previamente resueltas por PAGE-SDS a membranas de nitrocelulosa *Hybond ECL* (GE Healthcare). Para esto, una vez finalizada la electroforesis, se incubó el gel y la membrana de nitrocelulosa en *buffer* de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20% v/v). Se preparó el *cassette* para la transferencia con los demás componentes (pañños y papeles de filtro) previamente saturados en *buffer* de transferencia. La misma se realizó en un equipo *Enduro® Electrophoresis system* (Labnet International Inc.) a 180 mA constantes durante 40- 60 min, en *buffer* de transferencia. Una vez finalizada, la transferencia efectiva se verificó mediante la tinción de las membranas con una solución de Rojo Ponceau 0,25 % (p/v) en ácido acético 1 % (v/v), y desteñidos nuevamente para la etapa de inmunodetección. La membrana conteniendo las proteínas electrotransferidas, fue bloqueada por incubación en una solución de leche descremada en polvo al 5 % (p/v) prepara en PBS (KH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5), durante 1h. Luego se incubó la membrana durante 1 h a temperatura ambiente (o alternativamente *overnight* a 4°C), en agitación, con una solución del anticuerpo

primario (en una dilución acorde al título del mismo en el antisuero) preparada en leche en polvo descremada al 1 % (p/v), en PBS adicionado de *Tween20* al 0,05 % (v/v). Transcurrido ese tiempo de incubación se realizaron varios lavados en PBS-*Tween20* al 0,1 % (v/v). Luego, la membrana fue incubada con una solución del anticuerpo secundario anti- IgG de conejo, preparado en cabra, conjugado con peroxidasa (Pierce). Esta solución fue preparada en leche en polvo descremada al 1 % (p/v), en PBS adicionado de *Tween20* al 0,05 % (v/v), la membrana fue incubada en esta solución por 1 h a temperatura ambiente, en agitación. Transcurrido ese tiempo de incubación se realizaron varios lavados en PBS-*Tween20* al 0,1 % (v/v). El revelado de las membranas se llevó a cabo por el método quimioluminiscente incubando las membrana con el reactivo *SuperSignal[®] West Pico* (PIERCE), seguido de la sensibilización de placas *Medical X-Ray Film[®]* (Kodak) durante un período de tiempo variable, optimizado *in situ*.

3.19 Obtención y Purificación de anticuerpos

Los antisueros conteniendo los anticuerpos primarios contra las proteínas de interés, fueron preparados a pedido, en el Centro de experimentaciones biológicas y bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, acorde con las normas éticas internacionales vigentes para la experimentación con animales.

En caso de resultar necesario, los anticuerpos a partir de los antisueros fueron purificados siguiendo la metodología que se detalla a continuación. La proteína de interés (antígeno) conteniendo un *tag* de histidinas, fue inmovilizada en resina de Ni-agarosa (pre-equilibrada en PBS), y lavada con 20 volúmenes de PBS. Luego se fijó con una solución de formaldehído 1 % (v/v) en PBS, seguido de lavados con 40 volúmenes de PBS. La resina conteniendo la proteína inmovilizada, fue incubada con una solución del antisuero diluido alrededor de unas 100 veces en PBS, durante 1h a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con 20 volúmenes de PBS. Para la elusión del anticuerpo capturado se utilizó una solución de glicina 0,1 M. Los eluatos se neutralizaron inmediatamente con una solución de Tris-HCl 1M pH8. Las soluciones del anticuerpo se conservaron en glicerol 50 % (p/v) a -20°C, hasta el momento de su utilización.

3.20 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC)

Las proteínas conteniendo *tag* de histidinas fueron purificadas por IMAC, utilizando una matriz de Ni²⁺- IMAC *Sepharose*[®] (GE Healthcare). Se empleó un volumen de la resina acorde con la cantidad de proteína en los extractos a procesar, según las instrucciones del fabricante. La biomasa bacteriana fue suspendida en un *buffer* de siembra conteniendo Tris-HCL 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM e Imidazol 10 mM. La disrupción celular fue llevada a cabo en un sonicador *Vibra-Cell*[®] *VCX600* (Sonics & Materials Inc.), durante 20 min a una potencia de 60 %. La suspensión obtenida fue centrifugada durante 30 min a 16000 rpm en una centrífuga de alta velocidad *Sorvall*[®] *RC6+* (Thermo Scientific). El sobrenadante fue sembrado en una columna conteniendo la resina previamente empaquetada, lavada y equilibrada con el *buffer* de siembra. La resina con las proteínas inmovilizadas se lavó con 20 volúmenes de *buffer* de siembra. La elusión se realizó de modo escalonado, empleando *buffers* de elusión conteniendo Tris-HCL 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM y concentraciones variables de imidazol entre 50 y 500 mM. La presencia de la proteína en los eluatos se verificó por análisis en PAGE-SDS. Por diafiltración, las fracciones conteniendo la proteína de interés se acondicionaron en *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 7,5 adicionado de 20 % glicerol, para su conservación a -80°C.

3.21 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a amilosa

Las proteínas conteniendo una fusión a MBP (proteína de unión a maltosa) fueron purificadas por cromatografía de afinidad a amilosa, utilizando una matriz de amilosa (New England Biolabs). Se empleó un volumen de la resina acorde con la cantidad de proteínas a procesar, según las instrucciones del fabricante. La biomasa bacteriana fue suspendida en un *buffer* de siembra conteniendo Tris-HCL 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM. La disrupción celular fue llevada por sonicación, y la fracción soluble separada como se detalló anteriormente. El sobrenadante fue sembrado en una columna conteniendo la resina previamente empaquetada, lavada y equilibrada con el *buffer* de siembra. La resina con las proteínas inmovilizadas se lavó con 20 volúmenes de *buffer* de siembra. Para la elusión se empleó un *buffer* conteniendo Tris-HCL 20 mM, NaCl 200 mM y maltosa 10 mM. La presencia de la proteína en los eluatos se verificó por

análisis en PAGE-SDS. Las fracciones de eluato conteniendo la proteína de interés se acondicionaron del mismo modo descrito para aquella purificada por IMAC, para ser conservadas a -80°C.

3.22 Diafiltración y concentración de proteínas

Luego de su purificación, las proteínas recombinantes fueron diafiltradas (y concentradas) empleando dispositivos *Amicon*[®] (Millipore) de ultrafiltración, con un valor de límite de corte acorde al tamaño molecular de la proteína tratada, según las instrucciones indicadas por el fabricante. Para las etapas de desalado en diversos ensayos, se utilizaron microdispositivos para ultrafiltración *Microcon*[®] (Millipore) siguiendo también las instrucciones indicadas por el fabricante.

3.23 Filtración por geles

La estimación del tamaño molecular de la *TcrGrx* fue llevado a cabo en una columna Superdex 200 (GE-Healthcare) equilibrada con Tris-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1 mM y NaCl 100 mM. La proteína recombinante purificada fue analizada cromatográficamente en simultáneo con estándares (Sigma) de albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica y lisozima.

3.24 Evaluación de productos de reacción por cromatografía en capa delgada (TLC).

El análisis cualitativo de los productos de reacción de la *TcrGspS* se realizó por TLC, acorde a la metodología empleada por Bollinger (Bollinger y col., 1995), que también fue empleada anteriormente para analizar los tioles presentes en extractos de *C. fasciculata* (Steenkamp, 1993). Las reacciones se realizaron empleando *buffer* HEPES 100 mM pH 8 como medio estándar. Las mezclas de reacción contenían GSH 5 mM; Sp 10 mM; ATP 2 mM; MgSO₄ 5 mM; DTT 10 mM y *TcrGspS* (ó *CfaTS* en el caso del ensayo control) 2,8 µM. Se evaluaron diferentes tiempos de incubación para las reacciones entre 5-15 min. La actividad amidasa fue analizada de manera similar, en el medio estándar de reacción, en una mezcla conteniendo Gsp 10 mM y *TcrGspS* (ó *CfaTS* en el caso del control) 2,8 µM. La reacción fue incubada durante 30 min a 30°C. Una vez transcurridos los tiempos de reacción establecidos, las proteínas fueron desnaturalizadas por tratamiento térmico (a 90°C durante 2 min.).

Los productos de la reacción fueron resueltos por TLC, empleando placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck). De cada reacción se sembraron 5 μ L, incluyendo además soluciones de GSH; Sp; Gsp; y TSH₂ (5 mM), tomados como estándares. La cromatografía fue desarrollada en una mezcla butanol: ácido acético: agua (1:1:2). Los *spots* fueron revelados por tinción con ninhidrina 0,1 % (p/v), preparada en acetona conteniendo ácido acético 0,5% (v/v).

3.25 Ensayos enzimáticos

Las actividades tioltransferasa fueron medidas espectrofotométricamente siguiendo el consumo de NADPH a 340 nm y 30°C, empleando un lector *Multiskan[®] Ascent one-channel vertical light path filter photometer* (Thermo Electron Co.). Los componentes de los ensayos acoplados mediante los que se evaluaron las diferentes actividades que se detallarán a continuación, se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ L, y el medio de reacción estándar contenía en todos los casos Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 2 mM y NADPH 300 μ M.

La reducción de 2-hidroxietyl disulfuro (HED), se evaluó en una mezcla de reacción conteniendo GSH 1 mM (ó 100 μ M GspSH, ó 100 μ M T(SH)₂); glutatión reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GR) 1 U·mL⁻¹ (ó *TcrTR* 1 μ M) *TcrGrx* 0-5 μ M según fue previamente descrito (Gallogly y col., 2009; Marquez y col., 2010).

La reducción de GSSG, CySS o S-nitrosotioles dependiente de T(SH)₂, mediada por *TcrGrx* se evaluó en una mezcla de reacción conteniendo TS₂ 100 μ M, *TcrTR* 1 μ M, GSSG (ó CySS, ó S-nitrosotioles) 15-1000 μ M, y diferentes concentraciones de *TcrGrx* (0,5-5 μ M) (Ceylan y col., 2010; Marquez y col., 2010). Los ensayos se llevaron a cabo de similar manera para la evaluación de la reducción de GSSG por la *Tcr-1C-Grx3* a expensas de T(SH)₂.

La capacidad de la *TcrGrx* transferir electrones a la *TcrcTXNPx*, *TcrmTXNPx* ó *TcrGPxI*, se ensayó midiendo la reducción de t-BOOH o H₂O₂, acorde a la metodología previamente descrita por Flohé (Flohe y col., 2002). Las reacciones contenían TS₂ 100 μ M; *TcrTR* 1 μ M; t-BOOH (o H₂O₂) 70 μ M; 4,5 μ M de la peroxidasa que correspondiese y diferentes concentraciones de *TcrGrx* (0,25-5 μ M). Los ensayos se llevaron a cabo de similar manera para la evaluación de esta actividad mediada por la *TcrGrx3*. Por otra parte, la capacidad de transferir electrones a la *TcrMSRA* fue

determinada a través de la reducción de L-Met(S)SO según la metodología detallada por Arias y col. (Arias y col., 2011). En este caso, las reacciones contuvieron TS_2 100 μM ; *TcrTR* 1 μM ; *TcrMSRA* 4,5 μM ; L-Met(S)SO 2,5 μM y diferentes concentraciones de *TcrGrx* (0,25-5 μM).

La reducción de dehidroascorbato (DHA) por la *TcrGrx*, dependiente de GSH fue ensayada empleando una metodología descrita en (Arias y col., 2013b). La mezcla de reacción en estos ensayos contenía GSH 3mM, GR 1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$; 15-1000 μM DHA y *TcrGrx* (0,25-20 μM).

Para la evaluación de la actividad disulfuro reductasa en proteínas, se empleó el método descrito por Holmgren (Holmgren, 1979), en el que la reducción de los disulfuros intercatenarios en la insulina resulta en la precipitación de la cadena β de esta proteína, produciéndose un incremento en la turbidez del medio de reacción, que es medido a 630 nm. La mezcla reacción consistió en *buffer* fosfatos 100 mM pH 7; EDTA 1mM; DTT 0,5 mM; insulina bovina 0,13 mM; y diferentes concentraciones de la *TcrGrx*.

La capacidad de la *TcrGrx* de participar en la regulación redox de actividades enzimáticas a través de mecanismos de deglutationilación se ensayó utilizando *TaeGAPC* y *TcrUDP-Glc-PPasa* recombinantes. Luego del tratamiento de la *TaeGAPC* con GSSG 10 mM en el medio descrito anteriormente como estándar, el exceso de GSSG fue removido por diafiltración y posteriormente la enzima fue incubada con GSH 10 mM y concentraciones variables de *TcrGrx* (1,25-5 μM). Se realizó en paralelo un ensayo control de la enzima oxidada incubada en las mismas condiciones sin agregado de posibles agentes reductores. A diferentes tiempos de incubación se tomaron alícuotas de las mezclas de reducción para ensayar la actividad GAPC tal como se describe en (Piattoni y col., 2013).

En el ensayo de reducción de la *TcrUDP-GlcPPasa*, una solución 8 μM de esta enzima fue inactivada por tratamiento con diamida 2mM o GSSG 10 mM en el medio de reacción estándar, retirando el exceso de agentes oxidantes por diafiltración. La *TcrUDP-GlcPPasa* fue incubada con *TcrTXNI* 100 μM ó GSH 10 mM más concentraciones variables de *TcrGrx* (2-50 μM). A diferentes tiempos se separaron alícuotas para ensayar la actividad UDP-GlcPPasa, acorde a la metodología descrita en (Fusari y col., 2006). La concentración de la *TcrUDP-GlcPPasa* en esta mezcla de reacción resultó de 80 nM.

La capacidad de la *TcrGspS* de generar un enlace amida entre el GSH y la espermidina (Sp), en una reacción que acopla la hidrólisis de ATP a la oxidación de NADH, a través de las reacciones catalizadas por piruvato kinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Bollinger y col., 1995). La mezcla de reacción completa contenía: HEPES 100 mM pH 7,2; MgSO₄ 10 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM; fosfoenolpiruvato 1 mM; PK 2 U·mL⁻¹; LDH 2 U·mL⁻¹; ATP 2,5 mM; GSH 1 mM; Sp 5 mM; y cantidades variables de *TcrGspS* (0-13 μM). Se realizaron ensayos control conteniendo los componentes anteriormente mencionados excepto la Sp, así como también controles de reacción incluyendo cantidades variables de una *CfaTS* en cantidades variables. La reacción se desarrolló a 30°C, y se midió la oxidación del NADH a 340 nm.

3.26 Análisis de la glutationilación por marcación con Di-E-GSSG

Se empleó una metodología adaptada a partir de la descrita por Bräutigam (Bräutigam y col., 2013). Una solución conteniendo la *TcrUDP-GlcPPasa* recombinante (11 μM) fue incubada por 30 min a 37°C con dieosinadiglutación (Di-E-GSSG) (Cayman Chemical Company) agregado a una concentración de 33 μM, en un medio de reacción conteniendo *buffer* fosfatos 100 mM a pH 7. El exceso fue removido por diafiltración. Los ensayos de reducción fueron realizados en mezclas de reacción conteniendo *buffer* fosfatos 100 mM pH 7 como medio estándar. Se evaluó la reducción con DTT a una concentración de 0,5 mM. Por otra parte, también se ensayaron reacciones de deglutationilación conteniendo GSH 0,1 mM; GR 4 U·mL⁻¹; NADPH 1 mM más el agregado de *TcrGrx*, excepto en uno de los controles en el que la *TcrGrx* fue omitida. Las reacciones de reducción se incubaron a 30°C durante 30 minutos. Las proteínas en las mezclas de reacción se sometieron a análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Previo a la tinción con Coomassie blue, el gel conteniendo las proteínas resueltas fue escaneado en un procesador de imagen *Typhoon*[®] 9400 (GE Healthcare). Las proteínas glutationiladas se identificaron por la señal fluorescente que corresponde al isotiocianato de eosina ($\lambda_{exc} = 518 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$).

3.27 Determinación de los potenciales de reducción

Los potenciales estándar de reducción fueron calculados por medio de la ecuación de Nernst, mediante ensayos de equilibrio redox, como fuera descrito previamente (Arias y col., 2013b). Para esto, diferentes cantidades de la *TcrGrx* oxidada (10 a 40 μM) fue

incubada durante 4 h a 30°C en una mezcla de reacción conteniendo Tris-HCl 100 mM pH 7,5; EDTA 2 mM y GSH 1 mM. Luego, las proteínas fueron separadas de la mezcla de reacción por precipitación con ácido tricloroacético 5% (w/v). En el sobrenadante libre de proteínas se determinaron las concentraciones de GSH y de GSSG. La concentración de GSH, empleando el método de reducción de 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acorde al procedimiento descrito en (Sedlak y Lindsay, 1968), en un medio conteniendo *buffer* fosfatos 50 mM pH 7; EDTA 1 mM; DTNB 1 mM, determinando la absorbancia de 405 nm. La concentración de GSSG por el método cinético descrito en (Arias y col., 2013b), que se basa en la reducción de GSSG dependiente de NADPH por medio de la GR (midiendo la oxidación del NADPH).

3.28 Determinación de pKa de las cisteínas por absorción UV

El estado de ionización de la cisteína nucleofílica fue medido por absorción del anión tiolato a 240 nm (Reckenfelderbaumer y Krauth-Siegel, 2002; Schmidt y Krauth-Siegel, 2003). El análisis se realizó a 25°C, en un rango de pH entre 2 y 11. Se obtuvieron los espectros de absorción de la *TcrGrx* y *TcrGrxC34S* (1-5 μ M) en sus formas oxidadas o pre-reducidas (con DTT 10 mM por 10 minutos), entre los 200 y 340 nm. La línea de base fue realizada en el mismo *buffer* en cada caso. Las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo, en un espectrofotómetro UV-Vis *S-22*[®] (Boeco). Los valores de absorbancia fueron convertidos a coeficientes de extinción empleando un valor de este coeficiente para el grupo tiolato acorde con lo reportado previamente (entre 4 y 6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Nelson y Creighton, 1994; Arias y col., 2013b).

3.29 Determinación del pKa de cisteínas nucleofílicas por ensayo de reducción de DTNB

Otra estrategia empleada para determinar el valor de pKa de un grupo tiol consistió en medir la velocidad de la reacción de reducción de DTNB en función del pH (Whitesides y col., 1977; Shaked y col., 1980). La velocidad de reducción de DTNB por la *TcrGrxC34S* fue determinado por incubación de la proteína en una concentración de 20 μ M con DTNB 500 μ M de medio de reacción a diferentes valores de pH, a 25°C. Las velocidades fueron medidas monitorizando la absorbancia de 405 nm. Posteriormente se calcularon las constantes aparentes de velocidad y graficadas en función del pH.

3.30 Ensayos en cultivos de *T. cruzi*

Los cultivos estándar de *T. cruzi* se realizaron en medio LIT más 10 % (v/v) de SFB, inoculados a una densidad de $1 \cdot 10^6$ epimastigotes $\cdot \text{mL}^{-1}$ e incubados a 28°C.

3.31 Cuantificación del porcentaje de viabilidad

El análisis de la viabilidad en los epimastigotes fue realizado empleando el método de reducción de resazurina, acorde a lo descrito por Rolón (Rolón y col., 2006). Brevemente, en placas policubetas de 96 pocillos, se dispuso una alícuota de cada cultivo a analizar conteniendo $1 \cdot 10^6$ parásitos, en 100 μL finales de PBS-glucosa ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) estéril. A cada suspensión se agregan 10 μL de una solución de resazurina $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se incubó a 28°C durante 16 hs. Los parásitos son inactivados por el agregado de SDS al 1 % (p/v) en el pocillo, mientras que el color desarrollado permanece inalterado. Se determina la absorbancia de la suspensión a 570 y 630 nm, realizando la diferencia en los valores medidos a estas longitudes de onda para obtener el valor de absorbancia neta.

3.32 Ensayos de resistencia al estrés

Los ensayos de tolerancia al estrés oxidativo, se planificaron tomando como base el descrito por Comini y col. (Comini y col., 2004), con modificaciones. Se prepararon suspensiones de epimastigotes de *T. cruzi* (transfectados con pTEX, pTEX/GFP o pTEX/*TcrGrx*) a una densidad de $2 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ en medio LIT y alícuotas de 1 mL de estas suspensiones fueron transferidas a placas policubetas de 48 pocillos. Se agregaron soluciones de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (Sigma) de modo de obtener concentraciones finales comprendidas entre 0-1 $\text{mU} \cdot \text{mL}^{-1}$. De estos ensayos se tomaron muestras a diferentes tiempos para evaluar el porcentaje de viabilidad.

3.33 Ensayos de apoptosis

Para los ensayos de inducción de la muerte celular programada (tipo apoptosis), epimastigotes de las diferentes líneas a ensayar a partir de cultivos en fase exponencial, fueron cosechados y resuspendidos en PBS, y posteriormente se agregó suero humano fresco como fuente de complemento, en una proporción de 10 y 15 % (v/v). Alícuotas de 1 mL de estas suspensiones fueron dispensadas en placas policubetas de 48 pocillos.

A diferentes tiempos, muestras de diferentes pocillos fueron tomadas para evaluar el porcentaje de parásitos con fenotipo apoptótico, acorde a las características descritas en (Kosec y col., 2006c).

De manera similar, se prepararon suspensiones de los epimastigotes de las líneas transformadas en estudio a las que se estimuló hacia la apoptosis por agregado de 10 % (v/v) de la fuente de complemento. Se tomaron muestras a diferentes tiempos post-inducción para cuantificar los porcentajes de parásitos con marcación positiva en el ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling), utilizando el *kit ApopTag® Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit* (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la cuantificación de la actividad tipo caspasa-3, suspensiones de los parásitos en estudio tomadas como control (sin inducción) y otras inducidas por el agregado de la fuente de complemento, fueron preparadas como se describió anteriormente en frascos T de 25 cm², e incubadas por un período de 6 h. En extractos de los parásitos cosechados, conteniendo 50 µg de proteínas totales, se estimó la actividad caspasa-3 empleando un *kit* colorimétrico *Caspase-3 assay, colorimetric®* (Sigma), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

3.34 Obtención de tripomastigotes

La infección primaria se realizó sobre cultivos de células de la línea VERO en fase exponencial, empleando los tripomastigotes metacíclicos generados espontáneamente en cultivos de epimastigotes en fase estacionaria. Para esto, se inocularon cultivos con $3 \cdot 10^6$ células VERO en frascos T de 75 cm², en medio DMEM con SFB 10% (v/v), y se incubaron a 37°C en atmósfera conteniendo 5% CO₂, hasta que las monocapas alcanzaron una confluencia del 75 % (aproximadamente $7 \cdot 10^6$ células). Paralelamente, los cultivos conteniendo los tripomastigotes metacíclicos a partir de los cultivos de epimastigotes (5mL), fueron cosechados y lavados con PBS estéril, con centrifugaciones a 3000 rpm durante 5 min, y resuspendidos en un pequeño volumen de DMEM (sin SFB). Las monocapas se lavaron con PBS estéril, y se les agregó la suspensión conteniendo los parásitos metacíclicos, ajustando el volumen a 7-10 mL con DMEM (sin SFB). Se permitió la interacción entre los parásitos y las células incubándolos durante 16 hs a 37°C en atmósfera conteniendo 5% CO₂. Posteriormente,

los parásitos que no se internalizaron en las células fueron retirados y las monocapas infectadas se lavaron con abundante PBS estéril. Se agregó DMEM sin SFB, y se incubó a 37°C en atmósfera conteniendo 5% CO₂. Las monocapas se monitorizaron diariamente en un microscopio de óptica invertida. A partir del día en que se evidenció la producción de tripomastigotes, éstos fueron diariamente cosechados desde el sobrenadante, restituyendo medio fresco a las monocapas infectadas. Los tripomastigotes derivados de células obtenidos de esta manera se emplearon para infectar una nueva monocapa, y de este modo aumentar la producción de parásitos en este estadio para los ensayos de infección.

3.35 Ensayos de infección

Los ensayos de infección se realizaron sobre monocapas de células HeLa, siendo esta línea celular empleada como modelo de infección de células no-fagocíticas por otros autores (Yoshida, 2006; Claser y col., 2008). El protocolo empleado para la realización fue adaptado a partir del descrito por (Stempin y col., 2002). Brevemente, monocapas de células HeLa conteniendo $2.5 \cdot 10^5$ células por pocillo, fueron cultivadas placas policubetas de 12 pocillos conteniendo cubreobjetos estériles (donde la monocapa desarrolla), en DMEM 10 % SFB a 37°C en atmósfera con 5% CO₂. Cuando las monocapas alcanzaron el 75 % de confluencia, fueron infectadas con tripomastigotes derivados de células (transformados con pTEX or pTEX/*TcrGrx*), obtenidos como se describió anteriormente, en una relación 5:1 (tripomastigotes: células). Los parásitos no internalizados fueron removidos luego de 2 h de incubación por lavados con abundante PBS estéril, y posteriormente se agregó DMEM fresco. Las monocapas infectadas fueron incubadas a 37°C en atmósfera con 5% CO₂. A las 0 y 48 hs post-infección, se tomaron las monocapas infectadas depositadas en sendos cubreobjetos, y fueron lavadas y sujetas a tinción nuclear con 4',6'-diamidino-2fenilindol (DAPI). Se realizaron recuentos de parásitos intracelulares y células infectadas en microfotografías de estas muestras, obtenidas en un microscopio de epifluorescencia. Varios campos fueron sujetos al recuento, empleando el programa *CellNote* (disponible en <http://cellnote.up.pt/>).

3.36 Inmunolocalización de proteínas en *T. cruzi*

Alícuotas de cultivos de *T. cruzi* en fase exponencial tardía fueron cosechados y lavados dos veces con PBS estéril con etapas de centrifugación a 2000 rpm durante 5 min, luego del último lavado, los parásitos fueron suspendidos en una solución de formol 4 % (v/v) en PBS. Se depositó una pequeña cantidad de esta suspensión sobre un portaobjeto silanizado, y se distribuyó de modo de obtener un frotis. Los portaobjetos conteniendo los parásitos adheridos fueron lavados con PBS. Posteriormente se incubaron durante 10 min con una solución de glicina 100 mM en PBS, y luego de esta incubación se realizó un lavado en PBS. Con el objetivo de permeabilizarlos, los parásitos adheridos al portaobjetos se incubaron con una solución de Tritón al 0,5 % (v/v) preparada en PBS, durante 10 min. Luego se realizaron lavados con PBS, y a continuación se incubaron con una solución de BSA 2 % (p/v) en PBS. Posteriormente fueron nuevamente lavados. Los portaobjetos se cubrieron con una solución del anticuerpo primario correspondiente, preparado en PBS y BSA al 0,5 % (p/v), y se dejó en incubación durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de realizar exhaustivos lavados con PBS, se incubaron con una solución del anticuerpo secundario (anti-ratón marcado con TRITC o anti-conejo marcado con FITC) preparado en PBS con BSA al 0,5 % (p/v), durante 1 h, a temperatura ambiente. Luego de lavar exhaustivamente, se agregó una gota de líquido de montaje Prolong[®] (Invitrogen), conteniendo DAPI. Los preparados fueron examinados por microscopía confocal.

3.37 Permeabilización parcial con digitonina

Se realizaron estudios de permeabilización diferencial con digitonina, empleando un protocolo adaptado a partir del descrito por Foucher (Foucher y col., 2006). Brevemente, un *pellet* conteniendo 10^8 parásitos fue tratado sucesivamente con soluciones de concentraciones crecientes de digitonina (0-4 mg·mL⁻¹), preparadas en *buffer* de extracción (Tris-HCl 20mM pH 7,5; NaCl 100 mM; EDTA 1mM; sacarosa 300 mM), conteniendo el inhibidor de proteasas *Set III*[®] (Merck), agregado en una proporción acorde a lo sugerido por el fabricante. Luego de cada paso extractivo, la fracción soluble conteniendo las proteínas liberadas, fue separada por centrifugación y sujeta a ensayos de western blot empleando sueros policlonales anti *Terc*TXNPx, *Tcrm*TXNPx, *Tcr*APX, *Tcr*GlcK, *Tbr*cytC para la identificación de la fracción

conteniendo las proteínas marcadoras de citoplasma, matriz mitocondrial, retículo endoplasmático, glicosomas y espacio intermembrana mitocondrial, respectivamente.

En el caso del ensayo de protección (Castro y col., 2010), el agregado de soluciones de digitonina no fue sucesivo, sino simultáneo sobre sendas biomasas de parásitos. Soluciones de digitonina preparadas como se mencionó anteriormente, conteniendo además proteinasa K en una concentración de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, fueron agregadas sobre sendos *pellets*, conteniendo 10^7 parásitos, y las suspensiones obtenidas fueron incubadas a 37°C durante 15 min. Con el empleo de este protocolo, las proteínas liberadas a cada concentración de digitonina son digeridas por acción de la proteinasa. Las fracciones obtenidas fueron sujetas a ensayos de western blot, empleando los sueros contra proteínas marcadoras como se mencionó anteriormente.

3.38 Deglutinationilación de proteínas en extractos de *T. cruzi*

Para evidenciar la presencia de proteínas glutationiladas que podrían ser *targets* de la actividad de la *TcrGrx*, se siguió una metodología descripta por (Lind y col., 2002), con algunas modificaciones menores. Se aplicó sobre extractos de parásitos sometidos a una condición de estrés oxidativo. Para esto, se cosecharon 10^8 epimastigotes a partir de un cultivo en fase exponencial tardía. La biomasa de parásitos fue lavada y suspendida en 10 mL de PBS estéril. Posteriormente se agregó una solución concentrada de diamida de modo tal de obtener una concentración final de 10 mM, acorde a la condición de estrés previamente empleada por Kelly (Kelly y col., 1993) para oxidar los tioles presentes en el parásito. En esta condición, se incubaron los parásitos a 28°C durante 30 minutos. Los parásitos fueron cosechados, y la biomasa cuidadosamente lavada con PBS. La biomasa de parásitos fue sometida a disrupción por incubación durante 30 min en 1 mL de una solución conteniendo *buffer* fosfatos 100 mM pH 8, NP40 0,1% (v/v) y iodoacetamida (GE-Healthcare) 100 mM. La fracción soluble fue separada por centrifugación a 16.000 rpm durante 30 min. El extracto obtenido de este modo fue preclarificado por incubación con un volumen (equivalente al 5% del extracto) de resina de estreptavidina inmovilizada en agarosa CL-4B (Fluka), previamente equilibrada en el *buffer* de siembra (*buffer* fosfatos 100 mM pH 8, NP40 0,1 %). El excedente de iodoacetamida fue removido por diafiltración. Una alícuota del extracto obtenido luego de ese procesamiento, fue sometido a reducción con la *TcrGrx*, en una mezcla de reacción conteniendo GSH 0,2 mM, GR $1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, NADPH 1 mM y *TcrGrx* $15 \text{ }\mu\text{M}$. La

reacción se incubó a 30°C durante 10 y 30 min. Se realizaron en paralelo tres controles, uno de ellos contenía solamente el extracto, otro con la mezcla de reacción sin el extracto y un tercero con el extracto y la mezcla de reacción excepto la *TcrGrx*. Posteriormente, se procedió a la etapa de marcación de los tioles generados por la reducción, con biotinil-maleimida. Para esto, cada una de las reacciones y controles de la etapa anterior debió ser diafiltrada para eliminar los excedentes de las mezclas, y luego se agregó una solución de biotinil-maleimida (Sigma) preparada fresca, de modo que esta alcanzó una concentración final de 5 mM, incubando durante 30 min a 30°C. Las proteínas marcadas en los tioles con una molécula de biotina, fueron capturadas en la resina de avidina-agarosa, pre-equilibrada en *buffer* fosfatos 100 mM. Luego de varios lavados exhaustivos, la elusión se realizó incubando la resina directamente con *buffer* de siembra para PAGE (no reductor). Las proteínas fueron resueltas por PAGE-SDS en condiciones no reductoras, y el gel obtenido sometido a tinción argéntica.

3.39 Ensayos con cultivos de *S. cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* mutantes en las Grxs monotiólicas, y transformadas con el vector p425 y las construcciones p425/*Tcr*-1C-Grx3c y p425/*Tcr*-1C-Grx3Δ34N, se cultivaron en diferentes condiciones para evaluar e inferir la funcionalidad de la glutarredoxina monotiólica en *T. cruzi*. Para esto, las diferentes cepas se utilizaron para inocular cultivos en medio SD-glucosa de modo de obtener una DO_{600nm} de 0,2. Los cultivos se incubaron a 28°C durante un tiempo suficiente para alcanzar una DO_{600nm} de 0,8-1. Con estos cultivos obtenidos se prepararon suspensiones conteniendo 5·10⁶ cél·mL⁻¹, y a partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas 1/5. De cada una de estas suspensiones se sembraron 4 μL en forma de *spots*, en placas conteniendo medios sólidos, acorde al ensayo a realizar. Uno de los ensayos consistió en sembrar placas conteniendo medio YPD suplementado (al momento de usar) con H₂O₂ 1 y 5 mM. También se sembraron placas con medio SD-glucosa y SD-glicerol, a los fines de evaluar la capacidad de proliferar en medios conteniendo fuentes de carbono fermentable y no fermentable, respectivamente. Una vez sembradas, las placas fueron incubadas a 28°C, durante un tiempo suficiente para observar desarrollo de las levaduras.

4.1 Capítulo 1. Identificación y análisis de una glutatiónil espermidina sintetasa presente en el genoma de *T. cruzi*

4.1.1 Introducción al capítulo

Diversidad en la síntesis del tripanotión en tripanosomátidos

Como ya se comentara anteriormente, una de las peculiaridades de los tripanosomátidos a nivel bioquímico, reside en su metabolismo redox que está basado fundamentalmente en un ditiol de baja masa molecular, el tripanotión (Ariyanayagam y Fairlamb, 2001; Krauth-Siegel y Comini, 2008; Arias y col., 2013a). Al ser una molécula compleja, involucra las vías de síntesis de sus precursores, el glutatión y la espermidina. La fuente de espermidina puede diferir entre especies, siendo algunas capaces de sintetizarla a partir de ornitina, mientras que otras especies dependen del suministro externo de esta poliamina (Heby y col., 2007). Respecto a la síntesis del T(SH)₂ a partir de estos precursores, hay una enzima común en los tripanosomátidos que cataliza las dos etapas que componen esta reacción (TS) (Oza y col., 2002b; Comini y col., 2003; Comini y col., 2005; Oza y col., 2005), mientras que algunos otros géneros o especies contarían además con una enzima (GspS) que cataliza la primera etapa únicamente (Oza y col., 2002a; Comini y col., 2005), como se detalla en la Fig. 4.1.1.

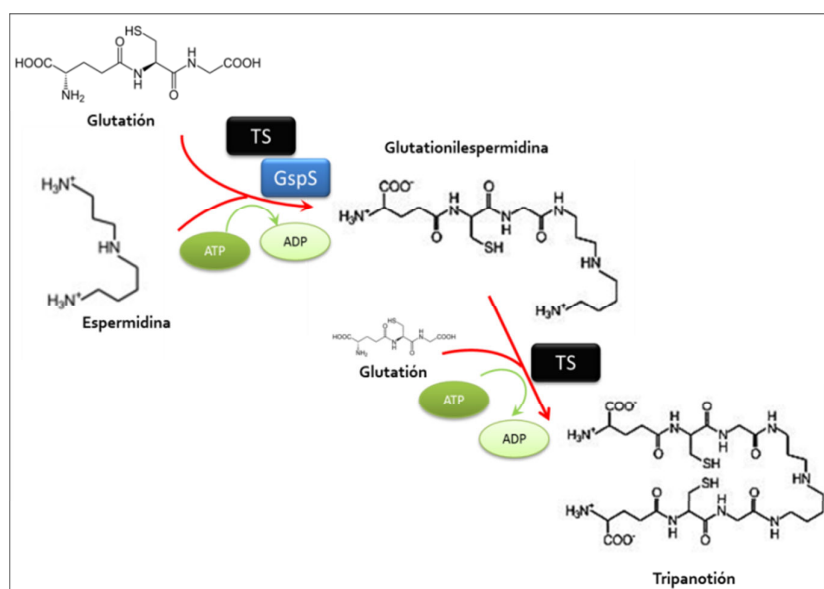


Fig. 4.1.1: Reacciones que componen la vía de síntesis de tripanotión (a partir de glutatión y espermidina) en tripanosomátidos. TS: tripanotión sintetasa; GspS: glutatiónil espermidina sintetasa.

La TS de varios tripanosomátidos entre ellos *T. cruzi*, *T. brucei*, *C. fasciculata* y *L. major*, ha sido caracterizada *in vitro*, utilizando la enzima producida de manera heteróloga (Oza y col., 2002b; Comini y col., 2003; Comini y col., 2005; Oza y col., 2005). Al igual que en el caso de la GspS de procariotas (particularmente se conoce el caso de la de *E. coli*) (Kwon y col., 1997) y la de *C. fasciculata*, estas ligasas catalizan tanto la síntesis del enlace amida (a expensas de ATP), como la reacción inversa correspondiente a la actividad amidasa, es decir la hidrólisis de Gsp o T(SH)₂ para generar los precursores (Wyllie y col., 2009). En el caso de la TS de *C. fasciculata*, ha sido reportado además cierto grado de actividad ATPasa marginal, es decir aún en ausencia de alguno de los sustratos (Comini y col., 2005). La esencialidad del gen que codifica para la TS ha sido demostrada por ejemplo en *T. brucei*, mediante ensayos de *knockdown* (Comini y col., 2004). En virtud de que las TS de tripanosomátidos pueden sintetizar ambas etapas involucradas en la síntesis de T(SH)₂, las funciones de la GspS en las especies que tienen ambos genes no han sido aún elucidadas. En el caso de las enzimas de *C. fasciculata*, es posible que la caracterización cinética haya arrojado luz sobre estos aspectos, ya que se ha demostrado que si bien la primera etapa de la reacción de síntesis de T(SH)₂ puede ser catalizada por ambas, una mayor afinidad por la espermidina en la GspS respecto a la TS (Comini y col., 2005), podría ser el factor determinante de la participación y el orden de cada una de estas ligasas en la reacción. Evidencias sobre la co-purificación de la GspS y la TS a partir de extractos de *C. fasciculata* (Koenig y col., 2005), alientan la idea de la interacción física entre estas dos enzimas en la catálisis de la reacción. La actividad amidasa en la GspS de *C. fasciculata* parece favorecer la hidrólisis de Gsp sobre la de T(SH)₂ (Oza y col., 2002a; Comini y col., 2005), y esta propiedad es la base sobre la que se ha propuesto un posible rol para la GspS en la modulación de los niveles de espermidina, que ya había sido propuesto para el caso de la GspS de *E. coli* (Tabor y Tabor, 1975; Bollinger y col., 1995).

Además de los antecedentes de *C. fasciculata*, genes que codifican para una GspS han sido identificados en los genomas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. mexicana*, y *T. cruzi* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). El estudio sobre la relevancia de estos genes en *Leishmania* ha cobrado interés recientemente, y nuevas evidencias han sido presentadas al respecto, mientras que algunas aproximaciones realizadas para su estudio en *T. cruzi* son materia de este capítulo.

4.1.2 Objetivo

Identificar y clonar, en *T. cruzi*, el gen que codifica para una glutationil espermidina sintetasa y caracterizar funcionalmente la proteína redox. Analizar sus posibles funciones en el metabolismo redox de *T. cruzi*.

4.1.3 Resultados y discusión

4.1.3.1 Características y aislamiento del gen que codifica para una *TcrGspS* en el genoma de *T. cruzi*. Expresión de la proteína recombinante

La secuencia que codificaría para esta GspS fue identificada en el genoma de *T. cruzi* con el número Tc00.1047053508479.110. Se trata de un gen de simple copia, con una secuencia nucleotídica de 2160 pb, que codifica para una proteína de 719 aminoácidos, con una masa molecular estimada en 81 KDa. En la Fig. 4.1.2 se muestran alineamientos de secuencia aminoacídicas con otras GspS de otros tripanosomátidos y de *E. coli*. Esta GspS posee los dos dominios previamente identificados en proteínas ortólogas como el caso de la GspS de *E. coli* por ejemplo.

Como se puede observar en la figura, se han encontrado en esta secuencia residuos importantes para diversas funciones de esta sintetasa, como los involucrados en las interacciones con los sustratos. Sin embargo, en comparación con las secuencias de *E. coli*, hay una diferencia en uno de los residuos involucrados en la interacción con la espermidina. Este residuo es también diferente en la secuencia de *C. fasciculata*, siendo esta última una GspS activa, a la que esta diferencia no parece afectar en términos de unión al sustrato. Los demás residuos de importancia se encuentran conservados o son similares en la *TcrGspS* respecto a los de la secuencia de *E. coli*, o la de *C. fasciculata*. Según el trabajo en que se reporta la caracterización de la GspS de *C. fasciculata* las inserciones que se observan en las secuencias de la sintetasa de tripanosomátidos serían importantes para la interacción con la TS.

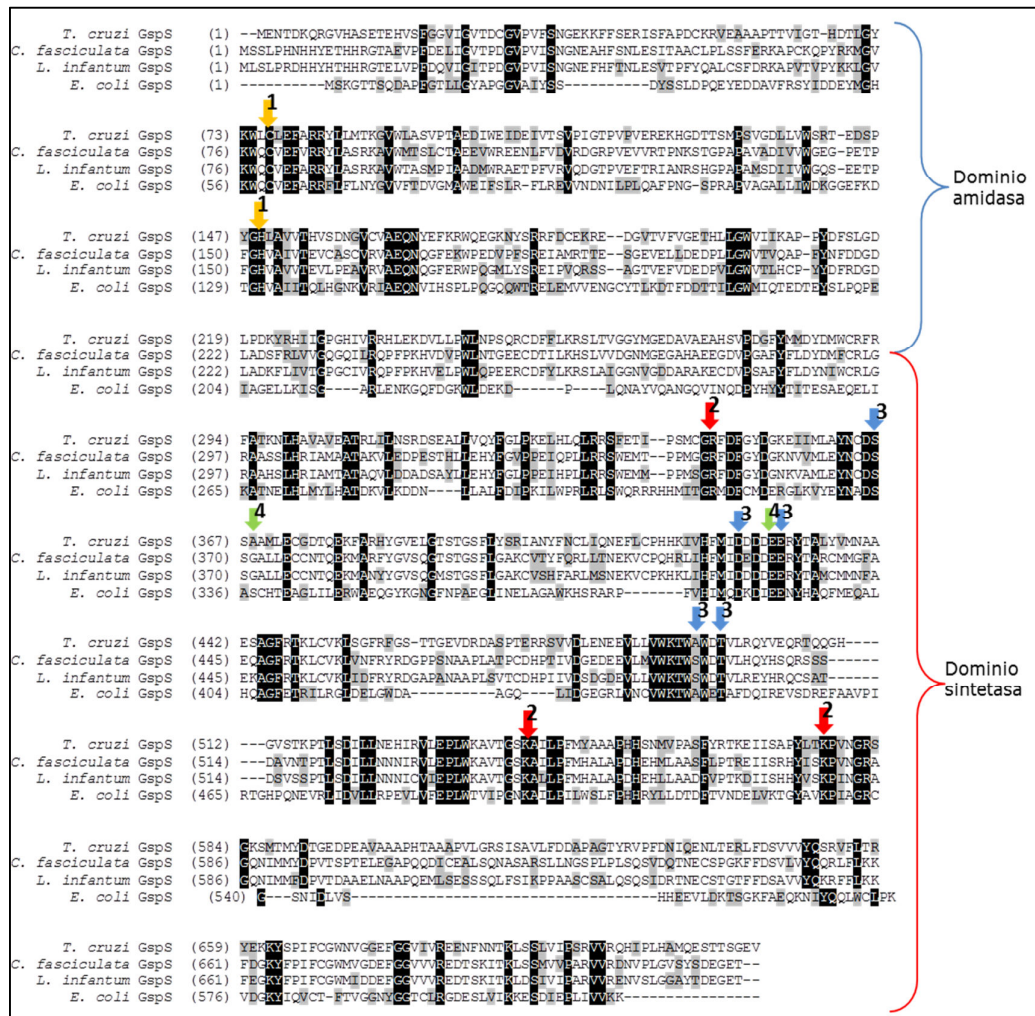


Fig. 4.1.2: Alineamiento de secuencias aminoacídicas correspondientes a glutatiónil espermidina sintetas de diversos organismos: *T. cruzi* (g.i. 71667801); *C. fasciculata* (g.i. 10947099); *L. infantum* (g.i. 146089219); *E. coli* (g.i. 861186). Se indican con flechas y números los residuos de aminoácidos funcionales; →1: residuos involucrados en la actividad amidasa. →2: residuos vinculados a la unión de ATP. Residuos posiblemente involucrados en la unión al sustrato →3: GSH y →4: espermidina.

Para proceder con los estudios de caracterización, el gen que codifica para la *TcrGspS* fue amplificado a partir de ADN genómico de *T. cruzi* CLBrenner por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos (cuyas secuencias se detallan en la sección de materiales y métodos). Como producto de la reacción se obtuvo un amplicón mayor a 2000 bp, que se purificó a partir del gel de agarosa y se ligó al vector pGEM-TEasy y se remitió al servicio de secuenciación. Una vez verificada que la secuencia del gen amplificado correspondió con la secuencia informada en la base de datos, se procedió a subclonarlo

en distintos vectores para su expresión recombinante. Se evaluó la expresión recombinante en *E. coli*, empleando varios vectores, y en la mayoría de los casos se obtuvieron niveles de expresión nulos. Dadas estas experiencias, se resolvió expresar esta proteína como fusión, empleando dos vectores diferentes: el vector pMal_{mod}. (para obtener la proteína de fusión a MBP) y el pET32 (para obtener la proteína de fusión a Trx), las construcciones realizadas se muestran en la Fig. 4.1.3.

Luego de transformar células de *E. coli* BL21(DE3) con la construcción pMal_{mod}/*TcrGspS*, se evaluó la capacidad de sobreexpresión y la calidad de la proteína obtenida, en ensayos de expresión. En estos ensayos se incluyó un control correspondiente a la misma cepa de *E.coli* transformada con el vector sin ningún inserto. Dado que un buen rendimiento de proteína de fusión de un tamaño acorde con el estimado, pudo ser obtenido en la fracción soluble de los extractos de cultivos, se procedió a realizar un cultivo de mayor volumen para obtener una mayor cantidad de biomasa para la purificación.

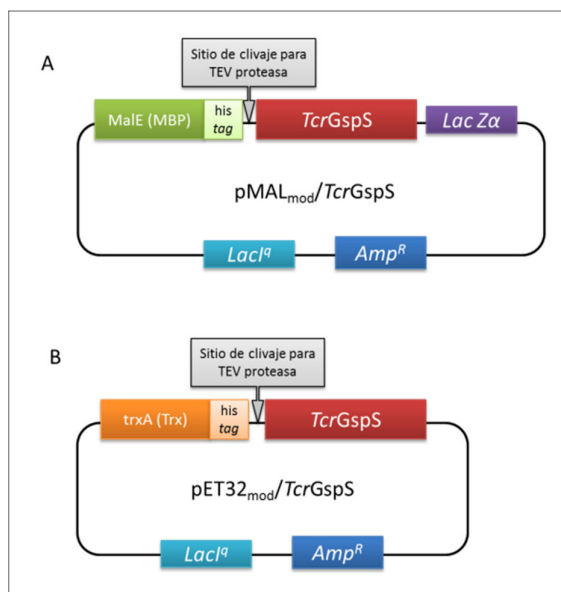


Fig. 4.1.3: Construcciones plasmídicas empleadas para transformar *E. coli*, con el objetivo de expresar *TcrGspS* como proteína de fusión. A) Construcción en base al vector pMAL modificado. B) Construcción preparada en base al vector pET32 modificado.

Luego de la etapa de purificación empleando cromatografía de afinidad, se obtuvieron fracciones de eluato enriquecidos en la proteína de fusión. Dado que el vector

seleccionado cuenta con una secuencia que incluye un sitio de corte con TEV proteasa, la proteína de fusión fue digerida convenientemente con esta proteasa. Luego del corte, se realizó un segundo paso de purificación por cromatografía de afinidad para eliminar la MBP y la proteína de fusión no digerida, y recuperar la proteína de interés en el *flow trough*. Luego de esta recuperación, la solución conteniendo la *TcrGspS* fue diafiltrada, y acondicionada en buffer HEPES conteniendo glicerol y DTT, según las estrategias reportadas para la purificación de las GspS de *C. fasciculata*. En la Fig. 4.1.4 (A), se muestran las fracciones proteicas obtenidas luego del primer paso cromatográfico, y la solución que finalmente rindió luego de la digestión con TEV proteasa, purificación y acondicionamiento de la *TcrGspS*. La solución de proteína obtenida se utilizó en ensayos de actividad enzimática.

La construcción pET32/*TcrGspS* también se usó para transformar células de *E. coli* BL21(DE3). En ensayos de expresión realizados en diferentes condiciones se pudo establecer que la proteína de fusión se obtiene completamente insoluble, como se observa en la Fig. 4.1.4 (B). No obstante, proteína de fusión de un grado aceptable de pureza fue obtenida a partir de estos cuerpos de inclusión, que se utilizó como antígeno para inmunizar conejos y así obtener antisuero.

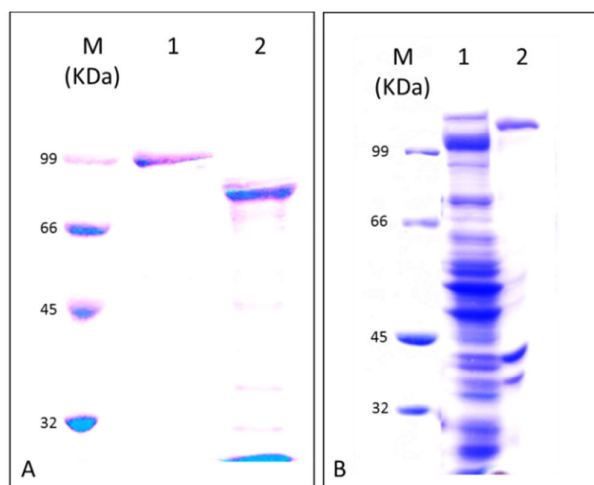


Fig. 4.1.4: Análisis de la expresión y purificación de *TcrGspS* como proteína de fusión por PAGE-SDS. A) Purificación de la proteína de fusión a MBP, en la calle 1 se muestra la proteína de fusión purificada por cromatografía de afinidad en columna de amilosa, en la calle 2 la proteína obtenida luego de la digestión con TEV proteasa, purificación y acondicionamiento. B) Purificación de la proteína de fusión a Trx, en la calle 1 la fracción soluble del extracto proteico de las bacterias transformadas, mientras que en la calle 2 se observa la fracción insoluble, donde se encontró la proteína de fusión.

4.1.3.2 Ensayos de actividad sintetasa

Para estudiar la actividad sintetasa en la *TcrGspS* recombinante, se empleó un sistema acoplado, previamente descrito para evaluar este tipo de actividades y cuyos componentes se muestran en la Fig. 4.1.5.

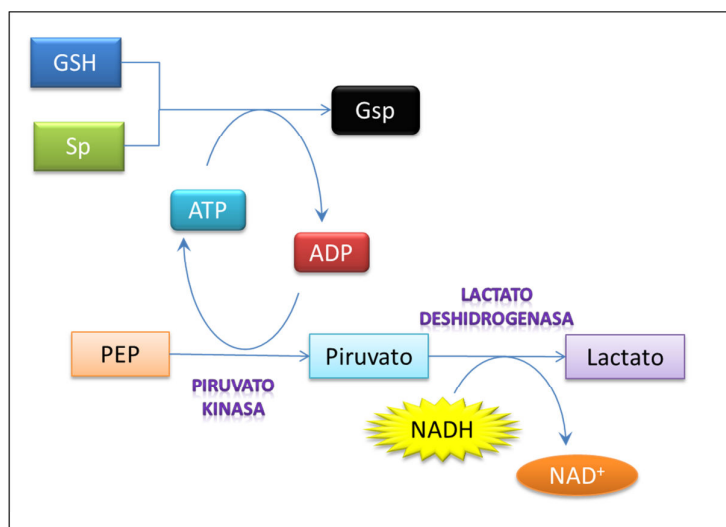


Fig. 4.1.5: Sistema enzimático utilizado para la determinación de la actividad Gsp sintetasa, acoplado a través del ADP generado en la reacción de síntesis.

Como se puede observar en este esquema, el sistema acopla el ADP generado de la reacción principal, la formación del enlace amida, a la transferencia del fosfato a partir del fosfoenolpiruvato por la piruvato kinasa, mientras que el piruvato generado es reducido a expensas de NADH a lactato, por la lactato deshidrogenasa. Mediante este acople, la generación de ADP es seguido mediante la evolución del NADH, a 340 nm. Para evaluar el correcto funcionamiento del sistema acoplado, se realizaron paralelamente reacciones en las que se emplearon cantidades variables de TS de *C. fasciculata* obtenida de manera recombinante, considerada como enzima control. Se pudo comprobar de esta manera que mientras el acople enzimático funcionaba en correctas condiciones, la *TcrGspS* obtenida a partir de la proteína de fusión careció de actividad sintetasa. Se llegó a esta conclusión luego de realizar los ensayos enzimáticos empleando los controles que se muestran en la tabla 4.1.1.

Tabla 4.1.1: Ensayos de determinación de la actividad sintetasa por la *CfaTS* (control) y la *GspS* recombinante, producida en *E.coli*. Las mezclas de reacción (cuya composición se detalla), fueron incubadas a 30 °C y el consumo de NADH fue monitorizado a 340 nm.

Ensayo	Componentes de la mezcla de reacción	k_{cat} (seg ⁻¹)
<i>CfaTS</i> (GSH)	Reactivos básicos (Buffer HEPES 0,1M, EDTA 2mM) Sistema acoplado (NADH 300mM, PEP 1mM, PK 2U·mL ⁻¹ , LDH 2U·mL ⁻¹) ATP 100mM + MgSO ₄ 10mM GSH <i>CfaTS</i>	3,87·10 ³
<i>CfaTS</i> (GSH-Sp)	Reactivos básicos Sistema acoplado ATP100mM + MgSO ₄ 10mM GSH Sp <i>CfaTS</i>	4 ·10 ⁴
<i>TcrGspS</i> (GSH)	Reactivos básicos Sistema acoplado ATP100mM + MgSO ₄ 10mM GSH <i>TcrGspS</i>	1,1·10 ⁴
<i>TcrGspS</i> (GSH-Sp)	Reactivos básicos Sistema acoplado ATP100mM + MgSO ₄ 10mM GSH Sp <i>TcrGspS</i>	1,4·10 ⁴

En los resultados presentados en esta tabla se puede observar que tanto en el ensayo enzimático control, empleando la *CfaTS*, como en el ensayo de evaluación de la *TcrGspS* hubo consumo de NADH, que indica hidrólisis de ATP, aún en ausencia de uno de los sustratos, la espermidina. En el caso de la *CfaTS*, luego del agregado de espermidina, comienza a consumirse el NADH a una velocidad mayor que la correspondiente a la reacción sin este sustrato, acorde con la capacidad de la *CfaTS* de catalizar la reacción de síntesis que ocurre a expensas de ATP. En el caso de la *TcrGspS*, al incluir el sustrato espermidina no existió un aumento en la velocidad de consumo de NADH, lo que estaría indicando que en realidad no está ocurriendo la síntesis del metabolito Gsp a expensas de ATP catalizado por esta enzima. Dado que el GSH ha sido identificado como un inhibidor para el caso de la *TcrTS*, el experimento con la *TcrGspS* fue repetido con diversas concentraciones menores de GSH, obteniéndose similares resultados a los mostrados en la tabla 4.1.1. De este ensayo se concluyó que la *TcrGspS* recombinante, obtenida en *E.coli* como proteína de fusión no resultó activa. Luego de evaluar otros sistemas para obtener la *TcrGspS* recombinante activa, sin resultados positivos, se decidió sobreexpresar la enzima en su organismo de origen.

Para esto se preparó la construcción en base al vector pTEX que se muestra en la Fig. 4.1.6, en la que la *TcrGspS* se expresaría como fusión a un *tag* de seis histidinas. Con esta construcción se transformaron epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c. Luego de realizar varios pasajes de los parásitos en medio de cultivo con G418, durante el tiempo generalmente recomendado para la selección de los epimastigotes, se realizaron ensayos de western blot. Para esto, extractos de los epimastigotes transformados con pTEX o pTEX-6his*TcrGspS*, se separaron por electroforesis, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron empleando los anticuerpos preparados previamente utilizando la proteína de fusión Trx-GspS y purificados por cromatografía de afinidad como se detalla en la sección de materiales y métodos. Luego del revelado quimioluminiscente, se obtuvo el perfil que se observa en la Fig. 4.1.6.

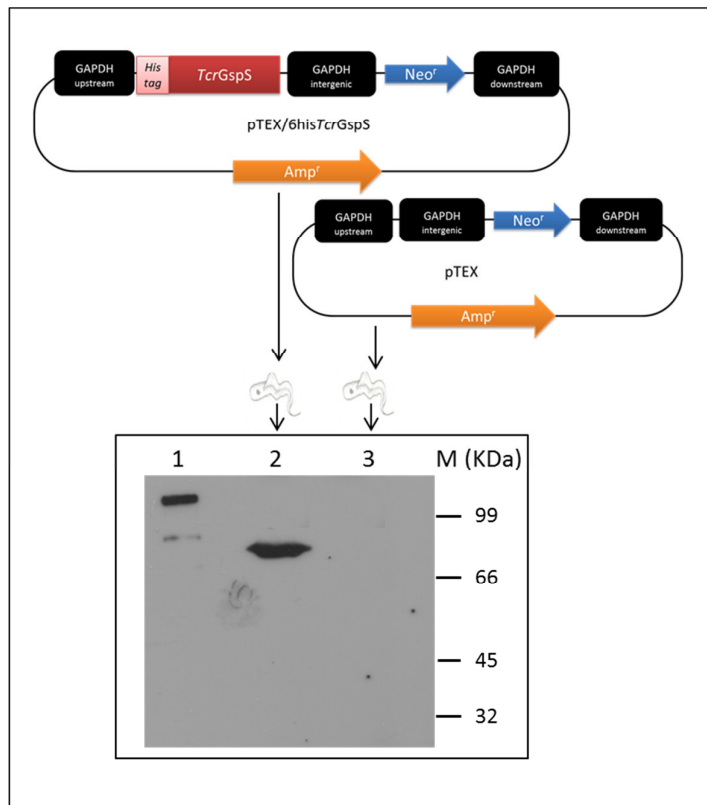


Fig. 4.1.6: Construcciones en base al vector pTEX empleadas para transformar epimastigotes de *T. cruzi*, con el objetivo de sobreexpresar la *TcrGspS* como fusión a seis histidinas. En la placa redigráfica de la parte inferior se observa el resultado del western blot empleando los anticuerpos anti-*TcrGspS*. Calle1: control positivo (Trx-GspS). Calle 2: Extracto de epimastigotes transformados con pTEX-6his*TcrGspS*. Calle 3: Extracto de epimastigotes transformados con pTEX.

En esta figura se observa una banda de reconocimiento de masa molecular coincidente con la esperada, en la calle correspondiente al extracto de los parásitos transformados con el vector pTEX-6his*TcrGspS*, mientras que en los extractos de epimastigotes control, transformados con pTEX, no se detectó ninguna banda de reconocimiento. Este resultado por un lado indica que los parásitos transformados con pTEX-6his*TcrGspS* efectivamente sobreexpresan la proteína de interés. El empleo de este sistema de sobreexpresión genera ciertas garantías sobre el producto obtenido, ya que de existir modificaciones postransduccionales serían *a priori* los que ocurrirían con el producto del gen original, tal como existen en el parásito. Por otra parte, mediante este análisis no se verificó expresión de esta proteína en la cepa *wild type*, o su equivalente representada por la cepa transformada con el vector vacío, al menos en este estadio.

Para obtener una cantidad de proteína adecuada para poder realizar determinaciones de actividad, se cosecharon biomazas de cultivos de los epimastigotes transformados con pTEX-6his*TcrGspS*, correspondiente a 250 mL de cultivo. La proteína como fusión al *tag* de seis histidinas se purificó a partir de extractos de esta línea del parásito, manipulado en condiciones de seguridad hasta el momento posterior a la lisis celular. La purificación se realizó por IMAC, realizándose el acondicionamiento de las fracciones conteniendo la proteína de interés de manera similar a lo descrito en la sección anterior, para la versión de la proteína fusionada a MBP. En la Fig. 4.1.7 se muestra una fotografía del gel de poliacrilamida en el que se resolvió electroforéticamente el producto obtenido.

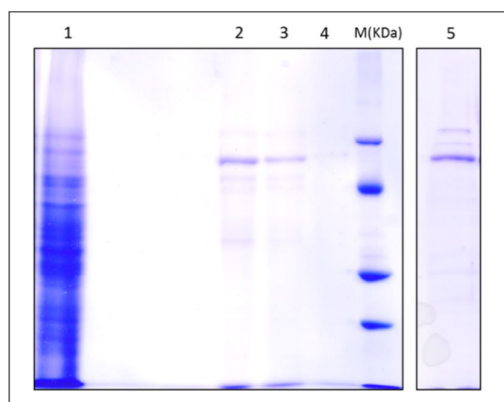


Fig. 4.1.7: Purificación de *TcrGspS* a partir de cultivos de epimastigotes transformados, por IMAC. Análisis por PAGE-SDS. Calle 1 extracto crudo de los parásitos. Calles 2, 3 y 4 eluatos obtenidos a concentraciones de imidazol 100, 250 y 500 mM. Calle 5. Análisis del pool proteico concentrado y acondicionado.

La proteína obtenida de esta forma se utilizó en ensayos de actividad enzimática, cuyos componentes, así como las actividades resultantes se detallan en la tabla. 4.1.2.

Tabla 4.1.2: Ensayos de determinación de la actividad sintetasa por la *Cfa*TS (control) y la *TcrGsp*S recombinante, producida en *T.cruzi*. Las mezclas de reacción (cuya composición se detalla), fueron incubadas a 30 °C y el consumo de NADH fue monitorizado a 340 nm.

Ensayo	Componentes de la mezcla de reacción	k_{cat} (seg ⁻¹)
<i>Cfa</i> TS (GSH)	Reactivos básicos (Buffer HEPES 0,1M, EDTA 2mM) Sistema acoplado (NADH 300mM, PEP 1mM, PK 2U·mL ⁻¹ , LDH 2U·mL ⁻¹) ATP 100mM + MgSO ₄ 10mM GSH <i>Cfa</i> TS	2,8 · 10 ²
<i>Cfa</i> TS (GSH-Sp)	Reactivos básicos Sistema acoplado ATP100mM + MgSO ₄ 10mM GSH Sp <i>Cfa</i> TS	8,9·10 ⁴
<i>TcrGsp</i> S (GSH)	Reactivos básicos Sistema acoplado ATP100mM + MgSO ₄ 10mM GSH <i>TcrGsp</i> S	1,8·10 ⁴
<i>TcrGsp</i> S (GSH-Sp)	Reactivos básicos Sistema acoplado ATP100mM + MgSO ₄ 10mM GSH Sp <i>TcrGsp</i> S	1,7·10 ⁴

Como se deduce de los valores obtenidos, de manera similar a lo observado en los ensayos con la proteína recombinante obtenida en *E. coli*, en estos ensayos se produjo la hidrólisis de ATP dependiente de la *TcrGsp*S, pero esta hidrólisis resulto independiente de la presencia de la espermidina como sustrato, con lo que se concluye que *in vitro* esta enzima no es capaz de catalizar la síntesis de Gsp.

Para evaluar la actividad sintética de la *TcrGsp*S por otra metodología, se realizaron reacciones enzimáticas *in vitro*, en las que el producto generado se evaluó por cromatografía en capa delgada (TLC). Además de la actividad sintetasa, y dada la identificación del dominio amidasa mediante el análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica, la actividad Gsp amidasa también fue analizada. Para esto se realizaron los ensayos enzimáticos, en este caso sin el sistema acoplado, cuyas composiciones se muestra en la Fig. 4.1.5. Luego de diferentes tiempos de reacción y de separar las proteínas de cada ensayo, el producto se analizó por TLC como se indica en el apartado de materiales y métodos, y el resultado se muestra en la Fig. 4.1.8

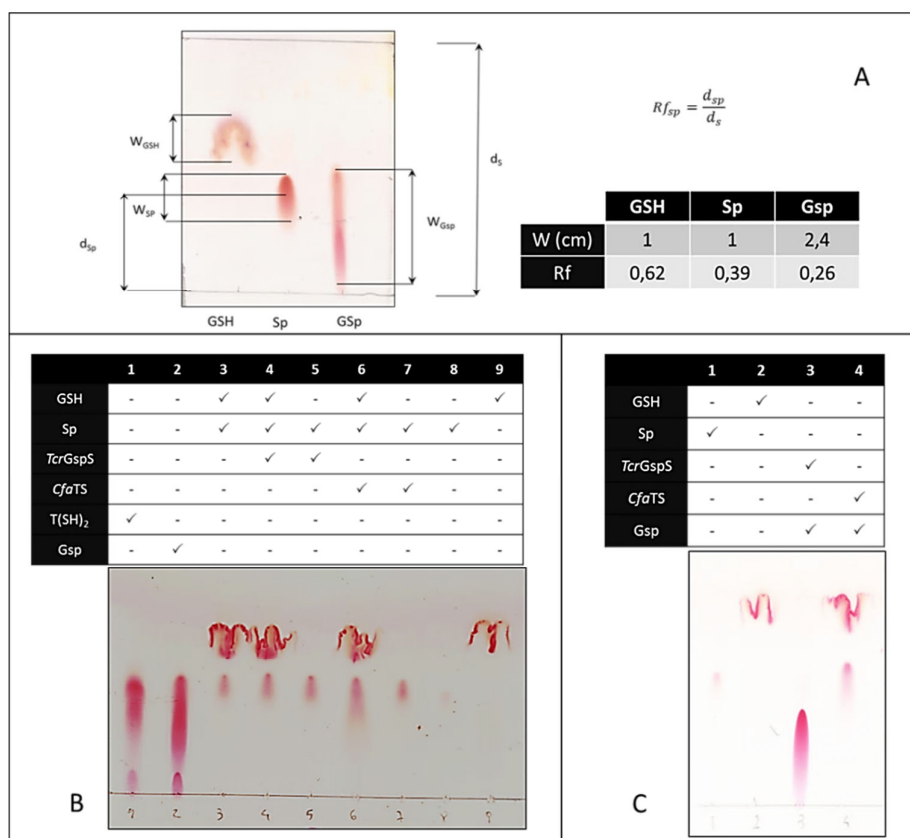


Fig. 4.1.8: Análisis de los productos de reacción de la *TcrGspS* por TLC. A) Análisis de los compuestos reactantes (GSH y Sp) y producto (Gsp) puros, pre-reducidos con DTT 10 mM. En la tabla que acompaña a la TLC se indican, a modo de ejemplo los valores de los parámetros empleados para caracterizar los compuestos. B) Análisis de productos puros, tomados como estándares [T(SH)₂ y Gsp], y mezclas de reacción de síntesis, conteniendo los compuestos que se indican en la grilla situada por encima de la imagen de la placa. C) Análisis de los productos de reacción amidasa, conteniendo los compuestos indicados en la grilla.

En la imagen A de la Fig. 4.1.8, se pueden comparar los patrones obtenidos para la cromatografía de los productos y reactantes a identificar en las reacciones enzimáticas, en este caso GSH, Sp y Gsp. Se puede observar que el para el spot correspondiente al GSH se obtuvo un mayor Rf respecto a los de la Sp y la Gsp. Además se observa que este tiol se separa formando un spot poco compacto. Si bien la distancia respecto al frente de corrida obtenido para la Sp y la Gsp fueron bastante similares, como se puede analizar en la imagen, en el spot correspondiente a la Gsp el efecto de *tailing* observado es mayor para la Sp. Este efecto de retraso en la Gsp no pudo ser corregido a través de las condiciones cromatográficas, pudiendo diferenciar a la Gsp de la Sp por el parámetro “W” del spot obtenido, correspondiente al ancho del pico cromatográfico para este spot, y por lo tanto el menor Rf calculado, acorde al cálculo realizado siguiendo las recomendaciones encontradas en la bibliografía para estos casos (Hahn-

Deinstrop, 2007). Por otra parte, en la Fig. 4.1.8, en la imagen B, se pueden observar los patrones obtenidos para estándares y productos de las diferentes reacciones catalizadas por la *TcrGspS* o la *CfaTS* tomada como control. Se puede observar que tanto la movilidad como forma del spot de los compuestos tomados como estándares, T(SH)₂ y Gsp, son muy similares. Por otra parte, al comparar los spots obtenidos en las posiciones 3 y 5, respecto al de la posición 4, no se observó un patrón diferente en las muestras correspondiente a la mezcla de reacción de síntesis sin *TcrGspS*, respecto de la mezcla conteniendo la *TcrGspS*. Por otra parte, para la reacción de síntesis que involucra a la *CfaTS* se puede observar un spot de mayor W que el correspondiente a la Sp, y que parece corresponder a patrón de movilidad intermedio entre la Sp y el T(SH)₂. Este patrón no se observó en la muestra sembrada a continuación, en la posición 7, correspondiente a la reacción que no contiene GSH. Estos resultados cromatográficos estarían sugiriendo que el producto observado en la reacción completa (sembrado en la posición 6) efectivamente resulta de la catálisis por la *CfaTS*. La formación de un producto de la reacción catalizada por la *CfaTS* podría estaría siendo detectado por esta metodología, y sería acorde con las observaciones realizadas en los ensayos acoplados de actividad. Las características del spot correspondientes a este producto no fueron identificadas en la mezcla de la reacción catalizada por la *TcrGspS*, sugiriendo que este producto no estaría presente en este caso.

A través de esta metodología, la actividad amidasa también fue evaluada. Como se puede observar en la Fig. 4.1.8 (C) en la reacción correspondiente a la *CfaTS* se evidenció la formación de GSH y Sp a partir de Gsp. La aparición de los spots correspondientes a estos precursores no se observó en la mezcla de reacción conteniendo Gsp y *TcrGspS* (sembrada en la posición 3), por lo que se concluyó que la actividad amidasa no se encuentra presente o lo está en niveles marcadamente menores que en el caso de la TS, ya que los productos de esta actividad no pudieron ser detectados. El objetivo de este análisis fue corroborar los resultados obtenidos en los ensayos acoplados, es decir que el producto del gen que codifica para una GspS en *T. cruzi* fue capaz de catalizar la hidrólisis del ATP, aunque esta actividad no se vió asociada a la síntesis de Gsp, al menos en las condiciones en que se realizaron estos ensayos *in vitro*. Tampoco fue posible detectar actividad amidasa *in vitro* en esta proteína, aun cuando el dominio y los residuos involucrados en esta actividad fueron encontrados en el análisis *in silico* (Fig. 4.1.2).

Existen reportes de otros casos de enzimas de este tipo en los que la actividad sintetasa no pudo ser corroborada *in vitro*. Tal es el caso de dos genes que codifican GspS en *E. coli*, denominados YgiC y YjfC (Sui y col., 2012). Estos genes fueron identificados como homólogos del gen GspSA, cuyo producto de expresión fue estudiado y caracterizado, y resultó ser una GspS que en *E. coli* efectivamente cataliza la síntesis de Gsp. En el caso de los genes YgiC y YjfC, codifican para dos productos proteicos que según se ha podido probar son capaces de hidrolizar ATP, pero no la síntesis de Gsp (Sui y col., 2012). En adición, se estudiaron los niveles de tioles en cepas de *E. coli* mutantes *knockout* en los genes GspSA, YgiC y YjfC. Los resultados de estos estudios indican que en aquellas cepas que carecen del gen GspSA no producen Gsp, mientras que la síntesis de Gsp no se vió afectada en las que carecían de los genes YgiC e YjfC (Sui y col., 2012). En alineamientos de las secuencias de las proteínas codificadas por estos genes, se pudo establecer que algunos los residuos involucrados en la unión de los sustratos (GSH y Sp) estarían ausentes en los productos de los genes YgiC y YjfC, a diferencia de lo que se observa en la secuencia de aminoácidos que componen la *TcrGspS*, en la que estos importantes residuos han sido identificados.

4.1.3.3 Estudio de la expresión de la *TcrGspS* en *T. cruzi*

Para estudiar cual podría ser la relevancia de la presencia del gen que codifica para la *TcrGspS* en *T. cruzi*, se realizó el estudio de la expresión en diferentes estadios del parásito. Extractos de los estadios epimastigote, amastigote y tripomastigote fueron analizados mediante western blot empleando los anticuerpos anti *TcrGspS* purificados, obteniéndose como resultado la imagen que se observa en la Fig. 4.1.9.

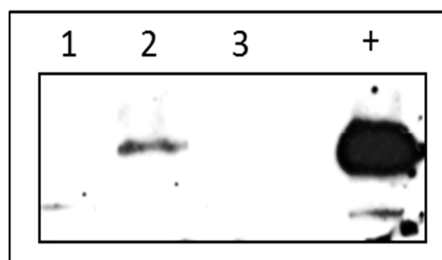


Fig. 4.1.9: Análisis de la expresión de *TcrGspS* en *T. cruzi*. Ensayo de western blot sobre extractos de epimastigotes (en la calle 1), amastigotes (en la calle 2) y tripomastigotes (en la calle 3), incluyendo la proteína purificada como control positivo (en la calle identificada como +). En cada caso se sembró el extracto obtenido a partir de 10^7 parásitos de *T. cruzi* Dm28c.

Una señal de reconocimiento correspondiente a una proteína de la masa molecular esperada se pudo detectar en la calle se obtuvo en las calles correspondiente al extracto de amastigotes, luego de tiempos de exposición relativamente prolongados en la etapa de revelado.

Este resultado sería indicativo de que los niveles de expresión de esta *TcrGspS* serían sumamente bajos y que esta expresión estaría ocurriendo en el estadio replicativo en el hospedador. Esta observación abre nuevamente el interrogante sobre la relevancia y la funcionalidad del gen y la proteína que codifica, en este parásito, y que no han podido ser resuelto en el marco de este trabajo de tesis. Este tipo de cuestiones permanecen aún abiertas, de manera similar a lo que ocurre con su ortólogo en *Leishmania infantum*. En el caso de los parásitos del género *Leishmania*, el estado del arte respecto del gen que codifica para una *GspS* indicaba que correspondía a un pseudogen, sin embargo esta fue una cuestión que refiere a la condición particular de *L. major* y *L. brasiliensis* ya que en el caso de *L. infantum* (entre otras especies del género) este gen podría codificar para una putativa proteína (Krauth-Siegel y Comini, 2008). El estudio de la relevancia de la secuencia que codifica la *LiGspS* en *L. infantum* ha sido recientemente tomado en consideración en un trabajo realizado reciente (Sousa y col., 2014). En este trabajo, Souza y col. describen la realización de estudios de *knockout* de los genes que codifican para tanto para la *LiTS* como para *LiGspS*. Como resultados de los experimentos de *knockout* se pudo concluir que la *LiTS* resulta esencial para este parásito, y que por lo tanto la *Gsp* por sí misma no podría soportar todas las funciones dependientes de $T(SH)_2$, aunque estos autores no ponen en consideración que, al igual que en *T. cruzi* no existen referencias previas sobre la capacidad de esta *GspS* de llevar a cabo la síntesis de *Gsp in vivo*. Respecto a la obtención de parásitos *knockout* para la *LiGspS*, se ha demostrado que la eliminación de este gen del genoma de *L. infantum* no tiene efectos apreciables, ya que no resultó crucial para la supervivencia del parásito. Tampoco se vieron afectados la capacidad infectiva o la replicación de amastigotes, al menos en el breve plazo estudiado, en los parásitos *knockout* para esta *GspS*. Cabe remarcar que en el caso de *L. infantum*, no fue posible detectar la expresión de esta proteína en ninguno de los estadios del ciclo de vida del parásito.

El devenir de la investigación de los sistemas de síntesis de tripanotión en kinetoplastos ha puesto de manifiesto la existencia de dos enzimas asociadas a este proceso: la *TS* encontrada en todos los organismos en cuestión y la *GspS* cuyo gen ha sido encontrado en ciertas especies del género *Leishmania*, en *T. cruzi* y en *C. fasciculata*, organismo en el que además el producto del gen pudo ser caracterizado. Genes que codifican para *GspS* también han sido identificados en bacterias como por ejemplo *E. coli*, en los que todavía no resulta clara cuál es la función del producto

producido por la enzima, es decir la Gsp (Lin y col., 1997; Chiang y col., 2010). En base a estos antecedentes, la hipótesis que podría surgir es que en tripanosomátidos este podría ser un posible origen evolutivo del gen de la GspS, y que además este gen se habría duplicado y modificado para dar origen al que codifica para la TS (Oza y col., 2005). De esta hipótesis se ha desprendido además la suposición de que el gen que codifica la GspS haya sido eliminado en muchos casos, luego de esta especialización adquirida por el gen de la TS, aunque esto ocurrió solo en algunos de los integrantes de los kinetoplástidos. La asunción de esta hipótesis limita la posibilidad de extrapolar evidencias encontradas en algunos tripanosomátidos a lo que ocurriría en otros, y justifica la necesidad de estudios particulares a cada especie. Por esto, dada la presencia de esta *TcrGspS* en el estadio amastigote de *T. cruzi*, parece ser necesario continuar con los estudios de caracterización de esta enzima, aunque desde un enfoque *in vivo* ya que los estudios *in vitro* realizados en el marco de este trabajo no fueron concluyentes debido a lo recalcitrante que resultó la caracterización de esta enzima. Es probable que la evaluación de los parámetros relacionados a la infección y supervivencia en las células hospedadoras, de parásitos que carecen de uno o ambos alelos del gen que codifica para la GspS, brinde evidencias que definan inequívocamente sobre su funcionalidad en *T. cruzi*.

4.1.4 Conclusiones del Capítulo 1

A partir de los resultados expuestos en este capítulo, obtenidos de los experimentos realizados es posible enunciar las siguientes conclusiones.

Existe en el genoma de *T. cruzi* un gen que codifica para una *TcrGspS*. A través del análisis por homología de secuencias, se pudo establecer que la proteína codificada contiene los residuos necesarios para catalizar la síntesis de Gsp. Asimismo, se identificó en la proteína un dominio amidasa, atribuido también a proteínas similares previamente caracterizadas.

La proteína *TcrGspS* producida en forma recombinante tanto en un hospedero procarionota como en el hospedero homólogo no resultó activa en un sistema acoplado previamente descrito. Los productos de síntesis de la reacción catalizada por la *TcrGspS* recombinante obtenida a partir de la expresión en el hospedero homólogo no pudieron ser detectados mediante cromatografía en capa delgada.

Mediante ensayos de western blot se evidenció la expresión de proteína *TcrGspS* en extractos del estadio amastigote de *T. cruzi*. Considerando la presencia de esta proteína en el parásito resulta interesante la posibilidad de profundizar sobre la búsqueda de posibles funciones. Dada la dificultad encontrada para la caracterización bioquímica en los ensayos planteados mediante un enfoque *in vitro*, futuros experimentos deberán contemplar el estudio de las funciones de esta proteína en su entorno fisiológico, es decir mediante experimentos *in vivo* empleando el estadio del parásito donde podría resultar relevante.

4.2 Capítulo 2. Estudio de las características de una glutarredoxina monotiólica en *T. cruzi*

4.2.1 Introducción al capítulo

4.2.1.1 Glutarredoxinas monotiólicas. Definición y características

Las glutarredoxinas (Grxs) son tiol-disulfuro oxidorreductasas, caracterizadas en la mayoría de los organismos como dependientes de glutatión (Lillig y col., 2008). Estructuralmente pertenecen a la familia de las tioredoxinas (Lillig y col., 2008), que se caracteriza por un plegamiento como el que se observa en el ejemplo de la Fig. 4.2.1 (Atkinson y Babbitt, 2009). Según los residuos que componen su sitio activo, las Grxs se clasifican en monotiólicas (un residuo de cisteína, por ejemplo: CGFS) o ditiólicas (2 residuos de cisteína, por ejemplo: CPYC).

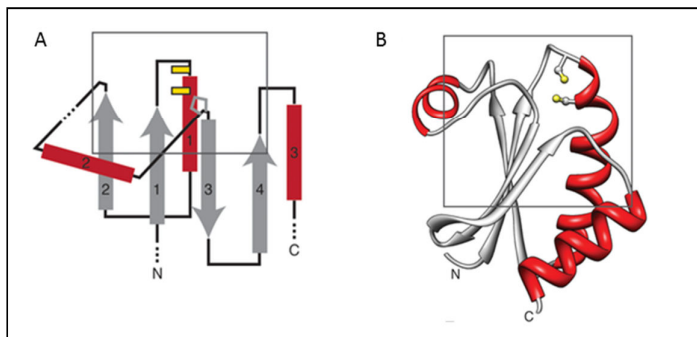


Fig. 4.2.1: Estructura básica de las glutaredoxinas. Representación del plegamiento del dominio tioredoxina. A) diagrama topológico mostrando las cuatro láminas beta intercaladas por alfa hélices. B) Ubicación de los residuos CXXC, en este ejemplo se resaltan los residuos C31 y C34 en la Trx2(PDB 1UVZ). Imagen tomada de (Atkinson y Babbitt, 2009).

Las Grxs monotiólicas fueron descubiertas en levaduras en primera instancia (Rodríguez-Manzanaque y col., 1999), pero en la actualidad se conoce de su presencia en organismos de todos los reinos. El análisis por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) contemplando los genomas ya secuenciados ha revelado la presencia de proteínas homólogas a las Grxs monotiólicas de *S. cerevisiae* en bacterias, hongos, protozoos, plantas y animales (Herrero y de la Torre-Ruiz, 2007). En la Fig. 4.2.2 se muestra un árbol filogenético en el que además de los residuos de cisteína, otra característica como es la arquitectura por dominios es tomada como criterio para su clasificación.

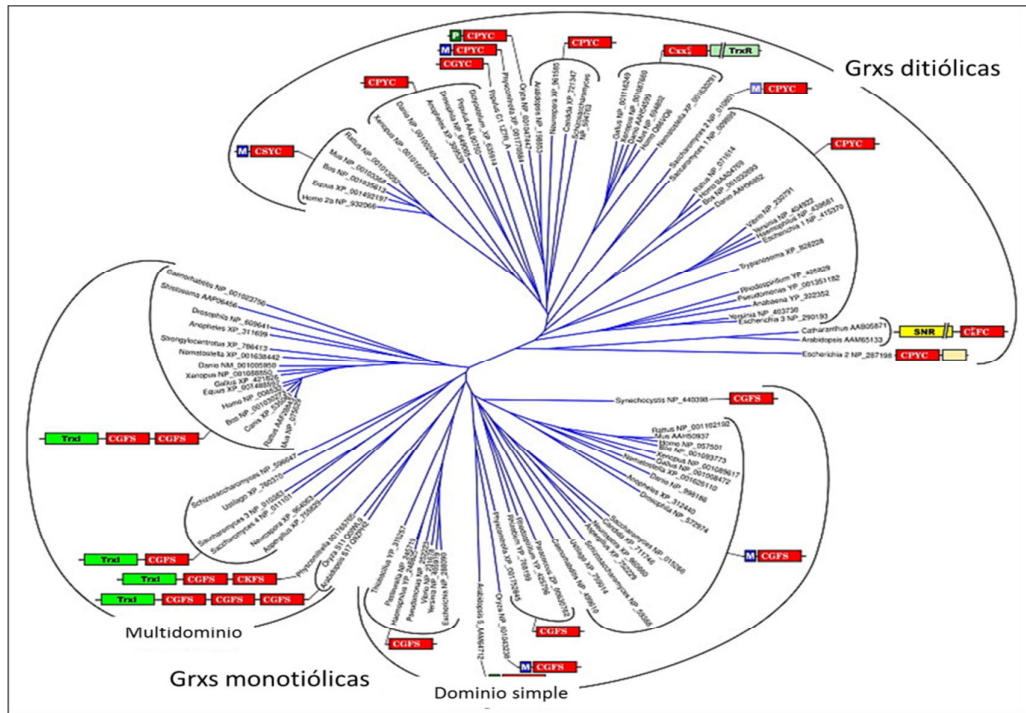


Fig. 4.2.2: Calsificación de las Grx en base a filogenia, residuos en el sitio activo y arquitectura por dominios. Los residuos en el sitio activo se encuentran en los recuadros rojos. M y P simbolizan péptidos señales a mitocondria y plástido, respectivamente. SNR sulfonucleótido reductasa. TrxI: tiorredoxina. TrxR tiorredoxina reductasa. Imagen adaptada de: (Lillig y col., 2008).

Esto se debe a que como se verá más adelante, muchas Grxs monotiolicas forman parte de proteínas multidominios. Este árbol filogenético representa en parte la gran diversidad de sitios activos que han sido encontrados en las diversas Grxs, en algunos organismos. Estas Grxs pueden existir, de acuerdo al organismo, como proteínas conteniendo el dominio Grx monotiólica, o también como arreglos multidominio, incluyendo un dominio Trx en el extremo N-terminal, y un dominio Grx monotiólica hacia el C-terminal. La Fig. 4.2.2 ejemplifica sobre las diferentes Grxs monotiolicas que pueden encontrarse en organismos diversos.

Dado que en *S. cerevisiae* existen técnicas que permiten la disrupción de genes de un modo relativamente simple, además del *background* de conocimiento a nivel genético y bioquímico que se tiene sobre estas levaduras, este organismo ha sido particularmente útil no solo en la elucidación de las funciones asociadas a las Grxs monotiolicas, sino también en el estudio de funcionalidad de los genes de otros organismos, mediante estrategias de expresión heteróloga. Así se ha llegado a establecer que muchas de las Grxs monotiolicas cumplen cruciales funciones en la biogénesis de clústeres de Fe/S, que son generalmente transferidos a otras proteínas integrantes de diversas vías

metabólicas para que estas puedan ser funcionales en sus actividades enzimáticas, por ejemplo en *T. brucei* (Filser y col., 2008). Estos hallazgos sentaron las bases para la investigación y asignación de esta función celular en el metabolismo del Fe por parte de las Grxs, tanto mono- como ditiólicas. Un ejemplo de la conformación de los clústeres en estas proteínas se muestra en la Fig. 4.2.3.

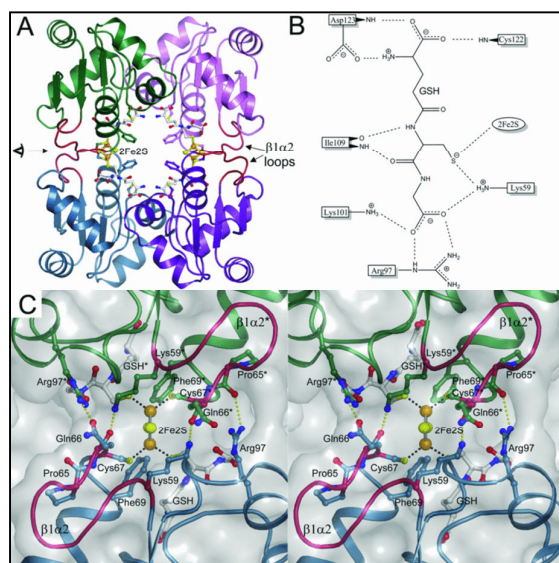


Fig. 4.2.3: Coordinación de un clúster de tipo 2Fe2S por las Grx5 monotiólica de *H. sapiens*. A) Tetrámero formado por las cadenas polipeptídicas en diferentes colores, mientras que el cluster se muestra en esferas amarillas y naranjas. B) Detalle de la interacción entre los residuos aminoacídicos en las cadenas y el GSH. C) Detalles de la coordinación del cluster, en líneas de puntos negros o amarillos se muestran la interacción entre residuos de las subunidades con el GSH o entre sí, respectivamente. Tomado de: (Johansson y col., 2010).

En *S. cerevisiae* existe una Grx5 de dominio simple, que se localiza en la mitocondria y que cumple funciones exclusivas, especialmente en el ensamblaje de Fe/S (Rodríguez-Manzaneque y col., 2002). Esta Grx monotiólica se encuentra bastante conservada en varios organismos, donde cumpliría similares funciones (Herrero y Torre-Ruiz, 2007). En tripanosomátidos se han identificado dos secuencias de Grxs monotiólicas que tendrían localización mitocondrial (Comini y col., 2013). Una de ellas, se ha denominado 1-C-Grx1 y ha sido previamente estudiada en *T. brucei*, y se ha comprobado que efectivamente se localiza en la mitocondria del parásito, y que es funcional en el ensamble de los clústeres de Fe/S (Filser y col., 2008; Manta y col., 2013). La otra Grx monotiólica (denominada 1-C-Grx2), se expresaría en la mitocondria de *T. brucei* y *T. cruzi*, según análisis *in silico*, sin embargo aún no se han publicado resultados sobre la caracterización bioquímica y funcional de esta. En *S. cerevisiae* se han encontrado además las denominadas Grx6 y Grx7, que según se ha demostrado tienen localización en el retículo endoplasmático de la levadura, exclusivamente (Mesecke y col., 2008c). Algunas de las propiedades bioquímicas de estas Grxs monotiólicas son bastante diferentes de las otras, por lo que se sugiere que los roles biológicos son diferentes y específicos (Mesecke y col., 2008c). Hasta el momento no

se encuentran reportes sobre la presencia de ortólogos para estas Grx de localización exclusiva en el retículo endoplasmático de tripanosomátidos.

4.2.1.2 Glutarredoxinas monotiólicas en proteínas multidominio

Las Grxs monotiólicas que se pueden encontrar en arreglos multi-dominio solo han sido detectadas en eucariotas, mientras que en procariontas solo se han encontrado Grxs monotiólicas de dominio simple. En la Fig. 4.2.4 se ilustra la composición de proteínas incluyendo dominios Grx monotiólica.

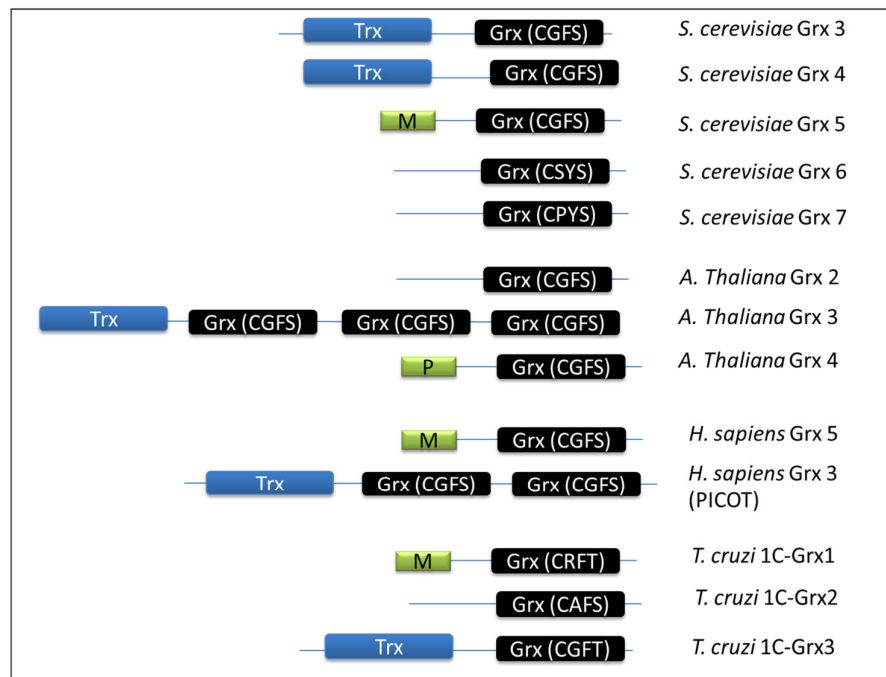


Fig. 4.2.4: Arquitectura de dominios en proteínas multidominio incluyendo glutarredoxinas monotiólicas. M y P indican secuencias de tránsito a mitocondria y plástidos, respectivamente. Algunas de estas han sido caracterizadas, y algunas no (como las de *T. cruzi*).

En el caso de la Grx3 humana, con una estructura Trx-Grx, luego de su descubrimiento fue llamada PICOT (*PKC interacting cousin of thioredoxin*), y por ese motivo a veces se encuentra que al dominio Grx monotiólica (en cualquier otro organismo) se lo suele llamar con este nombre. De hecho, esta Grx3 contiene dos dominios PICOT, mientras que en *Arabidopsis thaliana* se ha encontrado una proteína de este tipo conteniendo tres dominio Grx monotiólica.

En *S. cerevisiae*, son dos las Grxs que presentan este arreglo de dominio Trx-Grx monotiólica. Se trata de las Grx3 y Grx4, que se han encontrado localizadas tanto en

citoplasma como en núcleo de las levaduras, pese a no poseer señal de localización nuclear, entonces se especula sobre la relación entre el dominio Trx y la localización nuclear (Molina y col., 2004). Las funciones asociadas a estas Grx3 y Grx4 serían de transporte y señalización en relación a los niveles de hierro, funciones que se cumplen a través de su capacidad de formar clústeres de Fe/S (Rodríguez-Manzaneque y col., 1999; Ojeda y col., 2006). En tripanosomátidos, existen secuencias que codifican para una proteína con este tipo de arreglo de dominio, y que ha sido denominada 1-C-Grx3 en el caso de *T. brucei*. En este capítulo se comentan los resultados obtenidos en el marco del estudio abordado para la Grx monotiólica 1C-Grx3 en *T. cruzi*, especialmente en lo que refiere a sus propiedades como oxidoreductasa, su expresión en el parásito y las posibles funciones en las que podría estar involucrada.

4.2.2 Objetivo

Identificar y clonar el gen que codifica para una glutarredoxina monotiólica en *T. cruzi*, y caracterizar funcionalmente la proteína redox recombinante.

4.2.3 Resultados y discusión

4.2.3.1 Identificación de las secuencias que codifican para glutaredoxinas monotiolicas en *T. cruzi*

En el proyecto genoma de *T. cruzi* se identificaron varios genes que codifican para glutarredoxinas monotiólicas. De todos ellos, se seleccionaron dos, que codificarían para proteínas multidominio Trx-Grx. Se trata de los genes identificados como Tc00.1047053511179.100 (alelo correspondiente a la cepa esmeraldo-*like*) y Tc00.1047053508303.65 (alelo correspondiente la cepa no esmeraldo-*like*). En el alineamiento de la Fig. 4.2.5, se puede observar que entre las proteínas codificadas por cada gen existen algunas diferencias a nivel de estructura primaria.

Aunque inicialmente se persiguió como objetivo la caracterización de los productos de ambos genes, los resultados que se presentan en este capítulo refieren al estudio de las características de la proteína codificada por el gen Tc00.1047053511179.100, dado que no resultó posible aislar el gen Tc00.1047053508303.65.

Tc00.1047053511179.100	(1)	MVFFPSPFFHNDRELSCKKLSKAFIYIKKIHKMRVSSSLKEYNSLKEE
Tc00.1047053508303.65	(1)	MVFFPSPFFHNDRELSCKKLSKAFIYIKKIHKMRVSSSLKEYNSLKEE
Tc00.1047053511179.100	(51)	AGNGLGLVVHFSASWCEPCKNVGSMLEGLSQYNQKVLFAEVDADLVTV
Tc00.1047053508303.65	(51)	AGNGLGLVVHFSASWCEPCKNVGSMLEGLSQYNQKVLFAEVDADLVTV
Tc00.1047053511179.100	(101)	CEAENVECVPTVFFRTSLRERAQERVADVGGKLDHLEMNLVSLYNGH
Tc00.1047053508303.65	(101)	CEAENVECVPTVFFRTSLRERAQERVADVGGKLDHLEMNLVSLYNGH
Tc00.1047053511179.100	(151)	DTRESFPDLNEYLKYLTSRKGVVAFITGTPSRPKCGFTGRLVEIFYELGI
Tc00.1047053508303.65	(151)	DTRESFPDLNEYLKYLTSRKGVVAFITGTPSRPKCGFTGRLVEIFYELGI
Tc00.1047053511179.100	(201)	KFIYDVMASDEVCEGLKKYSEWPTYQVYVDGELIGGYDICSQKRESGE
Tc00.1047053508303.65	(201)	KFIYDVMASDEVCEGLKKYSEWPTYQVYVDGELIGGYDICSQKRESGE
Tc00.1047053511179.100	(251)	LKATLKH
Tc00.1047053508303.65	(251)	LKATLKH

Fig. 4.2.5: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas codificadas por los genes, Tc00.1047053511179.100 y Tc00.1047053508303.65 presentes en el genoma de *T. cruzi*.

Dado el sistema por el cual se han denominado a las Grxs en diferentes organismos, el grado de homología con la Grx3 tanto de *Homo sapiens* como en *S. cerevisiae*, y unificando con la nomenclatura adoptada para *T. brucei*, al producto proteico codificado por el gen Tc00.1047053511179.100 se lo denominará en adelante *Tcr-1C-Grx3*. En esta figura se ponen de relevancia los residuos correspondientes a los dominios (identificados por comparación en bases de datos) que componen esta proteína. Uno de ellos, ubicado en el extremo N-terminal, comprendido aproximadamente entre los aminoácidos en las posiciones 40 a 113, presenta homología con dominios pertenecientes a la familia de las tiorredoxinas. Por otra parte, la región que comprende los aminoácidos del extremo C-terminal, desde la posición 150, presenta homología con dominios glutarredoxinas monotiólicas. En la Fig. 4.2.6 se muestran alineamientos de la secuencia de la *Tcr-1C-Grx3* y secuencias de proteínas similares de otros organismos, algunas caracterizadas a nivel funcional, como es el caso de las de *S. cerevisiae*. Los casos de las proteínas ortólogas en levaduras, son consideradas casos paradigmáticos de proteínas multidominio. En el alineamiento se pueden observar residuos característicos de cada dominio, entre los que se destacan los que corresponden a cada sitio activo. En el dominio Grx monotiólica de la *Tcr-1C-Grx3* se pueden identificar además residuos que podrían estar involucrados en la unión a GSH, que no son absolutamente idénticos a los encontrados tanto en la Grx ditiólica estudiada en el capítulo siguiente, así como en las Grxs ditiólicas en general, aunque los residuos de T²²⁵ y P²²⁷ si se encuentran conservados. Las diferencias encontradas en los residuos del sitio de unión a GSH en algunas Grxs monotiólicas han sido en algunos casos consideradas las causas por las que muchas Grxs monotiólicas son incapaces de ser reducidas por GSH, y por lo tanto

no son activas en la reducción de disulfuros a través de este dominio. Aisladamente, este dominio presenta homología con Grxs monotiólicas de varios organismos, por ejemplo presenta un 22 % de identidad con la Grx3 de *Homo sapiens*, o un 25 % con la denominada Grx5 de *S. cerevisiae*. En comparación con los porcentajes de identidad encontrados para el dominio Grx monotiólica, el dominio identificado como tiorredoxina presenta porcentajes de identidad menores respecto a Trxs de diferentes organismos, como por ejemplo la Trx-1 humana o la de *E. coli*. Este dominio Trx se caracteriza por poseer un sitio activo compuesto por los residuos WCEPC, una particularidad que ocurre solo en algunos casos, ya que los dominios Trx en proteínas multidominio de este tipo suelen ser inactivos como reductasas justamente por carecer de uno o ambos residuos de cisteína en el sitio activo, como por ejemplo las Grx de *Homo sapiens* y las de *S. cerevisiae* que integran el alineamiento.

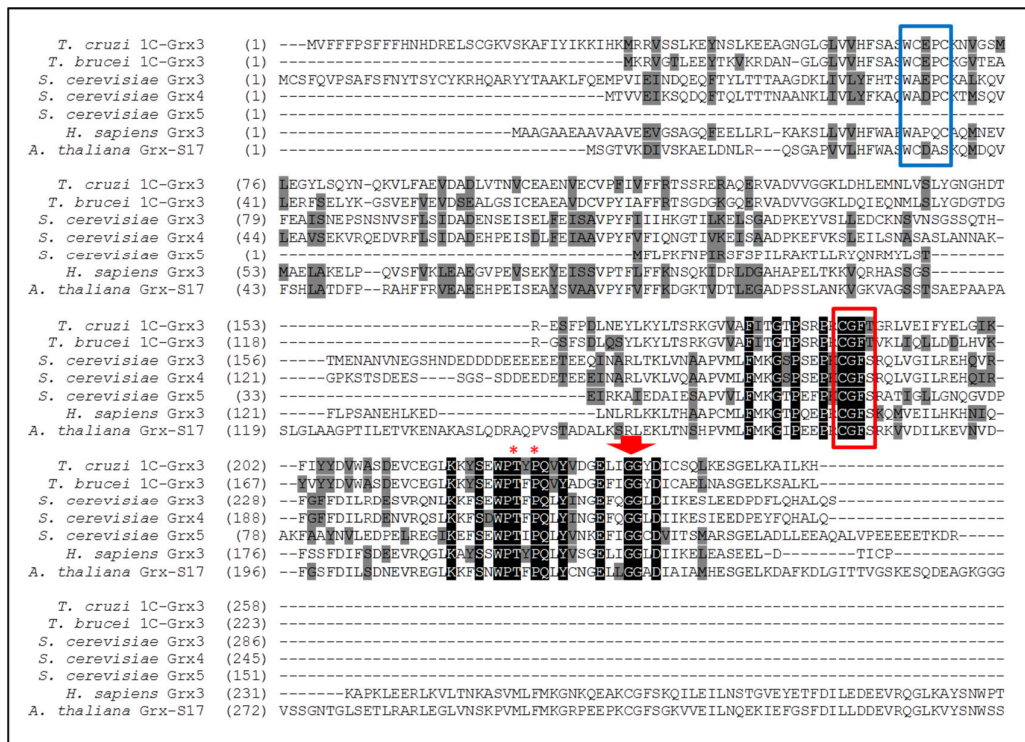


Fig. 4.2.6: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de proteínas multidominio tiorredoxina-glutarredoxina monotiólica presentes en diferentes organismos como *T. cruzi* (71425215), *T. brucei* (72388948), *S. cerevisiae* (Grx3, gi: 398365573; Grx4, gi: 398365087; Grx5, gi: 6325198), *H. sapiens* (gi: 315467838) y *A. thaliana* (gi: 15234516). Se encuentran resaltados en los recuadros azul y rojo los residuos que componen el sitio activo del dominio tiorredoxina y glutaredoxina, respectivamente. Con asteriscos se remarcan residuos que podrían intervenir en la unión a glutatión, e indicados con una flecha aquellos implicados en esta función que además se encuentran conservados en las glutaredoxinas ditiólicas.

Cabe destacar que los primeros 40 aminoácidos aproximadamente, no tienen homología con ninguna de las secuencias mencionadas o con otras secuencias probadas aunque no incluidas en los alineamientos. El tratamiento de esta secuencia con diferentes servidores informáticos no resultó en la identificación de un péptido señal que dirija la proteína a alguna localización determinada, como mitocondria, retículo endoplasmático, núcleo o anclaje a alguna membrana. No fue posible predecir mediante el análisis *in silico* cuál podría ser la relevancia de estos aminoácidos, sin embargo en tripanosomátidos existen varios casos de genes que son procesados vía *splicing* alternativo, que podrían avalar la especulación sobre alguna posible función de estos residuos. La proximidad de un residuo de metionina (aminoácido en la posición 35) también sugiere que este podría ser un sitio de inicio de la transcripción alternativo.

4.2.3.2 Aislamiento del gen Tc00.1047053511179.100 y obtención de la *TcrGrx3* recombinante

El gen identificado como Tc00.1047053511179.100 se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos, a partir de ADN genómico de *T. cruzi* CLBrenner. Para facilitar la obtención de la proteína recombinante, los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar la secuencia sin los primeros 102 nucleótidos, es decir los que codifican para los primeros 34 aminoácidos. Como resultado de la reacción se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (669 bp), cuya migración electroforética resultó comprendida entre los marcadores de 600 y 700 bp. El producto de esta PCR fue purificado y ligado al vector pGEM-TEasy. Acorde a la nomenclatura explicada anteriormente, e incluyendo la modificación que se realizó de la secuencia, el producto de esta PCR se denominó *Tcr-1C-Grx3Δ34N*.

Una vez corroborada la secuencia del gen amplificado, este fue subclonado en el vector pET28c. Se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) con la construcción pET28-*Tcr-1C-Grx3Δ34N*, y se realizaron cultivos de estas bacterias transformadas en medio TB con kanamicina, que se indujeron convenientemente con IPTG. Se realizó la purificación de la proteína a partir de los extractos del cultivo bacteriano, por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado, en este caso empleando una resina de IDA-Ni⁺², realizando la elusión con concentraciones crecientes de imidazol. Una vez identificadas las fracciones del eluato conteniendo la proteína *Tcr-1C-Grx3Δ34N*, se realizó un pool de soluciones, se diafiltró contra *buffer* Tris-HCl y se acondicionó con

glicerol para la conservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la Fig. 4.2.7 se muestra la fotografía de un PAGE en el que se sembró una alícuota de la solución de proteína obtenida luego de su purificación y acondicionamiento, que resultó con una migración electroforética acorde con el tamaño esperado (27 KDa). En la misma fotografía se muestra el perfil electroforético de la proteína luego de ser tratada con DTT o GSSG.

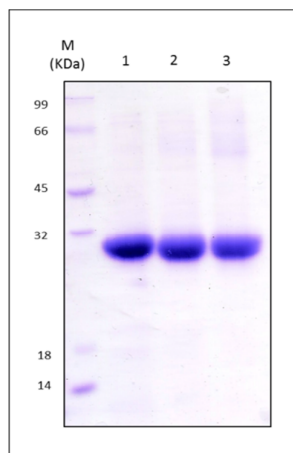


Fig. 4.2.7: Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS en condiciones no reductoras) de la *Tcr-1C-Grx3Δ34N*. M: Marcador de masa molecular. Calle 1: Proteína obtenida luego de la purificación y acondicionamiento. Calle 2 y 3: *Tcr-1C-Grx3Δ34N* tratada con DTT y GSSG (respectivamente).

Como se observa en esta figura, no se evidenciaron cambios prominentes en la movilidad de la proteína que pudiesen corresponder con la formación de estructuras oligoméricas, como se ha observado en otras Grx monotiólicas, por ejemplo el caso de la de *Taiwanofungus camphorata* (Ken y col., 2011), en la que las formas diméricas de la Grx monotiólicas son detectadas inmediatamente luego de la purificación de la proteína recombinante, aunque cuantitativamente la mayor parte existe como monómero. También se ha reportado en el caso de la Grx6 de *S. cerevisiae*, que ésta se encontraría principalmente como dímeros y tetrámeros, y que las formas diméricas no presentan hierro unido (Mesecke y col., 2008a). Similares resultados fueron reportados para la Grx monotiólica estudiada *T. brucei* (*Tbr1-C-Grx1*), que también formaría homodímeros. En el caso de esta Grx monotiólica de *T. brucei* se ha demostrado en corridas de SDS-PAGE no reductor su migración tanto como monómero como dímeros, aunque estos últimos en menor proporción (Filser y col., 2008).

4.2.3.3 Ensayos de caracterización cinética

La proteína recombinante obtenida como se describió en el apartado anterior, se analizó en ensayos cinéticos para comprobar sus características funcionales. Uno de los ensayos realizados tiene por objetivo la comprobación de la actividad tiol-transferasa, que podría ser llevado a cabo por el dominio Grx monotiólica, consistió en la reducción del

disulfuro mixto formado entre el HED y el GSH, y la reducción del dominio Grx monotiólica a expensas del GSH, siguiendo la oxidación de NADPH, como se muestra en la Fig. 4.2.8, en la que también se muestra la curva de velocidades obtenidas a diferentes concentraciones de la *Tcr-1C-Grx3Δ34N*, obtenida para este ensayo.

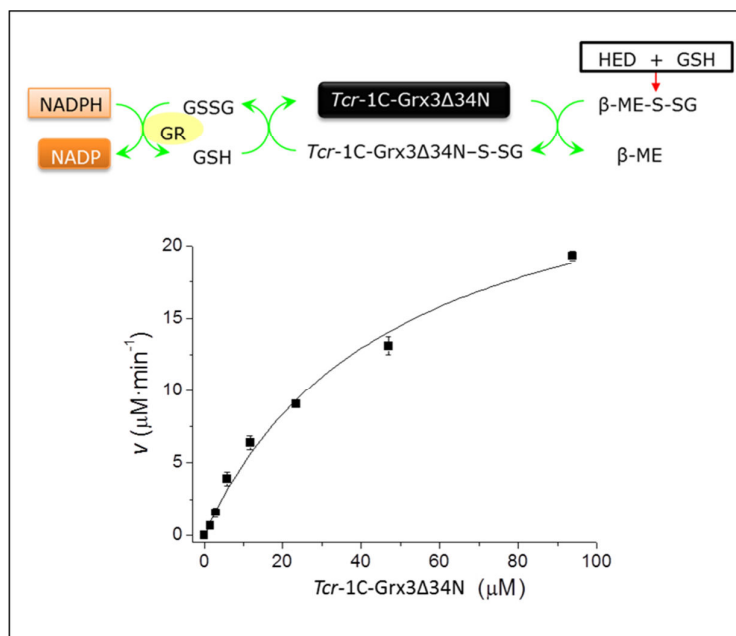


Fig. 4.2.8: Funcionalidad de la *Tcr-1C-Grx3* en la reducción de disulfuros mixtos. En la parte superior de la figura se muestra el esquema correspondiente al sistema de reacciones acopladas utilizado. Abajo, gráfica que representa la dependencia de la velocidad de oxidación del NADPH respecto de la concentración de *Tcr-1C-Grx3Δ34N*, en una mezcla de reacción conteniendo 1 mM HED, 3 mM GSH (además de los reactivos generales indicados en materiales y métodos) y cantidades variables de la Grx monotiólica.

El HED, la forma didisulfuro del β -mercaptoetanol (β -ME) es primero reducido espontáneamente por el GSH, para generar el disulfuro mixto β -ME-SG, que es un sustrato de muchas Grxs (Bushweller y col., 1992). Este disulfuro mixto puede ser blanco de la actividad tiol-transferasa de una Grx, a través del mecanismo monotiólico, como efectivamente se demuestra cuando se adiciona *Tcr-1C-Grx3Δ34N*, según se muestra en la Fig. 4.2.7. En la misma se puede corroborar que la velocidad de consumo de NADPH aumenta con la concentración de la *Tcr-1C-Grx3Δ34N*. Mediante esta reacción se estableció que existe un flujo de electrones desde el GSH hacia la *Tcr-1C-Grx3Δ34N*, para la reducción del HED. Este ensayo resultó de interés, ya que existen discrepancias entre diferentes Grx monotiólicas en su capacidad de llevar a cabo esta actividad. En los casos donde esta actividad está ausente, como por ejemplo en la Grx4

de *E. coli* (Fernandes y col., 2005), entre muchas otras, la falta de los residuos de unión a GSH es evidencia para justificar esta ausencia de actividad reductasa (Mesecke y col., 2008a; Ken y col., 2011). Asimismo, se ha demostrado que la *Tbr1C-Grx1* de *T. brucei* carece de esta actividad, incluyendo diversos reductores además de GSH en el sistema (Filser y col., 2008). En cambio otras Grxs monotiolicas como la Grx6 y la Grx7 de *S. cerevisiae* han resultado funcionales en el ensayo de reducción de HED (Mesecke y col., 2008a). Esta actividad reductasa también ha sido comprobada mediante ensayos *in vivo* empleando extractos de levaduras mutantes sobreexpresando alguna de estas Grx (Izquierdo y col., 2008). Las diferencias encontradas son puntos a tener en cuenta en la elaboración de hipótesis sobre las funciones que estas pueden cumplir en los organismos donde se encuentran, ya que las funciones más estudiadas en estas Grx suelen ser las relacionadas con el metabolismo del Fe y la formación de clústeres de Fe/S.

Algunas Grx monotiolicas son capaces de reducir GSSG, aun cuando no son activas en el ensayo del HED. Tal es el caso de la Grx4 de *E. coli* (Fernandes y col., 2005). En estos casos, en que la reducción de la Grx monitiolica por GSH no sería posible, se ha encontrado que la TrxR o la Grx1 (en el caso de *E. coli*), podrían ser las responsables de la transferencia de equivalentes de reducción (Fernandes y col., 2005). Se evaluó la capacidad de la *Tcr-1C-Grx3Δ34N* de reducir GSSG, una reacción de reducción previamente comentada para la Grx ditiolica, descrita en el capítulo siguiente. Para llevar adelante esta reacción, también se evaluó el consumo de NADPH en los sistemas acoplados que se muestran en la Fig. 4.2.9. Se evaluaron dos dadores de electrones para la *Tcr-1C-Grx3Δ34N*, el T(SH)₂ por un lado y por otro una tiorredoxina reductasa (TrxR) de *Babesia bovis* (*BboTrxR*), una TrxR que ha sido previamente evaluada en nuestro laboratorio en su capacidad de reducir Trxs de diferentes organismos (datos no publicados). En la Fig. 4.2.9 se muestran como quedarían conformados los sistemas acoplados en cada caso, y las velocidades de reacción observadas en cada sistema.

A partir de los datos representados en la Fig. 4.2.9 es posible concluir que no se detectó transferencia de electrones entre la *BboTrxR* y la *Tcr-1C-Grx3Δ34N* para la reducción de GSSG. Se pudo comprobar que la interrupción en la transferencia ocurrió a esta altura del sistema redox y no a nivel de la reducción del GSSG ya que recién al reemplazar T(SH)₂ en lugar de la TRXR, se pudo constatar el consumo del NADPH. Como se puede muestra en la Fig. 4.2.9, la velocidad de oxidación del NADPH se

incrementó con la concentración de *Tcr-1C-Grx3Δ34N*. De este ensayo se pueden inferir dos propiedades que refieren a la funcionalidad de la *Tcr-1C-Grx3Δ34N*: i) que posee la capacidad de reducir GSSG y ii) que el T(SH)₂ sería un reductor fisiológico para esta proteína.

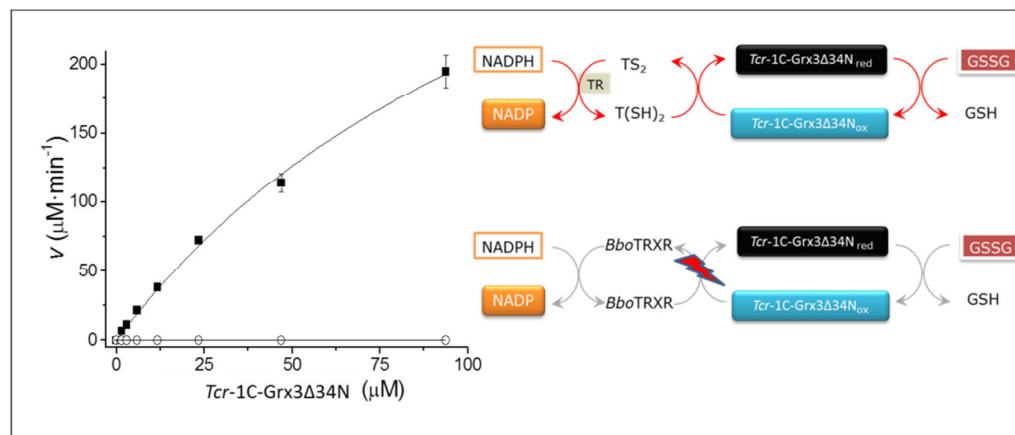


Fig. 4.2.9: Funcionalidad de la *TcrGrx3* en la reducción de GSSG. A la derecha se encuentran diagramados los sistemas de reacciones acopladas evaluados. A la izquierda, se encuentra la representación gráfica de la dependencia de la velocidad de oxidación del NADPH respecto de la concentración de *TcrGrx3Δ34N*, en el sistema acoplado en el que la *TcrGrx3Δ34N* sería reducida por: -■- T(SH)₂ (100 μM) ó -○- *BboTrxR* (5 μM), además de GSSG 1 mM y cantidades variables de la Grx monotiólica en ambos casos.

Muchas de estas Grxs monotiólicas (en proteínas simple o multidominio) son incapaces de llevar adelante esta reacción, sin embargo existen algunos casos en los que esta actividad está presente, como en el caso de la *Tcr-1C-Grx3Δ34N*. Por ejemplo se encontró en la Grx monotiólica del hongo *T. camphorata* (Ken y col., 2011), así como también en la Grx4 de *E. coli* (Fernandes y col., 2005). En otros casos, como el de la Grx monotiólica presente y caracterizada en *T. brucei*, la reducción tampoco pudo ser realizada mediante el empleo de una TrxR, como dador de electrones. En ese trabajo Filser y col. (Filser y col., 2008), se valen de una TrxR humana como sistema para reducir a esta Grx. Estos autores encontraron que el T(SH)₂ tampoco era un reductor para esta proteína, a diferencia de lo que se pudo corroborar para la *Tcr-1C-Grx3Δ34N*.

Esta *Tcr-1C-Grx3Δ34N* no resultó activa en la reducción de disulfuros en proteínas como *TcrTXNPx* o las *TcrGPx*, en reemplazo de la *TcrTXN* en sistemas acoplados, a expensas de T(SH)₂. En la Fig. 4.2.10 se esquematizan los sistemas acoplados estudiados, incluyendo la *Tcr-1C-Grx3Δ34N* en estudio.

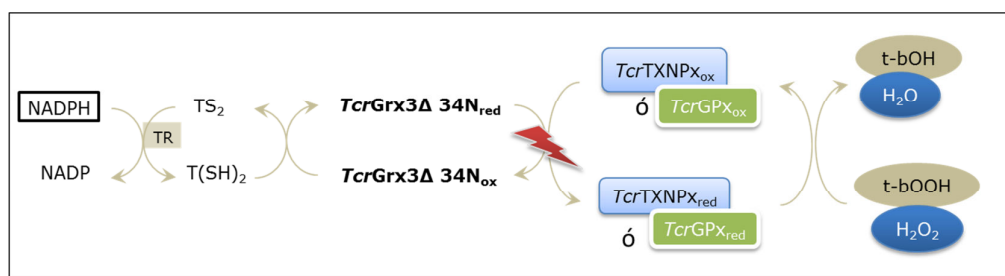


Fig. 4.2.10: Sistemas de reacciones acopladas, utilizados para estudiar la actividad disulfuro reductasa sobre proteínas. Midiendo el consumo de NADPH se analiza la reducción de peróxidos como el H_2O_2 , o el tert-butil-hidroperóxido (t-bOOH), mediado por peroxidasa como la triparredoxina peroxidasa (TXNPx) o la glutatión peroxidasa (GPx) de *T. cruzi*. Se incluyó un control en el que la *TcrGrx3Δ34N* fue reemplazada por *TcrTXNI*, para verificar la funcionalidad de los componentes del sistema.

Los resultados obtenidos en estos ensayos, podrían homologarse a los obtenidos en el estudio de actividades realizado sobre la 1-C-Grx1 en *T. brucei*, aunque los autores de este trabajo estudiaron esta actividad a través del ensayo de reducción de los disulfuros en la insulina. Por otra parte, otras Grxs como la Glp1 de *Plasmodium falciparum* ha mostrado actividad en el ensayo de reducción de insulina, aunque podríamos considerar que esta actividad no ha sido de una magnitud suficientemente alta como para ser considerada demasiado significativa (Rahlfs y col., 2001). A través de ensayos de este tipo, se ha podido atribuir actividad peroxidasa a algunas Grxs, especialmente las ditiólicas como la Grx1 y Grx2 de *S. cerevisiae* (Collinson y Grant, 2003), en estos ensayos se ha observado la transferencia de electrones desde el NADPH hacia el peróxido, mediante las Grx (1 y 2), independientemente de la presencia de otros mediadores, como alguna otra peroxidasa. Estas evidencias encontradas en otras Grxs, han motivado la necesidad de comentar sobre la presencia de esta actividad en muchos otros trabajos sobre glutarredoxinas. En el caso de la *Tcr-1C-Grx3Δ34N* estudiada en el marco de esta tesis, mediante los resultados observados durante la realización de este ensayo, se arriba a la conclusión de la carencia de la actividad peroxidasa en la *Tcr-1C-Grx3*, ya que no se ha observado consumo de NADPH, indicando que no se verifica flujo de electrones hacia el peróxido.

4.2.3.4 Expresión de *Tcr-1C-Grx3* en diferentes estadios de *T. cruzi*.

Localización subcelular

Se realizó el análisis de la expresión de la *TcrGrx3* por western blot, utilizando anticuerpos policlonales específicos contra la proteína trunca *Tcr-1C-Grx3Δ34N*. Los

extractos obtenidos de diferentes estadios (a partir de 10^7 parásitos en cada caso), epimastigotes, amastigote y tripomastigote se resolvieron por SDS-PAGE al 15 %, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos correspondientes en la etapa de western blot. Como resultado, se obtuvo una banda de reconocimiento acorde con la masa molecular esperada (27 KDa), en cada uno de los extractos analizados. En la Fig. 4.2.11 se muestran comparativamente los niveles de expresión en los estadios estudiados.

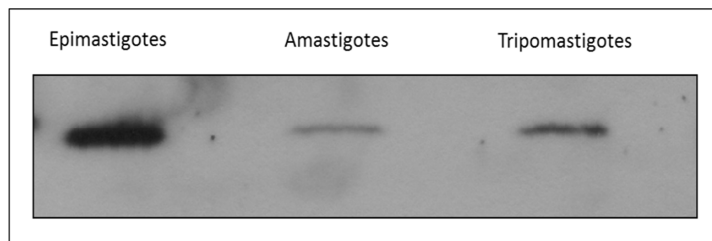


Fig. 4.2.11: Estudio de la expresión de la *Tcr-1C-Grx3* por ensayos de Western Blot. Evaluación de la expresión de la *Tcr-1C-Grx3* en extractos de 10^7 parásitos en los diversos estadios del parásito (epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes derivados de células). Luego de la incubación con los anticuerpos primarios (preparados a partir de la *Tcr-1C-Grx3* Δ 34N) y secundarios, el revelado se realizó por el método quimioluminiscente.

Se puede observar que si bien esta proteína multidominio se expresa en los tres estadios evaluados, el nivel de expresión es mayor en epimastigotes, respecto a los otros dos estadios. Esta diferencia en el nivel de expresión se correlaciona con el perfil relativo de transcripción informados para *T. cruzi* cepa Brasil, en el ensayo de transcriptoma publicado por Minning y col (Minning y col., 2009), en el que se puede observar que los niveles relativos de transcripción es mayor en epimastigotes respecto a los otros tres estadios analizados. Por otra parte, no se observa tan marcada diferencia en los niveles de expresión de la proteína en los estadios derivados de mamíferos (amastigotes y tripomastigotes sanguíneos). Cabe mencionar que mediante esta metodología no es posible discriminar cuál de los dos alelos es el que se está expresando, ya que el análisis *in silico* que se representó en la Fig. 4.2.5, evidencia que hay epitopes compartidos en las secuencias aminoacídicas codificadas por los genes Tc00.1047053511179.100 y Tc00.1047053508303.65.

Como se comentó anteriormente, el análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de esta *Tcr-1C-Grx3* no arroja indicios sobre la presencia de un péptido señal que dirija a

esta proteína multidominio a algún compartimiento membranosos o separado por membranas, como ocurre con otras Grxs monotiólicas del parásito. Por citar como ejemplo a otro organismo como *S. cerevisiae*, las dos proteínas con la misma composición de dominios que la *Tcr-1C-Grx3* objeto de este estudio, es decir las Grx3 y Grx4, se encuentran localizadas en el citosol de la levadura, aunque podrían ser translocadas al núcleo bajo ciertas condiciones (Ojeda y col., 2006). Como parte de este trabajo se propuso entonces realizar el estudio de localización subcelular de la *Tcr-1C-Grx3* en epimastigotes mediante co-inmunolocalización. Se fijaron epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c, se permeabilizaron y bloquearon convenientemente, y luego se incubaron simultáneamente con dos tipos de anticuerpos: anticuerpos anti- *Tcr-1C-Grx3* Δ 34N (obtenidos en conejo) y anticuerpos contra alguna proteína marcadora de localización subcelular (obtenidos en ratón). Los anticuerpos contra proteínas marcadoras empleados fueron anti-*TcrcTXNPx* (marcador de citoplasma), anti-*TcrmTXNPx* (marcador de mitocondria) anti-*TcrAPx* (marcador de retículo endoplasmático). Se emplearon simultáneamente anticuerpos anti-IgG de ratón o de conejo marcados con TRITC ó FITC, respectivamente. El ADN en núcleo y kinetoplasto de los parásitos se marcó con DAPI. Los preparados realizados de esta manera se analizaron por microscopía confocal, obteniéndose las figuras que se muestran en la Fig. 4.2.12.

En las microfotografías seleccionadas en la Fig. 4.2.12, se puede observar que la señal del FITC, que corresponde al reconocimiento del anticuerpo anti- *Tcr-1C-Grx3* Δ 34N se encuentra distribuido en el citoplasma de los epimastigotes, y efectivamente la señal co-localiza más adecuadamente con la que corresponde al marcador de citoplasma, que se interpreta de la señal de color amarillo que surge de la mezcla de las otras dos, roja y verde. En los preparados incubados con el anticuerpo anti-*TcrAPx*, se observa que la región donde se localiza la señal de color rojo, correspondiente a este marcador de retículo endoplasmático, no hay superposición completa con la señal correspondiente a la proteína en estudio, es decir la *Tcr-1C-Grx3*. Un análisis similar corresponde para el marcador de mitocondria.

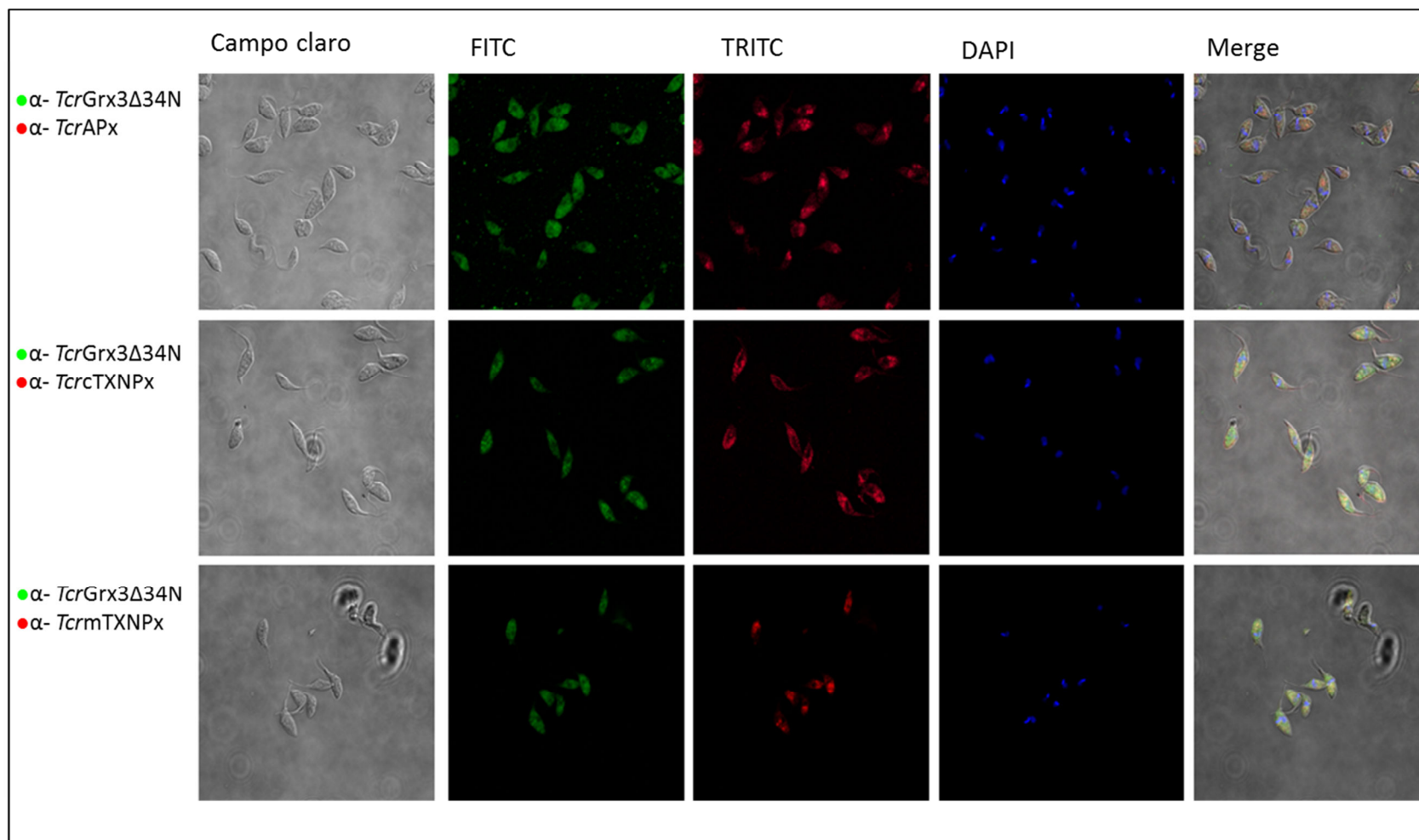


Fig. 4.2.12: Estudio de la localización subcelular de *Tcr*-1C-Grx3 por co-inmunolocalización. Microfotografías de fluorescencia confocal, correspondientes a campos seleccionados a partir de preparados de parásitos incubados con los anticuerpos contra la proteína *Tcr*-1C-Grx3 Δ 34N y luego separadamente con los anticuerpos anti- *TcrcTXNPx* (marcador de citoplasma), o anti- *TcrmTXNPx* (marcador de matriz mitocondrial), o anti- *TcrAPx* (marcador de retículo endoplasmático). Las imágenes correspondientes al canal azul muestran el ADN teñido con DAPI. En el canal verde se observaron las proteínas reconocidas por los anticuerpos *Tcr*-1C-Grx3 Δ 34N (empleando anticuerpos secundarios marcados con FITC). En el canal rojo se revelaron las proteínas reconocidas por los anticuerpos empleados como marcadores de organelas (empleando anticuerpos secundarios marcados con TRITC).

Los resultados obtenidos por esta metodología fueron corroborados por ensayos de extracción con digitonina, realizados de manera similar a lo que se describirá en el próximo capítulo para la *TcrGrx* ditiólica. Una localización citoplasmática para la *Tcr-1C-Grx3* es acorde además con los resultados del análisis *in silico*, en los que la secuencia aminoacídica no mostraría evidencias de una señal de localización hacia alguna organela, o dominios que podrían atribuirse al anclaje en sistemas de endomembranas. Esta localización citoplasmática también ha sido sugerida, aunque no se ha demostrado, en el caso de la proteína ortóloga en *T. brucei* (Comini y col., 2013). Para las otras Grxs monotiólicas (de dominio único) de *T. cruzi*, como el caso de la *Tcr-1C-Grx1* por ejemplo, el análisis *in silico* claramente sugiere una localización mitocondrial, acorde con lo demostrado para la ortóloga 1-C-Grx1 de *T. brucei*, y sugerido para la 1-C-Grx2 en ese parásito (Comini y col., 2013). Las diferentes localizaciones para diferentes Grxs monotiólicas, suscitan la hipótesis acerca de las funciones diferentes que podrían cumplir estas Grxs en estos tripanosomátidos.

4.2.3.5 Análisis fenotípico de cepas de *S. cerevisiae* expresando

Tcr-1C-Grx3

Dos versiones del gen Tc00.1047053511179.100 se clonaron en el vector p425 que se utiliza para la expresión en *S. cerevisiae*, y que permite la selección de las transformantes por complementación de auxotrofia por leucina. Las construcciones se utilizaron para transformar diversas cepas de levaduras, provenientes de la cepa denominada CML235 auxótrofa para leucina (entre otros), gentilmente cedidas por el Dr. Enric Herrero (Univ. De Leida, España). Las cepas de levadura derivadas de la CML235 son mutantes *knockout* en diversas Grxs monotiólicas, cuyas deleciones se encuentran indicadas en la Fig. 4.2.13. Por otra parte, las versiones del gen de la *Tcr-1C-Grx3* que corresponden a la secuencia completa (según consta anotada en la base de datos), y la otra versión corresponde a la secuencia a la que se han eliminado las bases que codificarían los primeros 34 aminoácidos, se subclonaron en el vector p425. Siguiendo con la nomenclatura adoptada en los ensayos de expresión recombinante, estas secuencias se denominaron: *Tcr-1C-Grx3c* y *Tcr-1C-Grx3Δ34N*. Tanto la cepa CML235 como las mutantes *knockout* de *S. cerevisiae* se transformaron con las construcciones realizadas. En la Fig. 4.2.14 se muestra un esquema de las construcciones obtenidas a partir del vector p425, y se indica esquemática y resumidamente el fenotipo de *S. cerevisiae* obtenido en cada caso.

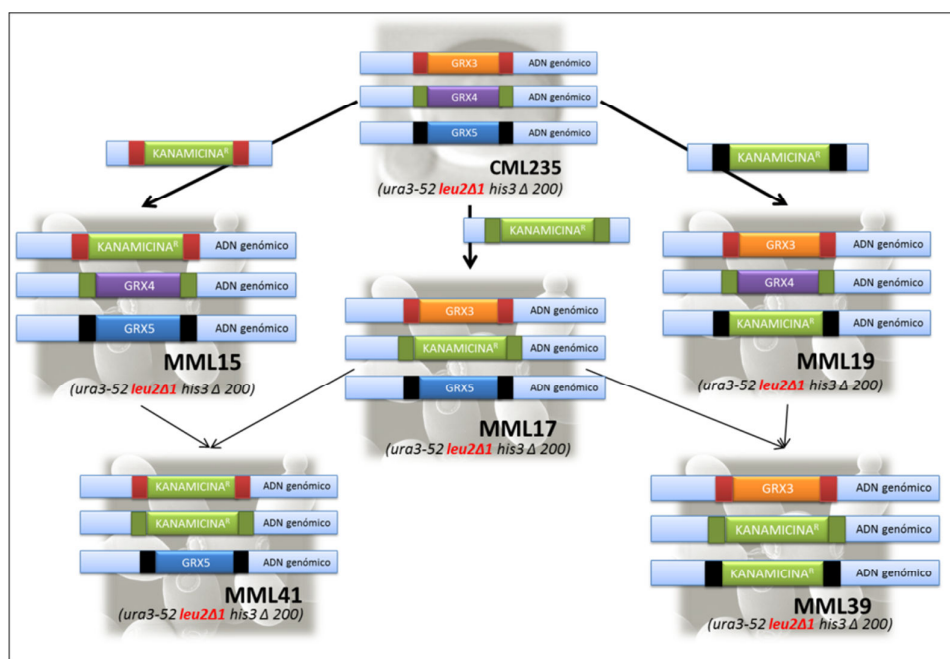


Fig. 4.2.13: Esquema en el que se explica la composición genómica y obtención de las diferentes cepas deficientes en glutaredoxinas monotiólica en *S. cerevisiae*.



Fig. 4.2.14: Construcciones en base al vector p425GPD empleadas para incorporar las versiones de la *TcrGrx3* en las diferentes cepas de levaduras deficientes en glutaredoxinas monotiólicas endógenas. Se indica la nomenclatura utilizada para la denominación de las cepas obtenidas luego de la transformación con la correspondiente construcción.

La selección de los clones de levadura portando cada una de las construcciones de interés se realizó por su capacidad de crecer en medio definido carente de leucina. Una vez obtenidas las cepas transformadas y luego de verificar la sobreexpresión heteróloga por ensayos de western blot, se realizaron algunos ensayos para estudiar el efecto de la expresión de este gen frente a diversas situaciones de relevancia fisiológica. Entre las pruebas realizadas se encuentra la de resistencia al estrés oxidativo generado por H_2O_2 . Los resultados más relevantes de las evaluaciones se muestran en la Fig. 4.2.15.

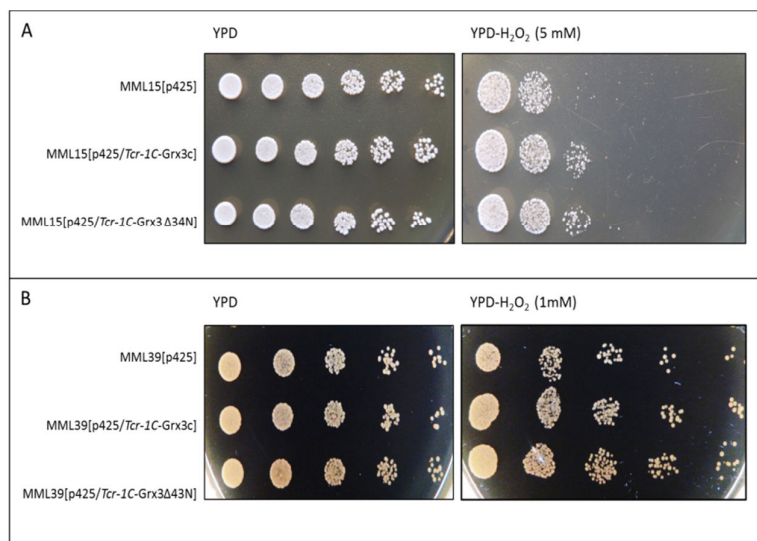


Fig. 4.2.15: Ensayos de sensibilidad a H_2O_2 en placas, en las cepas MML 15 (A) y MML 39 (B) transformadas con el vector p425 y las construcciones p425/Tcr-1C-Grx3 y p425/Tcr-1C-Grx3Δ34N. Se emplearon placas conteniendo medio sólido YPD suplementado con 5 (A) ó 1 (B) mM de H_2O_2 , los spots fueron sembrados con $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^3$, 800, 160 y 32 levaduras en total. Una vez inoculadas, se incubaron durante 48 hs a 28 °C.

En la Fig. 4.2.15 (A) se observan los resultados del desafío que resulta de la incubación con 5 mM de H_2O_2 sobre la cepa de *S. cerevisiae* MML15 (que carece de la Grx3). Como se observa, la cepa MML15 mostró sensibilidad frente a H_2O_2 , en tanto que la expresión de ambas versiones de la 1C-Grx3 de *T. cruzi* resulta en un grado de resistencia mayor al estrés oxidativo. Por otra parte, este efecto de protección frente al H_2O_2 no se observó en el caso de las cepas derivadas de la MML17 (*knockout* para la Grx4).

En tanto que en el caso de las derivadas de la MML41 (*knockout* para la Grx3 y la Grx4), MML19 (*knockout* para la Grx5) o MML39 (*knockout* para la Grx4 y Grx5) resultaron absolutamente incapaces de tolerar esta concentración de H_2O_2 , al menos en

las densidades correspondientes al inóculo sembrado en cada *spot*. Por este motivo, la tolerancia al estrés oxidativo en estas cepas se evaluó sobre placas conteniendo una cantidad menor de H₂O₂ (1mM). En la Fig. 4.2.15 (B) se puede observar que en los cultivos de la cepa MML39 existe una contribución moderada de la *Tcr-1C-Grx3c* y *Tcr-1C-Grx3Δ34N* a la resistencia frente al stress oxidativo generado por la presencia del peróxido.

Pujol-Carrión y col. determinaron que en las mutantes que carecen de Grx3 y Grx4 en *S. cerevisiae*, uno de los determinantes de la sensibilidad frente al estrés sería la acumulación de hierro (Pujol-Carrion y de la Torre-Ruiz, 2010). Por otra parte estos autores establecieron que ambas Grx monotiolicas multidominio están implicadas en la organización del citoesqueleto de actina en respuesta adaptativa frente al estrés oxidativo, así como también en condiciones normales (Pujol-Carrion y de la Torre-Ruiz, 2010). Es posible suponer entonces que más allá de la capacidad GSSG reductasa y de reducir disulfuros mixtos que se ha probado para la *Tcr-1C-Grx3Δ34N in vitro*, algunas de las funciones perdidas en las levaduras mutantes que carecen de la Grx3 o la Grx3 y Grx4 en *S. cerevisiae*, sean parcialmente cubiertas por la contribución de la *Tcr-1C-Grx3*.

Mediante el empleo de estas cepas *knockout* también se ha estudiado el efecto de los productos de los genes codificantes para *Tcr-1C-Grx3c* y *Tcr-1C-Grx3Δ34N* sobre las vías metabólicas de aprovechamiento de diversas fuentes de carbono. Estos estudios se valen de algunas características propias del metabolismo de *S. cerevisiae*, como por ejemplo el hecho de que la glucosa es una fuente de carbono y energía que puede metabolizarse tanto por la glicólisis acoplada al ciclo de Krebs y luego cadena respiratoria, como también por la vía fermentativa, que es independiente del ciclo de Krebs. Por otra parte, en esta levadura el glicerol puede ser utilizado como única fuente de carbono y energía (Turcotte y col., 2010), pero su aprovechamiento depende exclusivamente de la correcta funcionalidad del ciclo de Krebs, ya que se trata de una fuente no fermentable (Rodríguez-Manzaneque y col., 1999; Turcotte y col., 2010). Estas propiedades son aprovechadas para estudiar la funcionalidad de las enzimas del ciclo de Krebs, en este caso siendo de especial interés las que presentan clústeres de Fe/S en su estructura, y que a su vez dependen del correcto funcionamiento de los sistemas celulares que se encargan del ensamblaje o transporte de estos clústeres. Entre estos sistemas se encuentran las Grxs monotiolicas (Rodríguez-Manzaneque y col.,

2002), y por este motivo las cepas de levaduras *knockout* en algunas de estas Grxs son incapaces de crecer en medios a base de glicerol como fuente de carbono y energía, o lo hacen mucho más lentamente que las cepas *wild type* (Rodríguez-Manzaneque y col., 1999). Esta característica que ha sido empleada para evaluar la funcionalidad de Grxs monotiólicas de diversos organismos, incluida una de las de *T. brucei* (Filser y col., 2008). Sobre la base de estos antecedentes, se realizaron cultivos de las cepas de *S. cerevisiae* descritas en la Fig. 4.2.14 en medios definidos suplementados con glucosa o glicerol como fuente de carbono y energía. Como se observa en la Fig. 4.2.16, se observaron defectos en la proliferación en glicerol en los cultivos de la cepa doble *knockout* para las Grxs monotiólicas 3 y 4 de *S. cerevisiae* (MML41), y estos defectos no pudieron ser revertidos en ningún caso por la *Tcr-1C-Grx3c* o la *Tcr-1C-Grx3Δ34N*. Este defecto en la proliferación no se observó en los cultivos de las mutantes simple *knockout* correspondientes (Fig. 4.2.16).

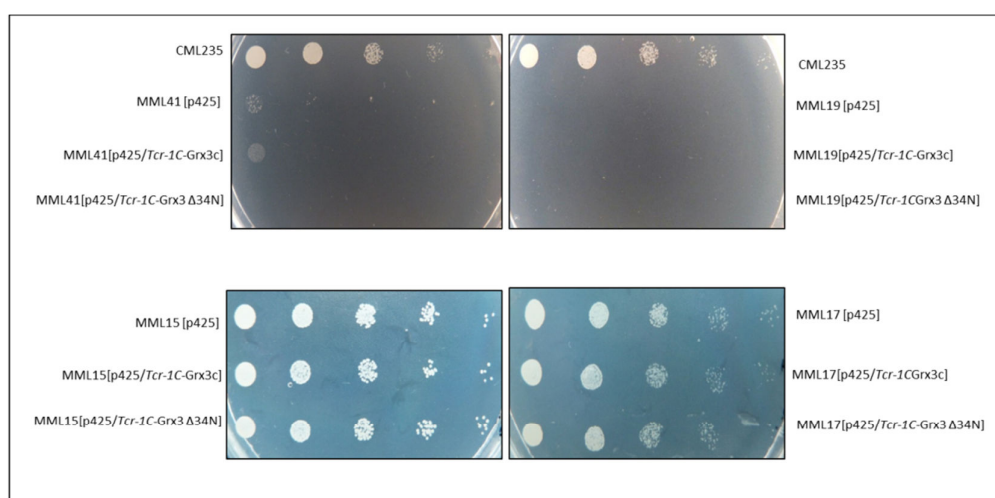


Fig. 4.2.16: Proliferación de las cepas de *S. cerevisiae* deficientes en glutaredoxinas monotiólicas, transformadas con el vector (p425) control o las construcciones p425/*Tcr-1C-Grx3* y p425/*Tcr-1C-Grx3Δ34N*, en medio de cultivo de composición definida conteniendo glicerol como única fuente de carbono. Los spots fueron sembrados con $25 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^3$, 200 y 40 levaduras en total. Una vez inoculadas, se incubaron durante 48 hs a 28°C.

Los resultados del ensayo de proliferación realizado sobre la cepa MML 19 (Fig. 4.2.16), indican que esta cepa no pudo proliferar en medio conteniendo glicerol, acorde a lo informado previamente en (Rodríguez-Manzaneque y col., 1999). Un resultado similar fue obtenido para la cepa doble mutante MML39, que carece de la Grx4 además de la Grx5. Asimismo, esta deficiencia no pudo ser revertida por ninguna de las versiones de la *Tcr-1C-Grx3* sobreexpresadas en la levadura. Estos resultados se

encuentran en concordancia con los reportados para la 1-C-Grx1 de *T. brucei*, aunque en ese caso el estudio se realizó sobre una cepa de *S. cerevisiae knockout* en la Grx5 únicamente (Filser y col., 2008).

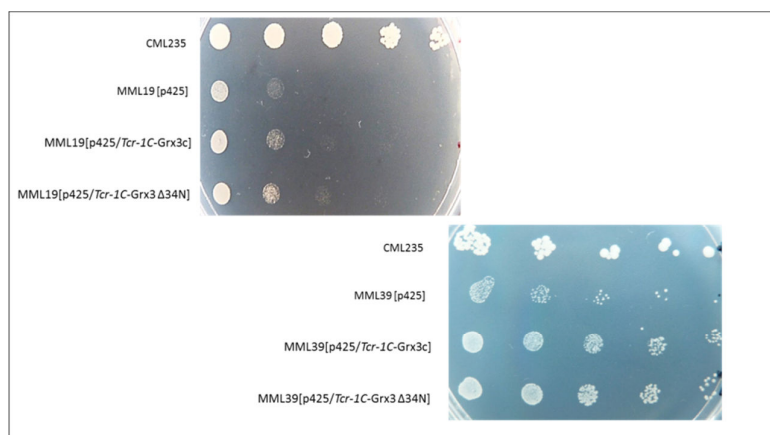


Fig. 4.2.17: Proliferación de las cepas de *S. cerevisiae* deficientes en glutarredoxinas monotiólica (Δ Grx5 o la doble mutante Δ Grx5 Δ Grx4), transformadas con el vector (p425) control o las construcciones p425/*Tcr-1C-Grx3* y p425/*Tcr-1C-Grx3* Δ 34N, en medio de cultivo de composición definida conteniendo glucosa como fuente de carbono. Los spots fueron sembrados con $25 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^3$, 200 y 40 levaduras en total. Una vez inoculadas, se incubaron durante 48 hs a 28°C.

Por otra parte, en los cultivos en medio definido conteniendo glucosa (Fig. 4.2.17), tanto en el cultivo de la cepa MML19 como en el de la cepa MML 39 (*knockout* doble en las Grx4 y Grx5), se pudieron observar ligeras diferencias que indican un efecto positivo de la *Tcr-1C-Grx3c* y la versión *Tcr-1C-Grx3* Δ 34N, sobre la proliferación de las levaduras, como se deduce del análisis de la Fig. 4.2.17.

Estas sutiles diferencias podrían deberse a un mayor aprovechamiento de la glucosa en el caso de las cepas que expresan la proteína multidominio de *T. cruzi*, que podría atribuirse a una funcionalidad diferencial de las vías metabólicas operativas en cada caso, y que podrían reflejar un modesto aumento en la actividad del ciclo de Krebs. Otras enzimas que también podrían verse afectadas por las modificaciones en los procesos que implican clústeres de Fe/S (ya sea la biosíntesis, el transporte o la detección los niveles de Fe), algunas están además involucradas en la síntesis de aminoácidos como la leucina, lisina y ácido glutámico (Herrero y Torre-Ruiz, 2007), enzimas de crucial importancia para la proliferación de las levaduras en medios mínimos. Estas observaciones constituyen antecedentes para el diseño de nuevos experimentos para la cuantificación de las actividades de enzimas dependientes de los

clústeres, como por ejemplo la aconitasa, que serán objetos de futuros estudios, continuando con la caracterización funcional de esta y otras Grxs monotiólicas en *T. cruzi*.

4.2.4 Conclusiones del Capítulo 2

En el genoma de *T. cruzi* CLBrener se han identificado secuencias correspondientes a genes que codifican para proteínas multidominio Trx-Grx, siendo el dominio Grx de tipo monotiólica. El gen que codifica para una de estas proteínas denominada *Tcr-1C-Grx3*, fue amplificado y clonado convenientemente. Mediante análisis *in silico* se ha determinado que los dominios que componen esta proteína contienen residuos aminoacídicos característicos de las actividades catalizadas, encontrados en proteínas similares. Una versión trunca de la proteína *Tcr-1C-Grx3*, denominada *Tcr-1C-Grx3Δ34N*, fue expresada de manera recombinante en un huésped procariota, convenientemente purificada y empleada en ensayos de caracterización cinética.

En ensayos cinéticos empleando la *Tcr-1C-Grx3Δ34N* recombinante se pudo establecer que esta proteína presenta actividad tioltransferasa, en ensayos donde se comprobó la reducción de HED y GSSG. Se comprobó que el T(SH)₂ es un reductor fisiológico para esta proteína. Por otro lado se evaluó un reductor no fisiológico, una TrxR de otro parásito, en un ensayo en el que no se corroboró la transferencia de electrones hacia la proteína multidominio. En ensayos de reducción de disulfuros en proteínas pertenecientes al metabolismo redox de *T. cruzi* se constató que la *Tcr-1C-Grx3Δ34N* recombinante no transfiere electrones para la reducción de este tipo de disulfuros. Los datos obtenidos en los análisis cinéticos sugieren que las reacciones de óxidoreducción evaluadas podrían estar siendo catalizadas principalmente por el dominio Grx monotiólica. Futuros ensayos deberán planificarse para profundizar el análisis de la funcionalidad del dominio Trx en esta proteína multidominio, incluyendo otros posibles reductores fisiológicos.

Mediante ensayos de co-inmunolocalización realizados utilizando preparados de epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c, se pudo establecer que esta proteína multidominio ocuparía una ubicación citoplasmática. La *Tcr-1C-Grx3* se expresaría en todos los estadios del parásito, aunque un mayor nivel se evidenció en el estadio epimastigote.

La funcionalidad de este gen fue analizada a través de ensayos de complementación en levaduras, mediante los que se observaron solamente efectos moderados, por ejemplo de protección frente al estrés oxidativo en el caso de las cepas de *S. cerevisiae* carentes de las Grx3 monotiólica y la doble mutante Grx5 y Grx4. Los defectos en el crecimiento asociados a la pérdida de las funciones relacionadas con el ensamblaje de clústeres de Fe/S, llevados adelante por la Grx5 en levaduras, fueron sutilmente compensados por la *Tcr-1C-Grx3*. Nuevos experimentos serán planificados para evaluar *in vitro* las funciones de la *Tcr-1C-Grx3* en el ensamblaje de los clústeres de Fe/S, así como también ensayos de sobreexpresión en *T. cruzi*, con el fin de profundizar en el estudio de las funciones de esta proteína multidominio en el marco de las vías metabólicas del parásito.

4.3 Capítulo 3. Caracterización de una Grx ditiólica en *T. cruzi*

4.3.1 Introducción al Capítulo

4.3.1.1 S-glutationilación de proteínas

La modificación postransduccional de proteínas denominada s-glutationilación consiste en la presencia de un disulfuro mixto formado entre un tiol (usualmente de bajo pK_a) de la proteína y una molécula de glutatión (Giustarini y col., 2004; Dalle-Donne y col., 2007). Inicialmente se suponía que esta modificación ocurría en situaciones en que la célula se encontraba en situación de estrés oxidativo y por lo tanto el entorno de la proteína sería oxidante y en presencia de altas concentraciones de GSSG (Lillig y col., 2008; Dalle-Donne y col., 2009). Luego se encontró que en situaciones normales, una proporción relativamente alta del glutatión en la célula, por ejemplo en células hepáticas, podían encontrarse formando estos disulfuros mixtos con proteínas (Brigelius y col., 1983; Lillig y col., 2008; Dalle-Donne y col., 2009). La s-glutationilación de proteínas puede ocurrir por varios mecanismos, los cuales se encuentran representados en la fig 4.3.1, y que pueden involucrar formas intermediarias de la proteína. La reversibilidad de este tipo de oxidación y la especificidad son características claves que definen a este tipo de modificación postransduccional como candidata a los fines regulatorios. Estos disulfuros mixtos no son estructurales, y difieren de los disulfuros en proteínas que si son generalmente estructurales, en que son reversibles. La s-glutationilación puede ser revertida y por lo tanto regulada por medio de reacciones de intercambio tiol-disulfuro, que pueden ser catalizadas por Grxs. La reversión puede también ocurrir por reacción directa con GSH, pero esta reacción es generalmente mucho menos eficiente que la catalizada por Grx. Respecto a la especificidad, no todos los tioles en las proteínas son susceptibles a la oxidación (de cualquier tipo). Varios son los factores implicados en la susceptibilidad, siendo los dos más importantes la accesibilidad al tiol y su reactividad, relacionada con el pK_a y a su vez con los residuos circundantes a nivel de la estructura secundaria (Dalle-Donne y col., 2008).

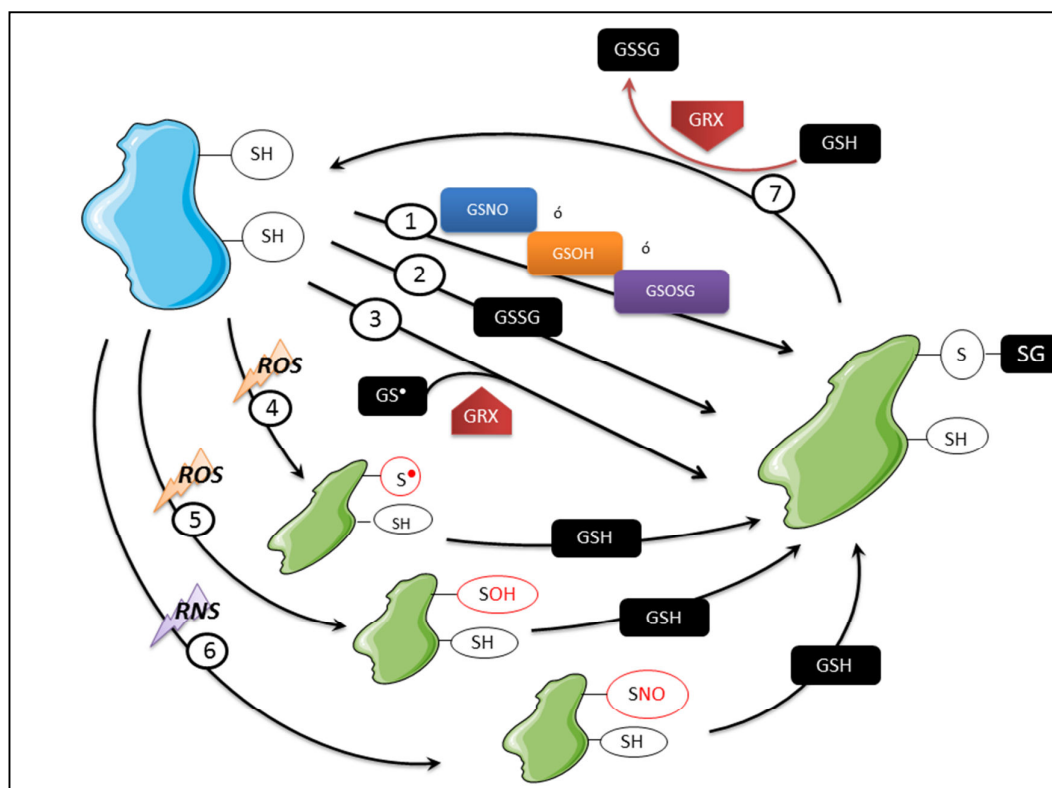


Fig. 4.3.1: Mecanismos de (de)glutacionilación de proteínas. En 1 y 2: Oxidación directa por formas oxidadas del glutatión como el disulfuro (GSSG), el s-nitrosoglutatión (GSNO), ácido sulfénico (GSOH), disulfuro s-monóxido [GS(O)SG]. 3y4: Vías que implican formación previa de radical tiolo (oxidación por mecanismo de un electrón), ya sea del tiol de la proteína (reacción 3), como del glutatión (reacción 4). 5 y 6: Mecanismo que involucra la formación de un ácido sulfénico intermediario (reacción 5) o la especie nitrosilada (reacción 6) en el tiol por acción oxidante de ROS o RNS respectivamente. 7: Mecanismo de deglutacionilación catalizado por glutarredoxinas.

Han sido propuestos tres grupos de funciones para esta modificación de proteínas, relacionadas con: i) la protección de tioles, ii) la regulación redox de la actividad enzimática y iii) la señalización redox.

i) En el caso de la condición de estrés oxidativo, la s-glutacionilación ha sido propuesta como un mecanismo de protección de los tioles sensibles de la oxidación irreversible y también como un mecanismo de almacenamiento de GSH, ya que en ciertos tipos celulares (como las células de mamíferos) el GSSG generado por la oxidación es exportado de la misma (Dalle-Donne y col., 2008).

ii) A través de la modificación específica de una proteína target, la s-glutacionilación resulta en cambios funcionales (activación o desactivación) de su actividad enzimática. Así por ejemplo, la s-glutacionilación puede coordinar el metabolismo celular en respuesta al estrés oxidativo modulando la glicólisis, a través de la modulación de actividades de enzimas de la vía glicolítica como la piruvato kinasa,

aldolasa, gliceraldehído 3-P deshidrogenasa, etc. (Cotgreave y col., 2002; Fratelli y col., 2003; Dalle-Donne y col., 2007).

iii) La s-glutathionilación específica de una proteína mediadora involucrada en un proceso de señalización puede regular directa o indirectamente un determinado evento celular como el crecimiento, la diferenciación o la apoptosis. Así, muchas proteínas kinasas son glutathioniladas y de este modo cambia el modo en que pueden interactuar con sus *targets* específicos. En otro caso, la s-glutathionilación estaría implicada en la vía de señalización que protege a la célula de la apoptosis en condición de hipoxia, siendo el factor nuclear NF- κ B el blanco de glutathionilación involucrado (Qanungo y col., 2007).

4.3.1.2 Glutarredoxinas ditiólicas

En el capítulo anterior se comentó que, de acuerdo a la composición de residuos en el sitio activo, las Grxs pueden clasificarse en mono- o ditiólicas. En las Grx ditiólicas el sitio activo está compuesto por dos residuos de cisteína, por ejemplo las Grx ditiólicas denominadas “clásicas” poseen un sitio activo conformados por los residuos CPYC.

Han sido descritos dos mecanismos de reacción para las Grxs, utilizando ambos residuos de cisteínas de su sitio activo (solo posible en las ditiólicas), es decir siguiendo un mecanismo ditiólico, o un mecanismo monotiólico (Lillig y col., 2008; Gallogly y col., 2009). Estos mecanismos se representan gráficamente en la Fig. 4.3.2. Para la reducción de disulfuros proteicos, es preciso que la Grx involucre ambos residuos de cisteína de su sitio activo. En cambio, para catalizar las reacciones de reducción de disulfuros mixtos, es decir la deglutathionilación, si bien podría usar ambos mecanismos, el monotiólico puede ser suficiente.

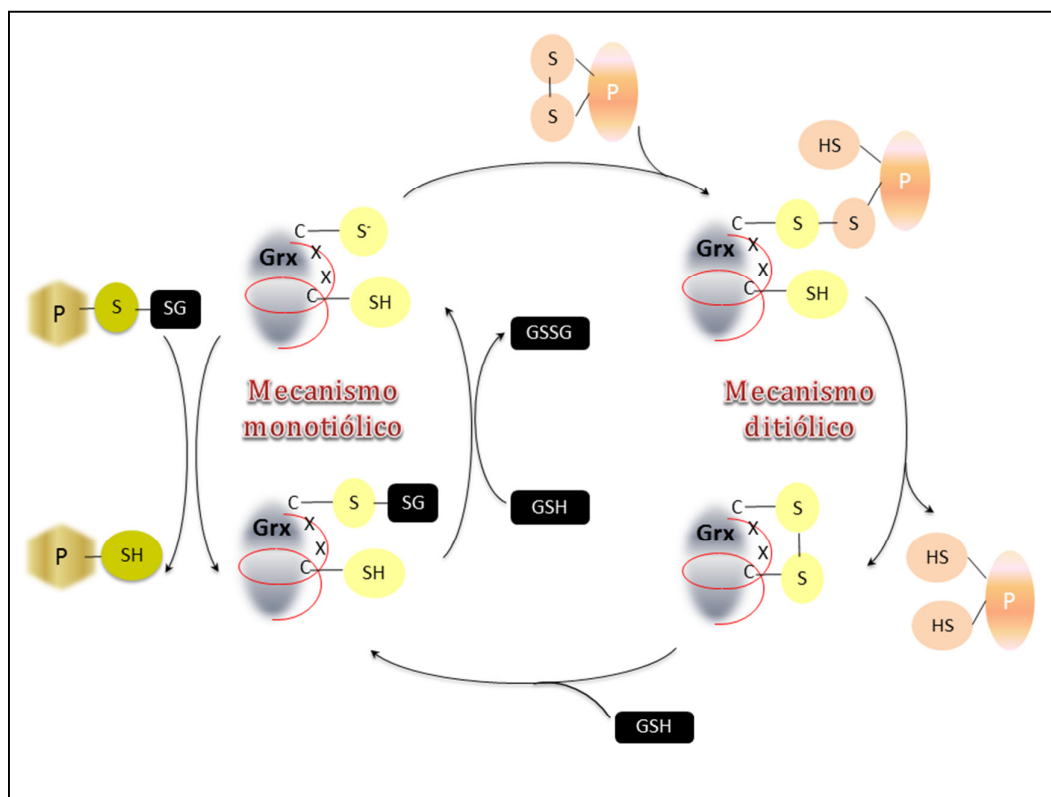


Fig. 4.3.2: Mecanismos de reacción de las glutarredoxinas. La reducción de disulfuros de proteínas se lleva a cabo por el mecanismo que emplea ambas cisteínas del sitio activo. Por otra parte, la reducción de disulfuros mixtos con glutatión requiere solo de la cisteína N-terminal.

Entonces la versatilidad de las Grxs como oxidorreductas radica en la posibilidad de reducir una variedad de sustratos. En este sentido, algunas Grxs ditiólicas comparten funciones con las Trx, y un claro ejemplo de esto se encuentra en el hallazgo de la Grx de *E. coli*, la primera en ser estudiada (Lillig y col., 2008). La actividad de esta Grx resultó capaz de reemplazar a la de la Trx en la reducción de la ribonucleótido reductasa en esta bacteria. Con la caracterización de Grxs de otros organismos, se encontró que no todas son capaces de realizar las mismas funciones. En términos generales, las Grxs pueden ser activas en la reducción de dehidroascorbato (Lillig y col., 2008), en la reducción de puentes disulfuros (intramoleculares) en proteínas, pero la actividad más generalizada es la reducción de disulfuros mixtos con el GSH, es decir en la deglutationilación (Dalle-Donne y col., 2007). Algunas Grxs ditiólicas, y como se mencionó anteriormente una gran proporción de las monotiólicas, también pueden participar en la formación de clústeres de Fe/S, y de este modo participan a varios niveles en la homeostasis del Fe así como también en el correcto ensamblaje de

proteínas que requieren de estos clústeres para su función (Lillig y col., 2008; Rouhier y col., 2010).

Fundamentalmente a razón de su vinculación con la s-glutationilación de proteínas, la investigación de los sistemas vinculados a las Grxs ha progresado rápidamente, en estudios que analizan su implicancia en áreas tan diversas como la salud, la productividad vegetal y la evolución, por ejemplo (Giustarini y col., 2004; Dalle-Donne y col., 2008; Rouhier y col., 2010; Zaffagnini y col., 2012). En el caso de los tripanosomátidos, existen en sus genomas genes que codifican para Grxs (tanto di- como mono- tiólicas) (Marquez y col., 2010; Comini y col., 2013).

En el marco de este trabajo, se presenta la identificación y caracterización de una Grx de *T. cruzi*, y a través de estudios de funcionalidad *in vivo*, cuáles podrían ser las implicancias de esta tioltransferasa en diferentes procesos fisiológicos relevantes en diferentes estadios de la vida de este parásito.

4.3.2 Objetivo

Identificar y clonar, en *T. cruzi*, el gen que codifica para una glutarredoxina ditiólica y caracterizar funcionalmente a la glutarredoxina ditiólica recombinante. Estudiar las reacciones en las que esta glutarredoxina, en *T. cruzi*, está involucrada.

4.3.3 Resultados y discusión

4.3.3.1 Identificación y análisis de las secuencias de los genes codificantes para una glutarredoxina ditiólica en *T. cruzi*

Las secuencias nucleotídicas que codifican para una posible glutarredoxina ditiólica fueron identificadas en el proyecto genoma de *T. cruzi*, mediante la búsqueda en la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>), registradas como Tc00.1047053506475.116 y Tc00.1047053511431.40. Ambas secuencias serían haplotipos (alelos), Tc00.1047053506475.116 corresponde al haplotipo proveniente del linaje no Esmeraldo-*like* (ubicado en el cromosoma 9 “P”), mientras que Tc00.1047053511431.40 corresponde al alelo proveniente del linaje Esmeraldo-*like* (ubicado en el cromosoma 9 “S”). Ambas secuencias nucleotídicas poseen una longitud de 324 bp y se encuentran anotadas como putativas glutarredoxinas. Luego de realizar la traducción *in silico* de las mismas, fue posible verificar que ambas secuencias de nucleótidos codifican para la misma cadena polipeptídica, de 107 aminoácidos. En la

Fig. 4.3.3 (A), se puede observar un alineamiento de las secuencias nucleotídicas y en la 4.3.3 (B) el alineamiento de las secuencias aminoacídicas.



Fig. 4.3.3: A) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para Grxs ditiólicas identificadas en la base de datos del genoma de *T. cruzi*. B) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas codificadas por los genes Tc00.1047053506475.116 y Tc00.1047053511431.40, presentes en el genoma de *T. cruzi*.

En la Fig. 4.3.4 se muestra un alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a la glutarredoxina ditiólica de *T. cruzi* (*TcrGrx*), las glutarredoxinas ditiólicas identificadas y caracterizadas en otros organismos como *T. brucei*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* y *Populus trichocarpa*.

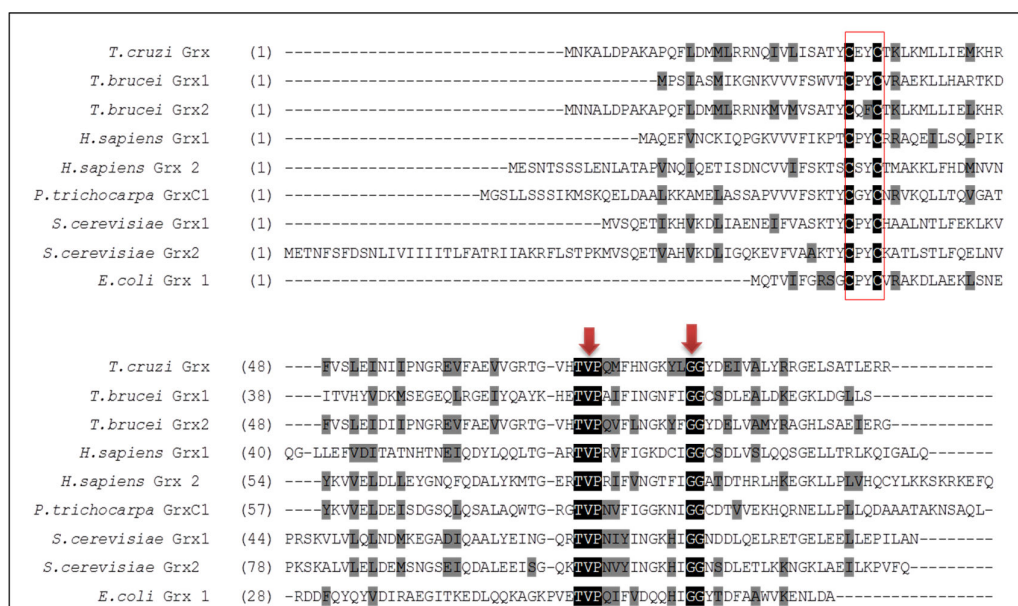


Fig. 4.3.4: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de glutaredoxinas ditiólicas de diferentes organismos, como la *T. cruzi* (GI:71657367), las de *T. brucei* (GI:315133333 y GI: 315133335), las de *S. cerevisiae* (GI: 6319814 y GI: 6320720) las de *H. sapiens* (GI: 169646776 y GI: 530364853), la GrxC1 de *Populus trichocarpa* (GI: 224135835) y la Grx1 de *E. coli* (GI: 16128817).

En este alineamiento de secuencias fue posible identificar dos grupos destacados de residuos aminoacídicos relacionados con las propiedades de esta oxidoreductasa: i) los residuos correspondientes al sitio activo y ii) los que componen el sitio de unión a glutatión.

I) El sitio activo de la *TcrGrx*, compuesto por los residuos CEYC. La cisteína N-terminal (la C en posición 31, en el caso de *TcrGrx*), como en otros miembros de la familia tiorredoxina, es la cisteína reactiva o nucleofílica (Lillig y col., 2008). Uno de los factores que determinan la reactividad de este residuo es el bajo valor de pK_a , menor que el de la cisteína libre, por lo que a pH fisiológico, generalmente cercano a 7, esta cisteína se encuentra en la forma de anión tiolato (Discola y col., 2009). El sitio activo descrito como canónico para las Grxs estudiadas en muchos microorganismos, llamadas “clásicas” (Lillig y col., 2008), está generalmente compuesto por los residuos CPYC, por lo que esta Grx de *T. cruzi* podría considerarse dentro de las atípicas o no clásicas desde este punto de vista. Respecto de las glutaredoxinas que poseen el sitio activo canónico, se ha establecido que el residuo de Pro favorece la estabilidad del anión tiolato formado por la cisteína N-terminal. El residuo de tirosina, ubicado en la posición 33 en la secuencia de la *TcrGrx*, también estaría vinculada a la estabilización

del anión tiolato, a través de la formación de puentes de hidrógeno (Johansson y col., 2007). La cisteína en posición 34 es generalmente denominada cisteína resolutive, en el sitio activo de proteínas de la familia de las tiorredoxinas. Como se mencionó en la introducción, esta cisteína es necesaria para la reducción de disulfuros intramoleculares que ocurre por el mecanismo ditiólico, pero no es esencial para la función de las glutarredoxinas por el mecanismo monotiólico, común a todas las Grx (Lillig y col., 2008).

II) El grupo de residuos alrededor de la posición 75, comprenderían el denominado sitio de unión al glutatión (consenso: TVP y GG). En esta región, se establecen interacciones no covalentes entre la Grx y el motivo glutatión por ejemplo presente en un disulfuro mixto formado con una proteína. Este sitio ha sido reconocido en otras enzimas dependientes de GSH como por ejemplo la glutatión peroxidasa de varios organismos (Holmgren, 1985).

4.3.3.2 Aislamiento de los genes codificantes para la *TcrGrx*

El gen que codifica para la *TcrGrx* se obtuvo por PCR, utilizando ADN genómico de *T. cruzi* CLBrenner, oligonucleótidos específicos y condiciones que se indican en el apartado de materiales y métodos. Como producto de la reacción de PCR, se obtuvo un amplicón de un tamaño ligeramente superior a 300 bp, acorde con el tamaño de los genes que codifican para la *TcrGrx* (324 bp). Este producto fue convenientemente purificado, clonado en el vector pGEM-Teasy y remitido para su secuenciación. Mediante este procedimiento pudo establecerse que el amplicón correspondió al gen Tc00.1047053506475.116, y dado que las secuencias de ambos genes codifican para la misma proteína se continuó trabajando con este gen únicamente.

El gen de la *TcrGrx* fue subclonado en el vector pRSET-A, y células de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con la construcción pRSET-*TcrGrx* para la expresión de esta proteína recombinante como fusión a un tag de 6 histidinas. Mediante ensayos de expresión a pequeña escala, se evaluaron condiciones de cultivo e inducción, pudiéndose establecer las más adecuadas como se indicó en el apartado de materiales y métodos. Para producir la proteína recombinante, se realizó un cultivo a mediana escala (500 mL) de la cepa *E. coli* BL21 (DE3)/ pRSET-*TcrGrx*, inoculado a una DO_{600nm} de 0,1, al que se indujo por el agregado de IPTG hasta una concentración final 0,5 mM incubando el cultivo en estas condiciones por 16 hs a 24 °C. Luego de cosechar las

células, éstas se sometieron a ruptura por sonicación, y la proteína se purificó por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) empleando una resina de IDA-Co²⁺. Las fracciones eluidas se sometieron a PAGE-SDS (Fig. 4.3.5) y aquellas conteniendo la *TcrGrx* fueron unificadas en un mismo *pool* proteico y sometidas a diafiltración contra buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,5 se adicionó glicerol 20 % y se conservó a -80 °C. La proteína recombinante se obtuvo con un elevado grado de pureza (Fig. 4.3.5), y un rendimiento de 373 µg.L⁻¹, establecido por cuantificación a través del método de Bradford (Bradford, 1976).

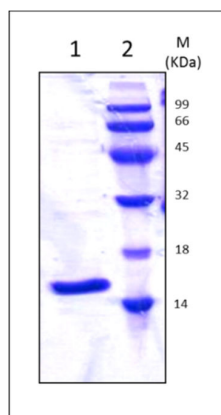


Fig. 4.3.5: Electroforesis en gel de poliacrilamida de la *TcrGrx* recombinante purificada por IMAC. Calle 1: *TcrGrx* recombinante purificada y acondicionada. Calle 2: Marcador de masa molecular.

4.3.3.3 Estudios de oligomerización de *TcrGrx*

Algunas glutarredoxinas tanto monotiólicas como ditiólicas, existen en equilibrio dinámico entre monómeros y dímeros (u oligómeros) quiescentes (Johansson y col., 2007; Mesecke y col., 2008b; Ken y col., 2011). En algunos casos los monómeros resultan la forma activa mientras que las formas diméricas son inactivas como oxidorreductasas (Johansson y col., 2007). Con el propósito de estudiar la existencia de esta proteína en forma de oligómeros, se realizaron los siguientes estudios de oligomerización:

i) Exposición a agentes oxidantes y análisis de complejos por PAGE-SDS no reductor. Para esto, alícuotas de la suspensión de proteína purificada fueron tratadas con diferentes agentes oxidantes y reductores (GSH, DTT, diamida, GSSG, GSNO, ascorbato). Posteriormente, fueron resueltas por electroforesis en condiciones no reductoras. Los patrones electroforéticos obtenidos se muestran en la Fig. 4.3.6 (A). Fue posible establecer que ninguno de los tratamientos aplicados sobre la *TcrGrx* modificó

la movilidad electroforética de la proteína, indicando la ausencia de oligómeros covalentes.

ii) Análisis del perfil de elusión en cromatografía de filtración por geles. La proteína purificada fue analizada cromatográficamente en una columna Superdex 200 equilibrada con Tris-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1 mM y NaCl 100 mM. El análisis cromatográfico se realizó conjuntamente con diferentes marcadores de masa molecular: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisozima (14 kDa). La *TcrGrx* eluyó como un pico simple, correspondiendo este pico al monómero de masa molecular esperada (ca. 15,8 kDa) (Fig.4.3.6 B).

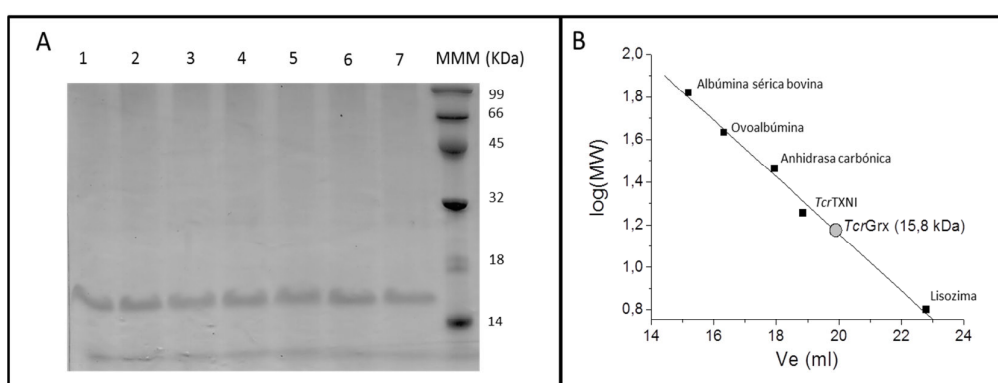


Fig. 4.3.6: Estudios de oligomerización de la proteína recombinante *TcrGrx*. A) Exposición a diversos agentes oxidantes o reductores, seguido de análisis por PAGE no reductor. Calle 1: proteína sin tratar, calle 2: *TcrGrx* tratada con DTT, calle 3: *TcrGrx* tratada con diamida, calle 4: *TcrGrx* tratada con GSH, calle 5: *TcrGrx* tratada con GSSG, calle 6: *TcrGrx* tratada con GSNO, calle 7: *TcrGrx* tratada con ascorbato, calle 8: marcador de peso molecular. B) Resultados de la cromatografía de filtración por geles (Superdex 200, Tris-HCl 25 mM pH7,5, EDTA 1mM, NaCl 100 mM), las proteínas utilizadas como patrones fueron: albúmina sérica bovina (66 KDa), ovoalbúmina (43 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa) y lisozima (14 KDa). Simultáneamente se analizó *TcrTXNI* (18 KDa).

Los resultados obtenidos en ambos estudios indican que la *TcrGrx* no forma dímeros u oligómeros. Similares resultados han sido obtenidos para muchas Grx ditiólicas en varios organismos, como por ejemplo la Grx8 de *S. cerevisiae* (Eckers y col., 2009) o las Grxs de *T. brucei* (Ceylan y col., 2010). Por otra parte, algunas Grx ditiólicas pueden formar estructuras de orden superior, como es el caso de la Grx2 de mamíferos, presente en el citosol, mitocondria y núcleo de células en varios tejidos (Johansson y col., 2007), o como la Grx3 de *E. coli* (Aslund y col., 1994). Se ha encontrado que la Grx2 de mamíferos puede encontrarse en forma de monómero, o puede adoptar una estructura dimérica. Se ha demostrado la presencia de ambas formas en los eluatos

obtenidos a partir de la purificación de la proteína recombinante. En la forma monomérica esta Grx es una tioltransferasa activa, mientras que en la forma de dímero los tioles presentes en cada monómero se encuentran coordinando un átomo de hierro.

4.3.3.4 Caracterización cinética de *TcrGrx*

Se realizaron estudios de caracterización cinética de la *TcrGrx* recombinante, obtenida como se indicó anteriormente. Para realizar los estudios de este tipo se utilizaron sistemas enzimáticos acoplados, dependiendo de la actividad estudiada.

Cinética de reducción de *TcrGrx* por tioles de baja masa molecular

Por un lado se estudiaron los reductores fisiológicos posibles para esta Grx. Ha sido previamente establecido que en *T. cruzi*, así como en otros tripanosomátidos los tioles de baja masa molecular presentes más abundantes son el tripanotión [T(SH)₂], la glutationilpermidina (GspSH) y el glutatión (GSH) (Ariyanayagam y col., 2003). Por ese motivo estos tres tioles de baja masa molecular, así como también el ditiol dihidrolipoamida fueron evaluados en su capacidad de reducir *TcrGrx*, para lo cual se utilizaron sistemas enzimáticos como los que se encuentran esquematizados en la Fig. 4.3.7, en los que el flujo de electrones a través de estos sistemas fue establecido a través del monitoreo de la oxidación de NADPH. De este modo se encontró una velocidad de oxidación de NADPH dependiente tanto de la concentración de *TcrGrx* como de la concentración de los tioles T(SH)₂, GspSH y GSH evaluados de manera independiente (fig 4.3.7 A y B). Por otra parte, se evidenció que la dihidrolipoamida no fue capaz de reducir a la *TcrGrx*. En el caso de otras Grxs se conoce que la dependencia respecto del motivo glutationilo (ausente en la dihidrolipoamida) no sería un factor limitante para la transferencia de electrones entre la dihidrolipoamida y la Grx, como se observó en un trabajo previo en los que se estudió la capacidad de diversas Grxs de catalizar la reducción de GSSG a expensas de dihidrolipoamida (Porrás y col., 2002). En el mismo se probó que existen marcadas diferencias en las eficiencias catalíticas de Grxs de diferentes organismos en la reducción del GSSG, a expensas de dihidrolipoamida, aunque no se estudió detalladamente si estas diferencias efectivamente se deben a la etapa de reducción de cada Grx por la dihidrolipoamida (Porrás y col., 2002).

Las observaciones realizadas sugieren entonces que los tioles de baja masa molecular $T(SH)_2$, GspSH y GSH podrían ser reductores fisiológicos de esta Grx para las reacciones de reducción mediadas por ésta en el parásito.

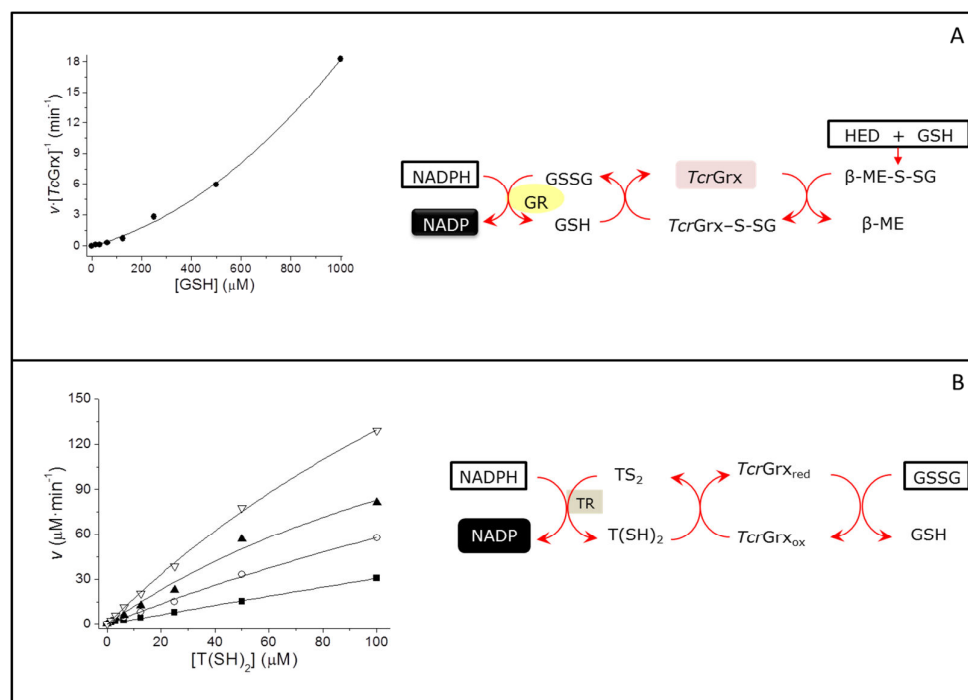


Fig. 4.3.7: Dependencia de la velocidad de oxidación del NADPH respecto de la concentración de alguno de los tioles de bajo peso molecular fisiológicamente relevantes en *T. cruzi*: A) respecto al GSH y en B) respecto al $(SH)_2$, incluyendo: -■- 0 μ M *TcrGrx*; -○- 0,125 μ M *TcrGrx*; -▲- 0,250 μ M *TcrGrx*; y -▽- 0,5 μ M *TcrGrx* en el sistema de reacción. Se muestran los esquemas correspondientes a los sistemas de reacciones acopladas utilizados en cada caso.

Para calcular las constantes de reducción de *TcrGrx*, se determinaron las velocidades iniciales de reacción en un rango de concentraciones del ditiol $[T(SH)_2]$ o de los monotioles (GspSH y GSH). Se observó que la cinética de reducción siguió diferentes modelos para el caso del ditiol o los monotioles, que se detallan a continuación.

Para la reacción de reducción por $T(SH)_2$ se utilizó un sistema acoplado esquematizado en la Fig. 4.1.7 B. Monitorizando la evolución de la oxidación del NADPH a 340 nm fue posible establecer que esta reducción sigue una cinética de segundo orden, que puede ser descrita mediante la ecuación 1:

$$v = k' \cdot [TcrGrx] \cdot [T(SH)_2] \quad \text{Ecuación 1}$$

Utilizando esta ecuación, se calculó la constante de segundo orden (k') correspondiente a esta reacción (Tabla 4.3.1). En la tabla se muestran comparativamente las k' obtenidas para la reducción de la *TcrGrx* y para las dos triparredoxinas (TXNI y TXNII), presentes en *T. cruzi*. Estas TXNs son proteínas ditiólicas que cumplen un rol central en el metabolismo redox de este parásito (Arias y col., 2013b), a través de la reducción tanto de sustratos proteicos como de sustratos no proteicos. Se puede observar en la tabla 4.3.1 que las constantes de reducción por $T(SH)_2$ fueron similares para la *TcrGrx* y *TcrTXNI*, mientras que para la reducción de *TcrTXNII* fue entre 20 y 30 veces menor respecto a las otras dos redoxinas.

Tabla 4.3.1: Constantes cinéticas de reducción de *TcrGrx* por tioles de bajo peso molecular de relevancia en *T. cruzi*. k' corresponde a la constante de segundo orden y k'' corresponde a la constante de tercer orden para la reacción con el correspondiente tiol. N.D. no determinable.

Redoxina	Tiol de bajo peso molecular				
	T(SH) ₂	GSH		GSP-SH	
	k' (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	k' (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	k'' (M ⁻² ·s ⁻¹)	k' (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	k'' (M ⁻² ·s ⁻¹)
<i>TcrTXNI</i>	7,3·10 ⁴	62	2,7·10 ⁵	2,6·10 ²	2,3·10 ⁷
<i>TcrTXNII</i>	2,4·10 ³	20	2,1·10 ⁵	5,1	N.D.
<i>TcrGrx</i>	4,5·10 ⁴	2,0·10 ²	4,2·10 ⁶	4,3·10 ²	1,3·10 ⁷

Por otra parte, se analizaron las velocidades iniciales de reducción de la *TcrGrx* por los monotioles GSH y GspSH, siguiendo la oxidación de NADPH en reacciones acopladas como la que se muestra en la Fig 4.3.8, para el caso del GSH. Como se observa en esta figura, dos fases cinéticas pueden identificarse para la reducción de la *TcrGrx*. A bajas concentraciones de GSH (menores a 200 μM) la reducción siguió una cinética de segundo orden, mientras que a concentraciones mayores a 200 μM la cinética fue de primer orden. Las constantes de reducción de la *TcrGrx* por monotioles, que también se muestran en la tabla 4.3.1, corresponden a cada una de las dos fases encontradas para

cada monotiol, y se obtuvieron a partir de las velocidades iniciales determinadas a diferentes concentraciones del correspondiente monotiol.

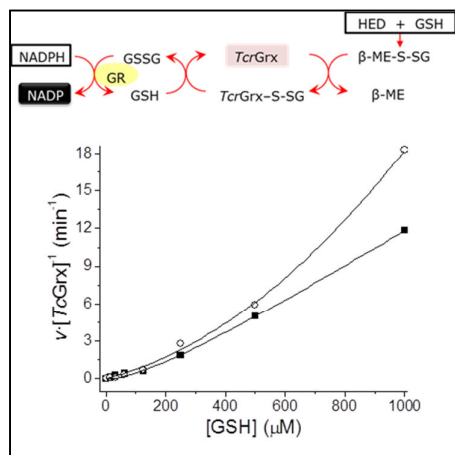
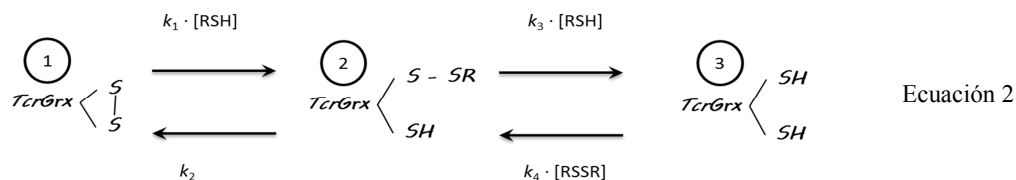


Fig. 4.3.8: Relación entre la velocidad de reacción y la concentración del monotiol GSH, para el sistema acoplado que se indica en la parte superior, incluyendo -○- *TcrGrx* o -●- *TcrGrxC34S*.

Este cambio en el modelo cinético dependiente de la concentración del monotiol puede ser explicado a través de un cambio en el mecanismo por el cual ocurre la reducción de la redoxina, en este caso, desde un mecanismo ditiólico (a bajas concentraciones del monotiol, el GSH), a un mecanismo monotiólico (a altas concentraciones del monotiol). Este comportamiento, que se observó para los dos monotioles ensayados (GSH y GspSH), fue previamente reportado para otros miembros de la familia tiorredoxina, como por ejemplo la disulfuro isomerasa (PDI) (Gilbert, 1989) y la glutarredoxina (Grx1) de mamíferos (Xiao y col., 2005), e incluso la TXN de *T. cruzi* (Arias y col., 2013b). De acuerdo a la literatura en la que se reportan estos antecedentes, las reacciones que componen el mecanismo de reacción serían los que se representan en la ecuación 2:



Donde (1) corresponde a la forma denominada disulfuro, (2) corresponde al disulfuro mixto y (3) es la forma en la que se representa la *TcrGrx* reducida en los tioles del sitio activo. El modelo cinético que corresponde a todo el rango de concentraciones del monotiol, se encuentra representado en la ecuación 3:

$$v = \frac{k_1 \cdot k_3 \cdot [TcrGrx] \cdot [RSH]^2}{k_2 + k_3 \cdot [RSH]} \quad \text{Ecuación 3}$$

A concentraciones bajas del monotiol, la reducción de la *TcrGrx* sigue una cinética de segundo orden respecto de la concentración del monotiol (Fig. 4.3.8). En esta situación, la *TcrGrx* se encuentra convertida al disulfuro mixto en una proporción pequeña, la etapa limitante de la reacción es la reacción entre el disulfuro mixto con el monotiol, de este modo se cumple que $k_2 \gg k_3 \cdot [RSH]$. Por lo tanto el modelo queda representado por la siguiente ecuación (ecuación 4), que indica la dependencia de segundo orden respecto al monotiol:

$$v = \frac{k_1 \cdot k_3 \cdot [TcrGrx] \cdot [RSH]^2}{k_2} \quad \text{Ecuación 4}$$

A concentraciones del monotiol mayores, las condiciones son tales que el disulfuro mixto puede reaccionar más rápidamente con el monotiol hacia la formación de la *TcrGrx* (con los tioles totalmente reducidos), y por lo tanto se cumple que $k_2 \ll k_3 \cdot [RSH]$. La etapa limitante de la velocidad de la reacción es la inicial, que implica al GSH y la forma disulfuro, en este rango de concentración del monotiol la ecuación 5 es la que corresponde al modelo cinético:

$$v = k_1 \cdot [TcrGrx] \cdot [RSH] \quad \text{Ecuación 5}$$

En la Fig. 4.3.8 se representan también las velocidades en función de la concentración de GSH para una versión mutante de la proteína. Se trata de la mutante en el sitio activo, denominada *TcrGrxC34S*, la cual posee los residuos CEYS (en las posiciones 31 a 34 del polipéptido), en lugar de los residuos CEYC que existen en la proteína *wild type* (*TcrGrx*). La obtención por mutagénesis sitio dirigida de la *TcrGrxC34S* se describe en el apartado de materiales y métodos. La *TcrGrxC34S* se empleó en el ensayo cinético acoplado que se esquematiza en la Fig. 4.3.8 y las velocidades se representaron en función de la concentración de GSH. Como se puede observar en la figura, no se apreció el cambio en el orden cinético que se describió para la proteína *wild type*, la cinética fue de primer orden en todo el rango de GSH utilizado para la reducción de esta *TcrGrxC34S*, que puede actuar como monotiólica exclusivamente.

Reducción de sustratos no proteicos por *TcrGrx* y mutantes en el sitio activo (*TcrGrxC34S* y *TcrGrxC31S*)

Se realizaron evaluaciones de la capacidad de la *TcrGrx* recombinante para reducir diferentes sustratos no proteicos. Algunas de las evaluaciones se realizaron utilizando las versiones mutantes *TcrGrxC34S* y *TcrGrxC31S*. Esta última versión mutante posee los residuos SEYC (en las posiciones 31 a 34 del polipéptido), es decir posee un residuo de serina en el lugar de la cisteína catalítica. El objetivo del uso de ambas mutantes fue evaluar la importancia de los residuos de Cys (correspondiente a la Cys nucleofílica y a la resolutive) del sitio activo de la *TcrGrx* sobre la actividad tioltransferasa. Cabe destacar que estos son los únicos residuos de cisteína presentes en toda la proteína. Las proteínas recombinantes mutantes en los residuos del sitio activo fueron obtenidas por la técnica de *quick change* aplicada sobre el gen de la *TcrGrx* en el vector pRSET, como se detalla en el apartado de materiales y métodos. Para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes se procedió de la misma manera que para la proteína *wild type*. La versión *wild type* (*TcrGrx*) y las versiones mutantes en las Cys del sitio activo (*TcrGrxC34S* y *TcrGrxC31S*) fueron utilizadas para evaluar su capacidad de reducir sustratos no proteicos en sistemas redox acoplados, obteniéndose las constantes de segundo orden que se muestran en la tabla 4.3.2. Uno de los sustratos que resultaron interesantes desde el punto de vista de su rol fisiológico fue el glutatión disulfuro (GSSG), cuya reducción por la *TcrGrx* fue estudiada mediante el sistema que se esquematiza en la Fig. 4.3.9.

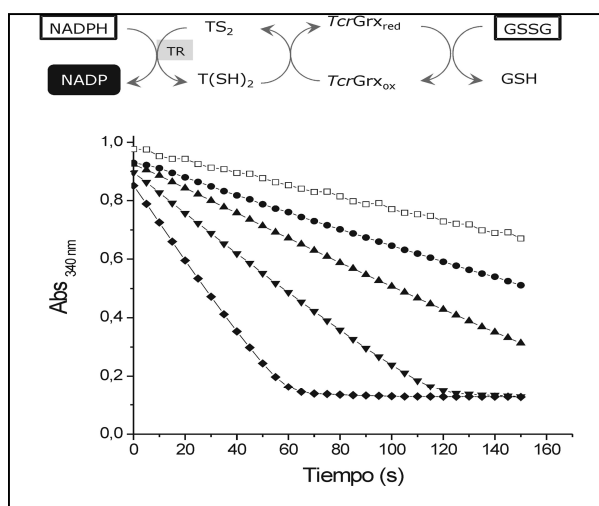


Fig. 4.3.9: Actividad GSSG reductasa en la *TcrGrx*. Evolución de la oxidación del NADPH en el sistema de reacción que muestra el esquema superior, a diferentes concentraciones de *TcrGrx*: -□- 0 μM ; -●- 0,156 μM ; -▲- 0,312 μM ; -▼- 0,625 μM ; -◆- 1,25 μM .

Como puede observarse en la Fig. 4.3.9, la velocidad de reducción de GSSG (medida a través de la oxidación de NADPH) resultó proporcional a la concentración de *TcrGrx* en la mezcla de reacción, indicando este resultado que esta redoxina es capaz de acelerar la reacción de reducción. Este comportamiento fue descrito también para otras Grx, entre las que es posible mencionar a las Grxs de *T. brucei* (*TbrGrx1* y *TbrGrx2*). La constante de segundo orden obtenida para esta reacción de reducción resultó comparable con la obtenida para la reacción mediada por *TcrTXNI* (tabla 4.3.2).

Tabla 4.3.2: Constantes cinéticas de reacción para la *TcrGrx* en reacciones de reducción de diversos oxidantes de relevancia en *T. cruzi*. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C y pH 7,5. N.D. no determinable, en estos casos no se apreció transferencia de equivalentes de reducción.

Oxidante		$k' \text{ (M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$		
		<i>TcrTXNI</i>	<i>TcrGrx</i>	<i>TcrGrxC34S</i>
Tioles de bajo peso molecular	GSSG	$1.5\cdot 10^4$	$2.5\cdot 10^4$	$1.6\cdot 10^4$
	TS ₂	---	$7.0\cdot 10^3$	---
	GSP-S ₂	---	$4.0\cdot 10^4$	---
	GSNO	$8.7\cdot 10^2$	$2.3\cdot 10^3$	$1.3\cdot 10^3$
	CySNO	$1.4\cdot 10^2$	N.D.	---
	CySS	$1.7\cdot 10^3$	$2.4\cdot 10^2$	---
Oxidante no tiólico	DHA	$1.0\cdot 10^3$	$1.8\cdot 10^3$	---
Proteínas disulfuro	<i>TcrTXNPx</i>	$5.7\cdot 10^5$	N.D.	---
	<i>TcrmTXNPx</i>	$1.1\cdot 10^5$	N.D.	---
	<i>TcrGPxl</i>	$6.1\cdot 10^5$	N.D.	---
	<i>TcrMSRA10</i>	$1.2\cdot 10^4$	N.D.	---
	<i>TcrMSRA180</i>	$3.2\cdot 10^4$	N.D.	---

También se realizó la determinación de la constante correspondiente a la reacción espontánea de reducción de GSSG por T(SH)₂ que resultó de $10 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (a pH 7,5 y 30 °C). Comparativamente la reacción catalizada por *TcrGrx* se caracteriza por una

constante unas 2000 veces mayor que la reacción espontánea. *T. cruzi* carece de una glutatión reductasa específica, y fue previamente reportado que el GSH podría ser regenerado a partir de GSSG a través de la reducción no enzimática por T(SH)₂ (Irigoin y col., 2008; Krauth-Siegel y Comini, 2008). Sin embargo, ante una situación de estrés es posible que los niveles de T(SH)₂ se vean reducidos a niveles muy bajos en el parásito, como los que se evaluaron en las reacciones acopladas mediadas por esta *TcrGrx*, que ha demostrado ser una alternativa viable en la regeneración de GSH en condiciones fisiológicas.

Por otra parte, esta reacción de reducción de GSSG fue tomada como modelo para evaluar comparativamente las tres versiones de Grxs (*TcrGrx*, *TcrGrxC31S* y *TcrGrxC34S*). Se pudo constatar que la versión mutante en la cisteína 34 (*TcrGrxC34S*), fue capaz de catalizar la reacción de reducción de GSSG y la eficiencia catalítica fue similar a la observada para la versión *wild type* (tabla 4.3.2). Por otra parte, la versión mutante en la cisteína en la posición 31 (*TcrGrxC31S*), es decir la versión carente de la cisteína nucleofílica, fue incapaz de catalizar la reacción, indicando la esencialidad de este residuo para la actividad de la glutarredoxina.

En la tabla 4.3.2 se muestran además constantes de otras reacciones involucrando compuestos de baja masa molecular. Por ejemplo, la que corresponde a la actividad DHA (ácido dehidroascórbico) reductasa, que es una actividad reportada en varias Grxs, especialmente las que se caracterizan por la presencia de los residuos CPYC en su sitio activo (Lillig y col., 2008). La evaluación de esta actividad en *TcrGrx* resultó en un valor para la constante de dos órdenes de magnitud mayor a la reacción espontánea, correspondiente a la reacción directa entre el DHA y el T(SH)₂ que tiene el valor de $22 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (a pH 6,5), sugiriendo que la *TcrGrx* efectivamente es capaz de catalizar la reacción. Por otra parte la constante de reacción es similar a aquella obtenida para la reacción mediada por *TcrTXNI*, lo que alienta la posibilidad de considerar a la reacción catalizada por esta *TcrGrx* como una vía alternativa de reducción de DHA, un metabolito antioxidante del parásito.

También se evaluó la capacidad *TcrGrx* de reducir CySS (cistina), encontrándose una constante de reducción menor que la correspondiente a la reacción catalizada por *TcrTXNI*. Es posible atribuir esta diferencia a la preferencia de la *TcrGrx* de sustratos

conteniendo motivos glutatión, no presentes en este compuesto de baja masa molecular, un aspecto de las reacciones que se discutirá en la sección siguiente.

Otra capacidad de interés en proteínas involucradas activamente en el metabolismo redox en diferentes organismos, es la de reducir compuestos nitrosilados. En este caso se evaluó la capacidad de *TcrGrx* de reducir los compuestos: GSNO (S-nitrosoglutatión) y CySNO (S-nitrosocisteína). Como puede observarse en la tabla 4.2, no fue posible detectar actividad reductasa frente al compuesto CySNO. Contrariamente, si se pudo constatar transferencia en la reacción de reducción de GSNO. La versión mutante *TcrGrxC34S* también fue capaz de mediar la reducción de este compuesto, con una eficiencia similar a la de la proteína *wild type*. Nuevamente, la preferencia por compuestos conteniendo el motivo glutatión puede ser la causa que justifique la diferencia observada en la reducción de estos dos compuestos nitrosilados.

La constante obtenida para la reacción del GSNO mediada por *TcrGrx* resultó comparable a la obtenida para la reacción mediada por *TcrTXN1*, y es además tres órdenes de magnitud mayor que la constante que corresponde a la reacción directa entre el GSNO and T(SH)₂ [$k'_{\text{GSNO}} = 2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7,5 y 30 °C]. Esta comparación sugiere la posibilidad de una vía alternativa para la reducción de este compuesto.

Reducción de disulfuros en proteínas redox

En los tripanosomátidos, la detoxificación de hidroperóxidos es catalizada por una cascada en la que intervienen peroxirredoxinas como las TXNPxs (triparredoxinas peroxidadas) o la GPxI (glutatión peroxidasa), además de otros componentes como las TXNs, TR (tripanotión reductasa), T(SH)₂ y NADPH, que puede esquematizarse según se muestra en la Fig. 1.9. Otra de las funciones atribuidas al sistema T(SH)₂/TXN, es la transferencia de equivalentes de reducción a la ribonucleótido reductasa. Esta capacidad de las TXNs subyace en la reducción directa del disulfuro en la proteína blanco, como por ejemplo los formados en la TXNPx, la GPxI (luego de la reducción de los peróxidos) o la RR (como consecuencia de la reducción de ribonucleótidos). Grxs de diferentes organismos han sido estudiadas en su capacidad de reducir disulfuros en proteínas. La habilidad de *TcrGrx* de transferir equivalentes de reducción para la reducción de disulfuros en proteínas fue estudiada a través de su capacidad de reemplazar a *TcrTXN* en los sistemas acoplados que se muestran en la fig 4.3.10.

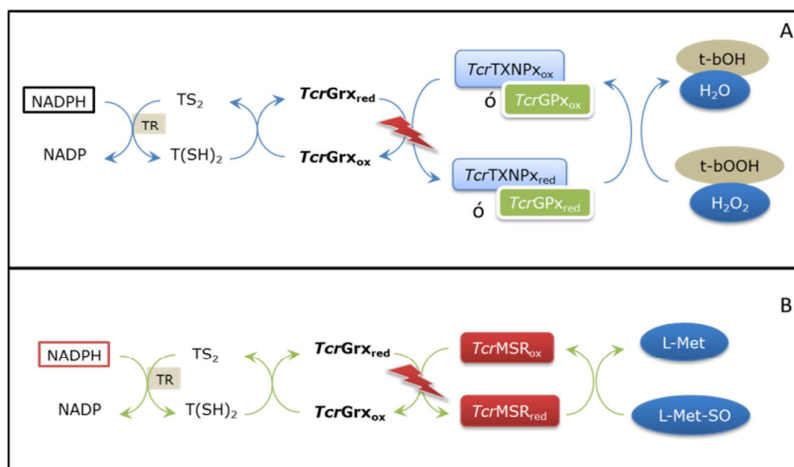


Fig. 4.3.10: Sistemas de reacciones acopladas, utilizados para estudiar la actividad disulfuro reductasa sobre proteínas. A) Reducción de peróxidos como el peróxido de hidrógeno, o el tert-butil-hidroperóxido (t-bOOH), mediado por peroxidases como la triparredoxina peroxidasa (TXNPx) o la glutatión peroxidasa (GPx) de *T. cruzi*. B) Reducción de L-metionina sulfóxido (L-Met-SO) por el sistema mediado por metionina sulfóxido reductasa (MSR) del parásito.

Reacciones incluyendo a la *TcrTXNI* en el sistema acoplado se incluyeron como controles de la funcionalidad del sistema, comprobándose que toda la cascada funciona correctamente. Como se indica en la tabla 4.3.2, al reemplazar *TcrGrx* no se observó consumo de NADPH y por lo tanto esta Grx no funcionó como reemplazo de las *TcrTXNI* en las cascadas de detoxificación de peróxidos.

Se estudió también la transferencia de equivalentes de reducción hacia la *TcrMSRA* en el sistema acoplado que se esquematiza en la Fig. 4.3.10 B. Tampoco se evidenció consumo de NADPH en este sistema, en el que participan las *TcrTXNs*, como fuera previamente caracterizado (Arias y col., 2011).

4.3.3.5 Propiedades fisicoquímicas

Determinación del potencial redox de la *TcrGrx*

Con el fin de conocer acerca de las propiedades termodinámicas de esta Grx, se determinó el potencial redox global de la proteína recombinante por dos métodos. Por un lado se lo determinó empleando un método basado en el equilibrio con GSH. Para esto se incubaron diferentes cantidades de *TcrGrx* recombinante y GSH. Luego de 6 hs de reacción se separó la proteína de la mezcla de reacción y se determinaron las concentraciones de GSH remanente y GSSG formado, según se indica en el apartado de materiales y métodos. Utilizando la relación GSH:GSSG, se estimaron las fracciones

oxidadas y reducidas de la proteína. En todos los casos, para el par GSH/GSSG, un $E^0_{7,5}$ de -270 mV fue utilizado. Con estos datos, se calculó el potencial redox ($E^0_{7,5 \text{ TcrGrx}}$), empleando la ecuación de Nernst (Ecuación 6).

$$E^0_{7,5\text{TcrGrx}} = E^0_{7,5\text{GSSG/GSH}} + \frac{R \cdot T}{Z \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{TcrGrx}] \cdot [\text{GSSG}]}{[\text{TcrGrx-S}_2] \cdot [\text{GSH}]^2} \quad \text{Ecuación 6}$$

El análisis de diferentes mezclas de reacción permitió inferir un potencial redox estándar de -203 ± 11 mV, a pH 7,5.

Paralelamente, se utilizó la relación de Haldane para constatar el valor obtenido para este parámetro fisicoquímico. Según esta relación el cociente entre las constantes de velocidad directa e inversa de la reacción da como resultado la constante de equilibrio aparente de la reacción (K_{eq}). Para la reacción catalizada por la *TcrGrx* (Ecuación 7), esta puede ser calculada a partir de la constante cinética de tercer orden (para la reacción directa) y la constante cinética de segundo orden (obtenida para la reacción inversa).



Esta K_{eq} se relaciona con el E^0 a través de la ecuación de Nernst (Ecuación 6). Utilizando esta aproximación, se obtuvo un $E^0_{7,5 \text{ TcrGrx}}$ de -180 ± 10 mV. Consecuentemente, los valores obtenidos por ambas metodologías son similares, considerando el error experimental de las determinaciones.

En la tabla 4.3.3 se muestran comparativamente los $E^0_{7,5}$ obtenidos en similares condiciones para las *TcrTXNs* y los datos obtenidos de bibliografía para otras proteínas y compuestos.

Del análisis de estos datos se deduce que dos de los compuestos reductores de la *TcrGrx*, en este caso el T(SH)_2 y el GSH, cumplen con el requisito termodinámico de transferencia de equivalentes de reducción. Por otra parte, aun cuando la dihidroalipoamida también se ajusta a esta condición, la transferencia de electrones desde el NADPH no se verificó, reforzando esta observación la hipótesis de la preferencia de interactores conteniendo el motivo glutatión por parte de esta Grx.

Tabla4.3.3: Análisis comparativo de los potenciales de estándares de óxido-reducción para la *TcrGrx* y compuestos o proteínas que integran el metabolismo redox de *T. cruzi*, u otras Grxs caracterizadas.

Compuesto ó Proteína tiol	E° (mV)	Fuente
T(SH) ₂	-242	(Reckenfelderbaumer y Krauth-Siegel, 2002)
GSH	-250	(Reckenfelderbaumer y Krauth-Siegel, 2002)
Dihidrolipoamida	-288	(Fairlamb y Cerami, 1992)
<i>TcrGrx</i>	-191 (valor promedio)	Este trabajo
<i>TcrTXNI</i>	-232	(Arias y col., 2013b)
<i>TcrTXNII</i>	-214	(Arias y col., 2013b)
<i>EcoGrx1/3</i>	-233/-198	(Aslund y col., 1997)

El $E^{\circ}_{7,5}$ de la *TcrGrx* resultó ligeramente mayor al de las *TcrTXNs*, así como también al de otras Grxs de otros organismos como es el caso de la Grx1 de *E. coli* (Aslund y col., 1997). También cabe mencionar que el valor resultó similar al reportado para la Grx3 de *E. coli* (Aslund y col., 1997). El análisis comparativo con los potenciales de las proteínas blancas potenciales, como por ejemplo las peroxiredoxinas, indican que la reducción de estas proteínas disulfuro sería termodinámicamente factible, por lo que el potencial redox no sería la causa que justifique la imposibilidad de esta Grx de llevar a cabo la reducción de estos disulfuros proteicos.

Determinación del pKa de la cisteína nucleofílica (Cis³¹)

En muchas tiol-disulfuro oxidoreductasas han sido determinados valores de pKa del residuo de cisteína en el sitio activo muchos más bajos que el correspondiente a la cisteína libre y se ha establecido la correlación entre estos bajos valores y la reactividad de estos residuos (Mossner y col., 1998). Con el objeto de conocer más detalladamente las características que pueden relacionarse con las propiedades esta *TcrGrx*, se determinó el pKa de la cisteína en la posición 31 del polipéptido (cisteína nucleofílica). Para esto se emplearon dos metodologías independientes: i) medida del estado de ionización del tiolato (a diferentes pH) y ii) determinación de la velocidad de reducción de DTNB por *TcrGrxC34S* a diferentes pH, acorde con las metodologías descriptas

previamente (Nelson y Creighton, 1994; Reckenfelderbaumer y Krauth-Siegel, 2002; Schmidt y Krauth-Siegel, 2003; Arias y col., 2013b).

El primero de los métodos mencionados consiste en registrar la absorbancia de una solución de la proteína recombinante (en este caso la *TcrGrx* ó la *TcrGrxC34S*) a 240 nm, en un medio con capacidad *buffer* a diferentes valores de pH, como se detalla en el apartado de materiales y métodos. A esta longitud de onda, se obtiene un pico de absorción que corresponde al anión tiolato, mientras que en la forma de tiol no absorbe en esta condición (Reckenfelderbaumer y Krauth-Siegel, 2002; Schmidt y Krauth-Siegel, 2003). Para obtener la curva de titulación que se muestra en la Fig. 4.3.11 (A), a los valores de ϵ_{240} obtenidos para la muestra correspondiente a la *TcrGrx* se sustrajeron los valores de ϵ_{240} para la *TcrGrxC34S* obtenido al mismo pH. Siguiendo esta metodología, un valor de pK_a de $6,8 \pm 0,2$ fue obtenido.

La segunda metodología utilizada consiste en medir las velocidades de reacción obtenidas para la reacción de reducción de DTNB a diferentes valores de pH en el medio de reacción. La constante de velocidad observada se relaciona con la reactividad del tiol con en disulfuro presente en el DTNB (Whitesides y col., 1977), a su vez, esta reactividad está asociada a la presencia de la forma tiolato. En una condición determinada, la fracción de tiol presente en la forma del tiolato depende del pK_a y el pH de la solución en esa condición. En el perfil de las constantes observadas de velocidad de reacción en función del pH, muestra una inflexión en el valor correspondiente al pK_a de la cisteína nucleofílica correspondiente al sitio activo (Shaked y col., 1980), como se observa en la Fig. 4.3.11 (B). En este caso particular se midieron las velocidades de reacción catalizadas por *TcrGrxC34S*, a diferentes pH. Siguiendo esta metodología se obtuvo un valor de pK_a de $6,6 \pm 0,1$. Este valor es similar, considerando el error experimental, al obtenido por el método de absorción a 240 nm.

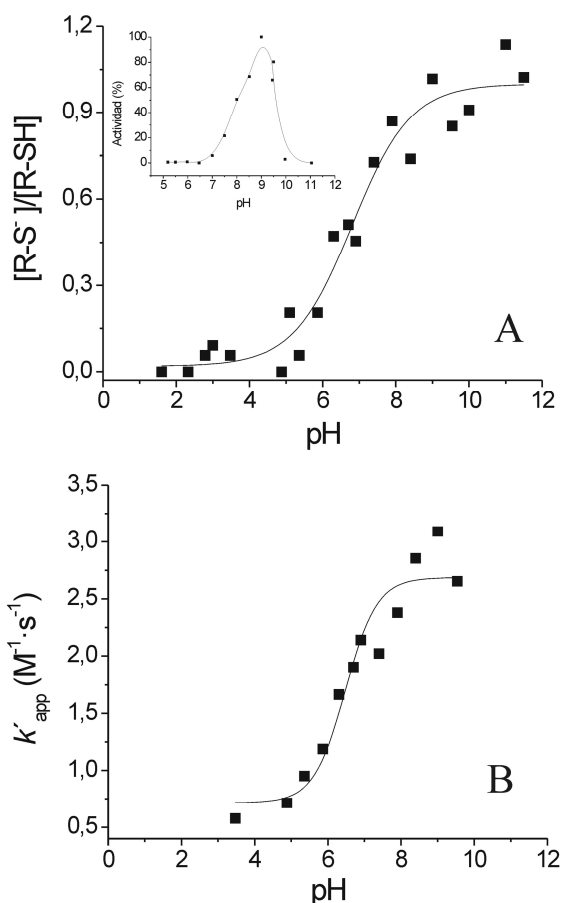


Fig. 4.3.11: Evaluación del pKa del tiol en la cisteína nucleofílica de la *TcrGrx*. A) Curva de titulación de la absorción del anión tiolato a 240 nm. Los puntos en esta curva fueron estimados sustrayendo los valores de ϵ_{240} obtenidos para la *TcrGrx* a los valores de ϵ_{240} obtenidos para la *TcrGrxC34S*, en un rango de pH comprendido entre 2 y 11. B) Reducción de DTNB por *TcrGrxC34S* en función del pH. Se determinaron las velocidades de reducción de DTNB *TcrGrxC34S* (pre-reducida) en el medio de reacción a diferentes pH, midiendo la absorbancia a nm, luego se calcularon las constantes aparentes de segundo orden que se observan graficadas en función del pH. En el *Inset* se graficó el porcentaje de actividad para la reacción de reducción de GSSG por *TcrGrx* (esquemática en la Fig. 4.3.9), a diferentes valores de pH en el medio de reacción.

El valor de pK_a calculado para la cisteína nucleofílica de la *TcrGrx* resultó ser mayor que el reportado para las Grxs denominadas “clásicas” de otros organismos (Lillig y col., 2008), es decir las que contienen los residuos aminoácidos CPYC en el sitio activo. Como ya se ha mencionado anteriormente, dado que un menor pK_a está asociado a una mayor nucleofilicidad y por tanto a una mayor reactividad, es posible que comparativamente la Grx ditiólica de *T. cruzi* resulte menos reactiva que las de otros organismos. Existirían determinantes estructurales asociados con las propiedades fisicoquímicas (particularmente el potencial de reducción estándar y el pK_a) de los residuos de cisteínas en el sitio activo (CXXC) de oxidorreductasas de la familia de las

tiorredoxinas, estos son, entre otros, los residuos presentes en el dipéptido (XX) entre ambas cisteínas (Mossner y col., 1998; Reckenfelderbaumer y Krauth-Siegel, 2002). Por ejemplo, el residuo de prolina presente en el sitio activo (CPYC) de las Grx denominadas clásicas, es determinante de la estructura terciaria, influenciado la interacción electrostática del tiol en la cisteína nucleofílica con otros residuos. La ausencia de esta prolina en el sitio activo de la *TcrGrx* podría justificar el mayor valor de pK_a observado, respecto a otras Grx en las que este residuo está presente. Comparando con la nucleofilicidad de otras redoxinas relevantes en el parásito [*TcrTXNI*, $pK_a=7,0$ y *TcrTXNII*, $pK_a=7,3$ (Arias y col., 2013b)], podemos observar un menor valor este valor de pK_a en la *TcrGrx*.

4.3.3.6 *TcrGrx* en la S-deglutinationilación de proteínas

Deglutinationilación de *TaeGAPC*

Una de las proteínas tomada como modelo en los estudios de (de)glutinationilación de proteínas es la gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa. La importancia que ha adquirido esta proteína como modelo en los procesos de (de)glutinationilación puede apreciarse a la luz de los eventos que llevaron a su identificación como blanco de esta modificación post-transduccional, como se describe a continuación. En células endoteliales humanas, fue establecido que los eventos de s-glutinationilación dependen del estímulo oxidativo. Mediante inducción del estrés oxidativo con H_2O_2 , se observó la rápida s-glutinationilación de una proteína de 37 KDa, que pudo ser identificada como gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Schuppe-Koistinen y col., 1994). Estudios posteriores demostraron que la glutationilación de esta GAPDH no ocurriría en un residuo de cisteína involucrado en la catálisis y de hecho la actividad de la proteína glutationilada no se veía afectada por la modificación (Lind y col., 1998). Más adelante se demostró que en células endoteliales la glutationilación funcionaría como un interruptor que deriva a esta GAPDH hacia otras funciones, diferentes a su función en la vía glicolítica, relacionadas por ejemplo con la regulación de la transcripción (Rodríguez-Pascual y col., 2008).

Con el objeto de estudiar la capacidad de *TcrGrx* de catalizar eventos de deglutinationilación se realizaron, como primera aproximación, ensayos de deglutinationilación utilizando como proteína modelo una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa recombinante de *Triticum aestivum* (*TaeGAPC*) que había sido

previamente caracterizada en nuestro grupo de trabajo (Piattoni y col., 2013). Para esto, la *TaeGAPC* se incubó con GSSG y una alícuota de esta enzima oxidada se separó para determinar su actividad enzimática. Simultáneamente, un ensayo control se realizó incubando la proteína sin GSSG. Luego, diferentes alícuotas de la *TaeGAPC* pre-oxidada se trataron con GSH y diferentes concentraciones de *TcrGrx* (tabla 4.3.4). Pudo observarse que la actividad enzimática de la *TaeGAPC* resultó sensible a la oxidación por GSSG. Cuando la enzima oxidada fue sometida a diferentes concentraciones de GSH y *TcrGrx*, se observó una recuperación de esta actividad, cuyo porcentaje fue dependiente de la concentración de esta tiol-transferasa (Fig. 4.3.12).

Tabla 4.3.4: Ensayo de deglutationilación de *TaeGAPC* por *TcrGrx*. Porcentajes de actividad (respecto a la proteína reducida) luego de etapas de oxidación y posterior reducción.

Etapa del ensayo- Tratamiento	% Actividad Máxima (10 min)
1- <i>TaeGapC</i> reducida	100
2- <i>TaeGapC</i> oxidada con GSSG	12
3- <i>TaeGapC</i> pre-oxidada con GSSG, reducida con GSH	60
4- <i>TaeGapC</i> pre-oxidada con GSSG, reducida con GSH + <i>TcrGrx</i>	100

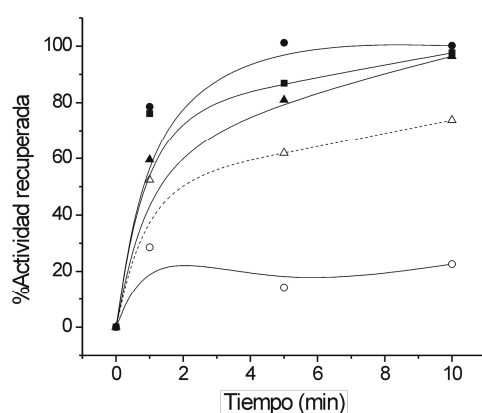


Fig.4.3.12: Ensayo de deglutationilación de *TaeGAPC*. Evolución de los porcentajes de recuperación de la actividad GAPC a diferentes concentraciones de *TcrGrx*, reducida a expensas de GSH: -○- 0 mM GSH + 0 μ M *TcrGrx*; -Δ- 10 mM GSH + 0 μ M *TcrGrx*; -▲- 10 mM GSH + 1,25 μ M *TcrGrx*; -●- 10 mM GSH + 2,5 μ M *TcrGrx*; -■- 10 mM GSH + 5 μ M *TcrGrx*.

De este modo, tomando en cuenta el análisis de los resultados de los ensayos de caracterización cinética, este primer ensayo de deglutationilación de una proteína resultó ser un indicador preliminar sobre la preferencia de esta *TcrGrx* por proteínas glutationiladas sobre proteínas disulfuro.

Deglutinationilación de *Tcr*UDP-Glc-PPasa

Una UDP-glucosa pirofosforilasa de *Entamoeba histolitica* fue caracterizada en nuestro grupo de trabajo, encontrándose residuos de cisteína de importancia en la regulación redox de su actividad (Martinez y col., 2011). Posteriormente, en la base de datos del genoma de *T. cruzi*, se identificó una secuencia que codificaría para una UDP-glucosa pirofosforilasa (*Tcr*UDP-Glc-PPasa). Además de la posibilidad de disponer de la proteína producida de manera recombinante en el laboratorio, y de contar con una metodología sencilla para la cuantificación de su actividad enzimática, esta *Tcr*UDP-Glc-PPasa resultó interesante desde el punto de vista de su estructura primaria por contar también con varios residuos de cisteína, que podrían ser importantes desde la perspectiva de su regulación. De esta manera, a fin de utilizar una proteína de *T. cruzi* como sustrato proteico, utilizamos esta *Tcr*UDP-Glc-PPasa en ensayos de deglutinationilación. Brevemente, diferentes concentraciones de *Tcr*UDP-Glc-PPasa recombinante fueron tratadas con dos tipos de oxidantes diferentes: diamida y GSSG, en ensayos independientes. Como resultado de la oxidación con diamida, siendo este compuesto específico para provocar la oxidación de tioles, las proteínas pueden ser modificadas de diferentes maneras, formando disulfuros (inter o intra-moleculares), o disulfuros mixtos (Kosower y col., 1969). El compuesto resultante dependerá de las reactividades de los tioles en cuestión y de la presencia de otros tioles, diferentes a los presentes en la proteína estudiada. En el marco de este trabajo, una solución de diamida fue utilizada con el fin de obtener formas oxidadas alternativas, diferentes a la glutationilada. Una solución de *Tcr*UDP-Glc-PPasa recombinante, fue pre-reducida con DTT y luego desalada para eliminar el exceso de DTT. Posteriormente la solución fue tratada con diamida y transcurrido un tiempo de incubación de 30 min, una alícuota de la misma se diluyó convenientemente para la determinación de la actividad UDP-Glc-PPasa por el método del verde de malaquita (Fusari y col., 2006). Luego de este tratamiento pro-oxidante, se pudo constatar una reducción total de su actividad enzimática (tabla 4.3.5). Luego de este tratamiento, se tomaron sendas alícuotas para la evaluación de la reversión de la oxidación con oxidoreductasas de *T. cruzi*. Por un lado se estudió la reducción de la *Tcr*UDP-Glc-PPasa (pre-oxidada con diamida) con i) GSH + *Tcr*Grx (en diferentes concentraciones) y ii) *Tcr*TXNI (a modo de ensayo control). Luego de la etapa de reducción, se practicaron diluciones convenientes para la determinación de la actividad UDP-Glc-PPasa.

Tabla 4.3.5: Ensayo de oxidación de *Tcr*UDP-Glc-PPasa con diamida, y reducción con *Tcr*TXNI o *Tcr*Grx, alternativamente. Se muestran los porcentajes de actividad UDP-Glc-PPasa, medidos luego de la etapa de oxidación o tratamiento reductor correspondiente.

Etapa de ensayo-Tratamiento	Actividad enzimática (%)
1- <i>Tcr</i> UDP-Glc-PPasa reducida con DTT	100
2- <i>Tcr</i> UDP-Glc-PPasa oxidada con diamida (Formación de disulfuros)	0
3.a- <i>Tcr</i> UDP-Glc-PPasa pre-oxidada con diamida, reducción con <i>Tcr</i> TXNI	82
3.b- <i>Tcr</i> UDP-Glc-PPasa pre-oxidada con diamida, reducción con <i>Tcr</i> Grx	0

En la tabla 4.3.5 se observa que se obtuvo una recuperación de la actividad UDP-Glc-PPasa, luego del tratamiento con la *Tcr*TXNI, compatible con una reducción de los disulfuros en la *Tcr*UDP-Glc-PPasa. Por otra parte luego del tratamiento con *Tcr*Grx, no se evidenció una recuperación de la actividad UDP-Glc-PPasa, que interpretamos como incapacidad de la *Tcr*Grx para reducir los disulfuros en la *Tcr*UDP-Glc-PPasa, formados luego de la oxidación con diamida.

Separadamente, parte de la *Tcr*UDP-Glc-PPasa pre-reducida con DTT fue posteriormente tratada con GSSG, para inducir la glutationilación de la proteína recombinante. Se analizó la actividad enzimática de una alícuota de la enzima tratada y oportunamente diluída. Como se observa en la tabla 4.3.6, luego de este tratamiento oxidante se evidenció una reducción de la actividad UDP-Glc-PPasa del 60 %. Una vez constatada esta reducción de la actividad enzimática, alícuotas de la proteína oxidada con GSSG se utilizaron para evaluar la deglutationilación de la misma con GSH, catalizada por diferentes concentraciones de *Tcr*Grx.

Tabla 4.3.6: Ensayo de glutationilación con GSSG y deglutationilación de la *Tcr*UDP-Glc-PPasa. Se muestran los porcentajes de actividad UDP-Glc-PPasa, determinados luego del tratamiento oxidante con GSSG, y luego de la reducción de la proteína previamente oxidada con GHS o GSH y *Tcr*Grx, en un rango de concentraciones (se indican los valores en los extremos del rango).

Etapa de ensayo-Tratamiento	Actividad enzimática (%)
1- <i>Tcr</i> UDP-Glc-PPasa reducida con DTT	100
2- <i>Tcr</i> UDP-Glc-PPasa oxidada con GSSG (Formación de disulfuros mixtos)	40
3.a- <i>Tcr</i> UDP-Glc-PPasa pre-oxidada con GSSG, reducción de disulfuros mixtos con GSH	55
3.b- <i>Tcr</i> UDP-Glc-PPasa pre-oxidada con GSSG, reducción de disulfuros mixtos con GSH+ <i>Tcr</i> Grx (2-50 μ M)	72-100

En la tabla 4.3.6 se resume el efecto de los diferentes tratamientos en los valores de actividad UDP-Glc-PPasa.

En la figura 4.3.13 se representa gráficamente la evolución en la recuperación de la actividad UDP-Glc-PPasa para la *Tcr*UDP-Glc-PPasa pre-oxidada con GSSG posteriormente tratada con GSH y diferentes concentraciones de *Tcr*Grx. En esta figura se puede observar que se alcanza un máximo de recuperación entre los 2 y los 4 min para las diferentes concentraciones de la tiol-transferasa. Para un mismo tiempo de tratamiento, un mayor porcentaje de restauración de la actividad se pudo evidenciar para concentraciones crecientes de *Tcr*Grx, conforme a la reducción catalizada del disulfuro mixto formado entre la *Tcr*UDP-Glc-PPasa y el GSSG.

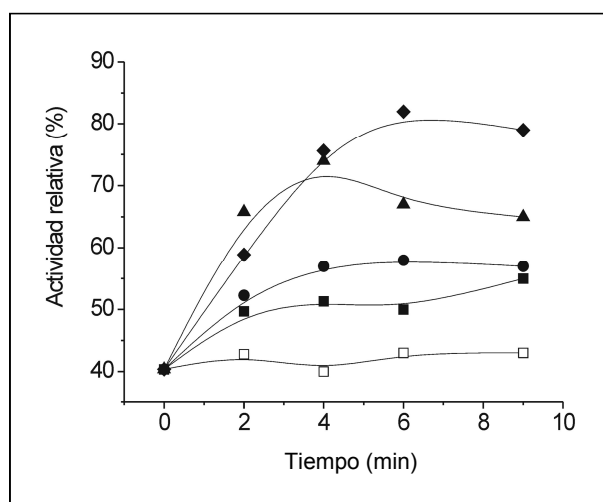


Fig. 4.3.13: Recuperación de la actividad UDP-Glc-PPasa, por deglutationilación de la *Tcr*UDP-Glc-PPasa oxidada con GSSG, en una mezcla de reacción conteniendo 10 mM GSH y diferentes concentraciones de *Tcr*Grx: -□- 0 μM; -■- 2 μM; -●- 5 μM; -▲- 20 μM; -◆- 50 μM.

Tomados en conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis acerca de la selectividad de esta *Tcr*Grx por sustratos glutationilados, en este caso proteínas glutationiladas, respecto a los disulfuros de proteínas ya sean intramoleculares o intermoleculares. Esta preferencia podría ser interpretada en términos de especificidad de sustrato, un requisito indispensable para la función regulatoria asociada a una modificación post-transduccional (Dalle-Donne y col., 2007; Allen y Mieyal, 2012). Estos resultados también resultan novedosos desde el punto de vista de la modulación rápida de la actividad de esta UDP-Glc-PPasa en el parásito, ya que sugieren que esta podría ser uno de los mecanismos por el que la enzima podría encontrarse con un menor nivel de actividad o ser re-activada, en condiciones que deberán ser objeto de futuros estudios.

Con el objetivo de poner en evidencia que efectivamente ocurre la formación de disulfuros mixtos entre la *Tcr*UDP-Glc-PPasa y el GSSG, se realizaron ensayos de

glutathionilación empleando moléculas de GSSG marcado con eosina. Para este ensayo, una solución de *Tcr*UDP-Glc-PPasa recombinante fue tratada con di-eosina-glutathión disulfuro (Di-E-GSSG), acorde a una metodología previamente descrita (Bräutigam y col., 2013). Una alícuota de la solución de proteína marcada con este reactivo fue tratada con ácido tricloroacético para separar la proteína por precipitación. Los productos de cada tratamiento se resolvieron en geles de poliacrilamida no reductores. Antes de la coloración de los geles con Coomassie Blue, los geles se escanearon con el procesador de imágenes Typhoon, para capturar la fluorescencia emitida que se aprecia en los paneles de la Fig. 4.3.14 (A).

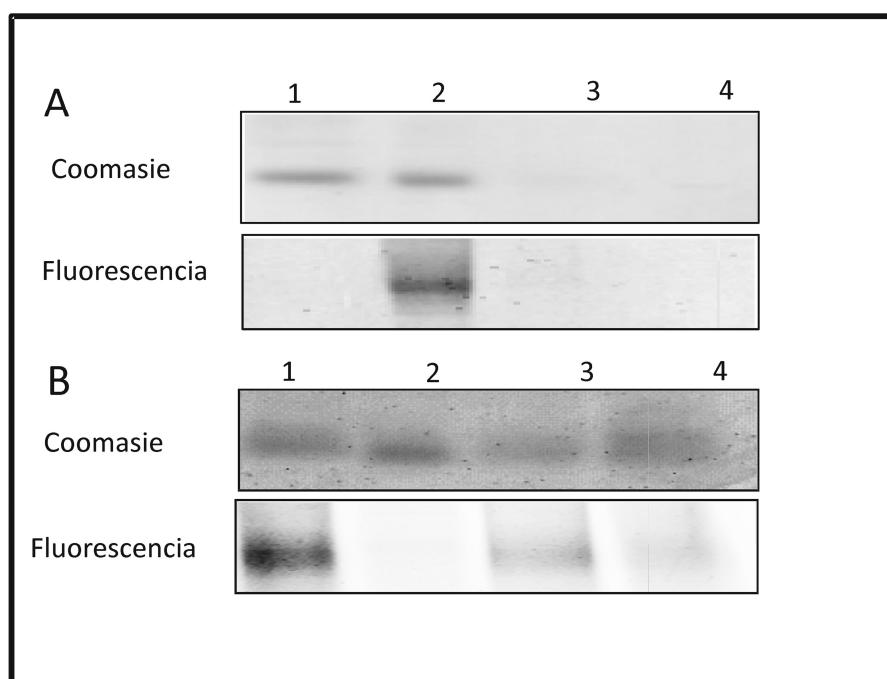


Fig. 4.3.14: Estudio de la glutathionilación de la *Tcr*UDP-Glc-PPasa empleando DIEGSSG, por SDS-PAGE y detección por doble revelado: fluorescencia y tinción con *Coomassie Blue*. A) La glutathionilación de la *Tcr*UDP-GlcPPasa fue detectada por reacción con DIEGSSG. Calle 1: ensayo control de *Tcr*UDP-GlcPPasa sin reactivos agregados. Calle 2: Producto de reacción de *Tcr*UDP-GlcPPasa con DIEGSSG (Producto denominado *Tcr*UDP-GlcPPasa-S-SGE). Calle 3: Producto de reacción de *Tcr*UDP-GlcPPasa con DIEGSSG y posterior precipitación de las proteínas. Calle 4: DIEGSSG. B) Deglutathionilación de *Tcr*UDP-GlcPPasa. Calle 1: Producto de reacción de la *Tcr*UDP-GlcPPasa con DIEGSSG (*Tcr*UDP-GlcPPasa-S-SGE). Calle 2: *Tcr*UDP-GlcPPasa-S-SGE tratado con DTT (0,5mM). Calle 3: *Tcr*UDP-GlcPPasa-S-SGE tratado con 0,1 mM GSH, 4 U·mL⁻¹ glutathión reductasa y 1 mM NADPH. Calle 4: *Tcr*UDP-GlcPPasa-S-SGE tratado con 0,1 mM GSH, 4 U·mL⁻¹ glutathión reductasa, 1 mM NADPH y 10 μM *Tcr*Grx.

En la Fig. 4.3.14 (A) se puede observar que en la calle correspondiente a la *Tcr*UDP-Glc-PPasa tratada con Di-E-GSSG (calle 2) se evidenció una banda fluorescente con una movilidad electroforética acorde con la masa molecular de la proteína, presentando la marcación efectiva de la proteína con el reactivo. En la imagen del gel teñido con Coomasie, se muestra la banda correspondiente a la proteína que se observó en esta calle. Es posible interpretar que la señal no se debe a fluorescencia intrínseca de la proteína, ya que en la calle 1, en la que se sembró la proteína sin tratar, no se constató señal fluorescente coincidente con la banda perteneciente a la proteína, cuya presencia se revela en el gel teñido con Coomasie. Se comprobó además que la señal se encontraba unida a la proteína ya que, en la calle correspondiente a la alícuota de la proteína tratada con Di-E-GSSG y luego separada por precipitación (calle 3) no se observa la banda correspondiente a la proteína en la tinción con Coomasie, ni tampoco señal fluorescente. De igual manera tampoco se observa señal fluorescente en la calle correspondiente al Di-E-GSSG solo (calle 4), con lo que se verificó que la señal fluorescente no se debe al reactivo solo.

En el panel B de la Fig. 4.3.14, se muestran los resultados observados luego de realizar los experimentos que se describen a continuación. Una solución de la *Tcr*UDP-Glc-PPasa fue tratada con Di-E-GSSG y el exceso de reactivo fue separado por ultrafiltración. Una alícuota de la proteína marcada se sembró en el gel directamente (calle 1) y otra se trató con DTT (calle 2). Es posible interpretar de este resultado que la unión entre la *Tcr*UDP-Glc-PPasa sería específicamente de tipo tiol-disulfuro, blanco del agente reductor DTT. Otras alícuotas de la *Tcr*UDP-Glc-PPasa marcada con Di-E-GSSG se trataron con el sistema acoplado GSH, GR y NADPH (calle 3) e incluyendo además la *Tcr*Grx (calle 4). Una vez realizados los tratamientos, los productos de cada reacción se separaron electroforéticamente en geles no reductores, que luego se procesaron como se explicó en el ensayo anterior. De este modo, como se observa en la figura, se constató la reducción del disulfuro mixto formado entre la *Tcr*UDP-Glc-PPasa con Di-E-GSSG, catalizado por la *Tcr*Grx.

Utilizando metodologías de marcación de proteínas que son glutationiladas *in vivo*, y posterior purificación de las proteínas marcadas, algunos autores han identificado proteínas que cumplirían funciones en el metabolismo del carbono en plantas como la UDP-Glc-PPasa de *Arabidopsis thaliana* (Dixon y col., 2005), así como también ADP-Glc-PPasa de *Chlamydomonas reinhardtii* (Zaffagnini y col., 2012). De manera

similar a lo que observamos en el caso de *Tcr*UDP-Glc-PPasa, estas proteínas, entre otras, fueron identificadas como blancos de glutationilación. Sin embargo en estos trabajos no se estudió en detalle si la modificación por glutationilación podría resultar en la regulación de la actividad enzimática, o funcionaría como mecanismo de protección de los tioles frente al estrés oxidativo.

Deglutationilación de proteínas en extractos de *T. cruzi*

En varios artículos recientemente publicados se describe la identificación de proteínas s-glutationiladas empleando un método que se basa en la reducción enzimática de los disulfuros mixtos empleando una Grx, a continuación los tioles expuestos son marcados con biotín-maleimida (así como también otros agentes alquilantes marcados), y luego capturando los aductos formados a través de una cromatografía de afinidad por unión a estreptavidina (Lind y col., 2002; Kehr y col., 2011). En este trabajo se empleó esta metodología (denominada *Biotin-switch*) para detectar proteínas susceptibles de ser glutacioniladas que además podrían ser blanco de la actividad deglutacionilante de la *Tcr*Grx en *T. cruzi*. Esta metodología se aplicó sobre un extracto de epimastigotes previamente sometidos a estrés oxidativo generado por incubación de los parásitos en una solución de diamida. La biomasa de parásitos estresados se sometió a varios lavados y posteriormente el extracto fue obtenido por lisis empleando NP40 en un medio conteniendo buffer fosfatos. En la Fig. 4.3.15 se esquematizan las etapas que comprendió la realización del ensayo de *Biotin-switch*. Como se observa en esta figura, en el primer paso metodológico se realiza una incubación del extracto con iodoacetamida para “bloquear” por alquilación los tioles libres que pudiesen estar disponibles en el extracto. Para obtener una mayor especificidad en la etapa de captura, el extracto es pre-clarificado por incubación con la resina de agarosa-streptavidina, de este modo se eliminarían las proteínas que interaccionan inespecíficamente con la resina. Posteriormente el extracto separado en alícuotas para realizar las reacciones controles y ensayo de deglutacionilación, según se indica en la Fig. 4.3.15. Los productos de estos ensayos se incubaron con una solución de biotín-maleimida, de modo que los tioles que hayan sido expuestos luego de la reacción de reducción con *Tcr*Grx, reaccionarán con este agente alquilante marcado. Luego de eliminar el exceso del reactivo, se agregó a los viales correspondientes a cada uno de los ensayos una pequeña cantidad de resina agarosa-streptavidina (previamente equilibrada), se incubaron y se lavaron minuciosamente. Las proteínas capturadas se eluyeron de la

resina directamente por incubación con *buffer* de carga de PAGE. Luego de aplicar esta metodología de marcación y captura, las proteínas se separaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida, y se realizó una tinción con plata para la detección.

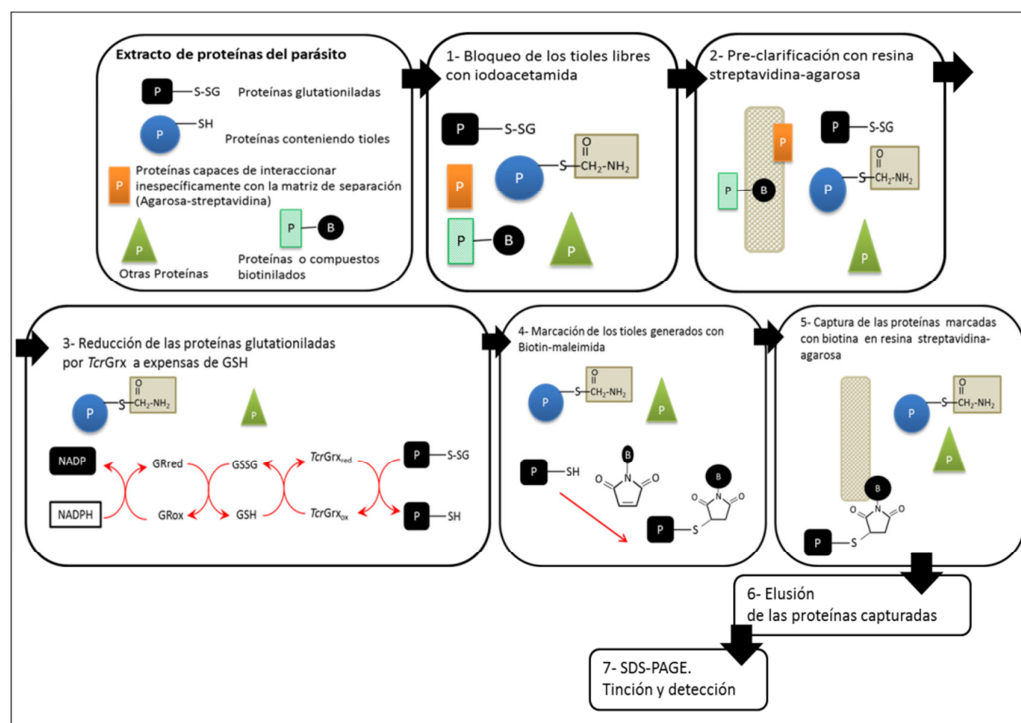


Fig. 4.3.15: Esquema en el que se resumen las etapas metodológicas que componen el ensayo de *Biotin switch*, aplicado sobre un extracto de proteínas de epimastigotes de *T. cruzi*. En este caso el ensayo se aplicó para capturar proteínas glutacioniladas en el extracto, que son reducidas por la *TcrGrx*.

En la Fig. 4.3.16 se pueden observar los perfiles electroforéticos correspondientes a cada uno de los ensayos. Tras examinar la imagen de esta corrida electroforética en la Fig. 4.3.16 es posible realizar el siguiente análisis. En la calle correspondiente al ensayo control de bloqueo, no se observan bandas, lo que es indicativo de una buena calidad tanto del bloqueo como de la etapa de pre-clearing. En las calles que corresponden a los ensayos en los que se ha utilizado el sistema *TcrGrx*/ GSH/ GR/ NADPH pueden identificarse varias bandas que corresponderían a las proteínas que podrían *in vivo* ser deglutacioniladas por esta Grx. Al comparar las calles 2, 3, 4 y 5 se puede concluir la concentración de proteínas deglutacioniladas se relaciona directamente con la presencia de *TcrGrx*, acorde con lo esperado para la reacción catalizada, así como también se relaciona con el tiempo de reacción. En las calles correspondientes a los controles realizados para la reacción de reducción dependiente de GSH solamente (sin *TcrGrx*) intensidades de algunas bandas que corresponden a concentraciones ínfimas de

proteínas se detectaron, acorde con un nivel de deglutationilación notablemente menores a los obtenidos para la reacción catalizada por *TcrGrx*.

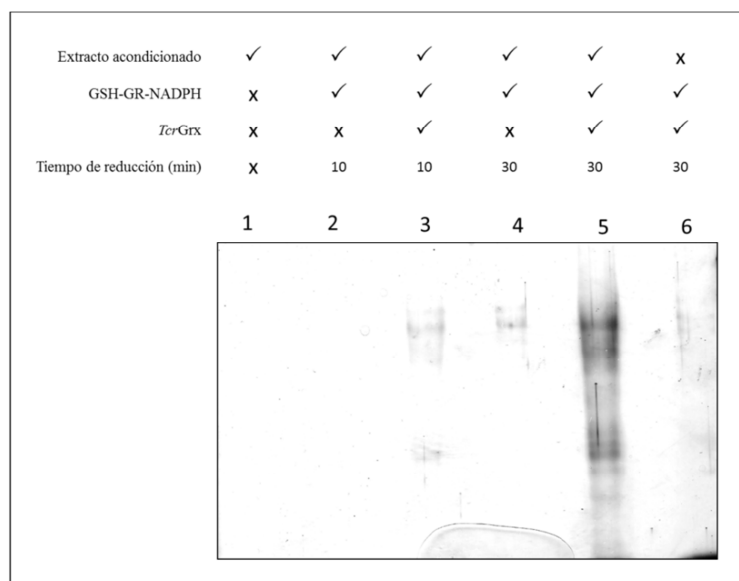


Fig. 4.3.16: PAGE-SDS revelado por tinción argéntica de los productos de las diversas reacciones realizadas en paralelo sobre las proteínas en el extracto de *T. cruzi*. Estas reacciones corresponden a la etapa 3 indicada en el esquema de la fig. 4.1.17, es decir son previas a la etapa de captura de proteínas. Calle 1: extracto obtenido luego del bloqueo de los tioles y la preclarificación. Calle 2: El extracto fue reducido durante 10 min, empleando 0,1 mM GSH, 4 U·mL⁻¹ glutatión reductasa, 1 mM NADPH. Calle 2 El extracto fue reducido durante 10 min, empleando 0,1 mM GSH, 4 U·mL⁻¹ glutatión reductasa, 1 mM NADPH y 15 μM *TcrGrx*. Calle 4: El extracto fue reducido durante 30 min, empleando 0,1 mM GSH, 4 U·mL⁻¹ glutatión reductasa, 1 mM NADPH. Calle 5 El extracto fue reducido durante 30 min, empleando 0,1 mM GSH, 4 U·mL⁻¹ glutatión reductasa, 1 mM NADPH y 15 μM *TcrGrx*. Calle 6: Mezcla de reducción 0,1 mM GSH, 4 U·mL⁻¹ glutatión reductasa, 1 mM NADPH y 15 μM *TcrGrx*, sin extracto de proteínas del parásito.

Si bien las bandas obtenidas fueron remitidas para su secuenciación por MALDI-TOF-MS, sería posible obtener un mayor nivel de resolución por metodologías más avanzadas para la separación, como la electroforesis bidimensional. Por otra parte, la identificación de estas proteínas será tomada como punto de partida para el estudio de interacciones particulares con la *TcrGrx*. Sin embargo, la puesta a punto de esta metodología permite demostrar por un lado la manifestación de esta modificación post-transduccional en las proteínas del parásito en una condición de estrés y la funcionalidad de esta *TcrGrx* en la deglutationilación de proteínas específicas de *T. cruzi*. Futuros experimentos serán orientados al estudio de este fenómeno en diferentes condiciones fisiológicas en los que, como se comentará oportunamente, estarían involucradas las funciones de esta *TcrGrx*.

4.3.3.7 Estudios de expresión y localización subcelular de la *TcrGrx* en *T. cruzi*

Para establecer si la expresión de esta *TcrGrx* se correlaciona directamente con alguno de los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, se realizaron ensayos de western blot sobre extractos del parásito. Para esto, se produjeron anticuerpos policlonales contra la *TcrGrx* recombinante, en conejo. El antisuero generado se testeó en un primer ensayo de western blot contra la proteína recombinante -como control- y un extracto de epimastigotes de *T. cruzi* cepa CLBrenner. Como se observa en la Fig. 4.3.17 (A), en el extracto de epimastigotes los anticuerpos producidos reconocen una banda cuya migración es coincidente con la proteína recombinante. El resultado del revelado del western blot sobre extractos obtenidos en los estadios epimastigote, amastigote y tripomastigote se muestra en la Fig. 4.3.17 (B), donde se observan niveles de expresión de *TcrGrx* similares en los tres estadios estudiados, acorde con lo que podría considerarse una expresión constitutiva de esta redoxina.

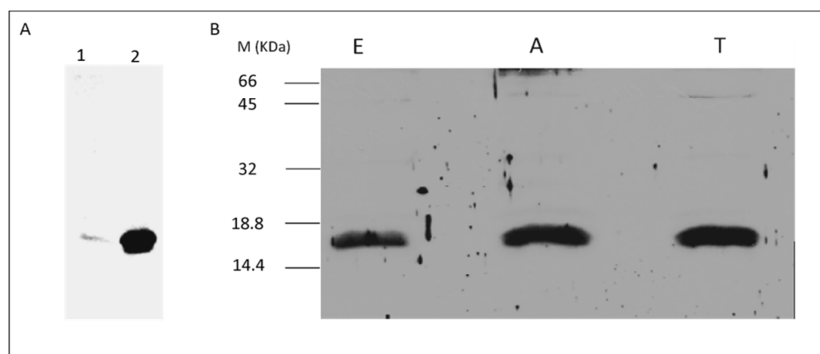


Fig. 4.3.17: Estudio de la expresión de la *TcrGrx* por ensayos de Western Blot. A) Evaluación del anticuerpo recombinante purificado. Calle 1: extracto preparado a partir de $5 \cdot 10^6$ epimastigotes. Calle 2: proteína recombinante. B) Expresión de la *TcrGrx* en extractos de diversos estadios del parásito. Calle E: extracto preparado a partir de 10^7 epimastigotes. Calle A: extracto preparado a partir de 10^7 amastigotes. Calle T extracto preparado a partir de 10^7 tripomastigotes derivados de células. Luego de la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios, el revelado se realizó por el método quimioluminiscente.

Con el fin de alcanzar un mayor grado de comprensión de los procesos celulares en los que esta glutarredoxina podría estar involucrada, la localización subcelular de la misma puede proveer información relevante y provechosa. Para abordar este objetivo, se utilizaron dos estrategias independientes, una de ellas la co-inmunolocalización de la *TcrGrx* fusionada a la proteína fluorescente roja (RFP), y la otra estrategia se basó en la digestión parcial y sucesiva de biomasa de parásitos con digitonina.

Estudio de la localización subcelular mediante co-inmunolocalización de la proteína de fusión.

El empleo de proteínas fluorescentes, como la GFP (*Green fluorescent protein*) ha sido una herramienta valiosa para el estudio de la localización subcelular de proteínas en diferentes tipos celulares (Rizzuto y col., 1995; Phillips, 2001). Los motivos de su difundida utilización son varios, como por ejemplo que la expresión recombinante en diversos organismos es versátil, no existiendo mayores problemas relacionados con la expresión heteróloga (Rizzuto y col., 1995). Además ha sido demostrado la GFP (u otras proteínas fluorescentes, como la RFP), puede ser fusionada a una proteína en estudio y que la localización de la fusión es dirigida específicamente por la proteína de interés (Rizzuto y col., 1995; Niedenthal y col., 1996; Rodrigues y col., 2001), incluso sin que el cambio en la localización afecte los niveles de fluorescencia. En el marco de este trabajo, se prepararon construcciones apropiadas para transformar *T. cruzi* con dos proteínas de fusión a RFP para estudiar la localización subcelular de *TcrGrx*. Las proteínas de fusión se denominaron RFP-*TcrGrx* (corresponde a la versión de la proteína de fusión en la que la RFP se encuentra en el extremo N-terminal) y *TcrGrx*-RFP (en la que la RFP se encuentra en el extremo N-terminal del polipéptido). Las construcciones para expresar estas versiones se realizaron en el vector pTEX y muestran en la Fig. 4.3.18. La estrategia de elección de la proteína fluorescente se basó en la disponibilidad de anticuerpos contra proteínas típicas de organelas, preparados en conejo y anticuerpos secundarios marcados con FITC. De este modo se puede prever la realización de co-inmunolocalización utilizando estos anticuerpos (cuya señal de fluorescencia es de color verde) sobre preparados de los parásitos expresando las proteínas de fusión (que emiten fluorescencia roja). Las construcciones obtenidas se utilizaron para transformar un cultivo de *T. cruzi* Dm28c, procedimiento que permitió obtener las líneas del parásito denominadas *T. cruzi* Dm28c [pTEX/RFP-*TcrGrx*] y *T. cruzi* Dm28c [pTEX/*TcrGrx*-RFP], respectivamente (Fig. 4.3.18). Una vez establecidas las líneas de parásitos con estas características, se tomaron muestras de cada una para evaluar la expresión de la fusión por ensayos western blot, utilizando anticuerpos primarios anti *TcrGrx*. El resultado de la evaluación se muestra en la Fig. 4.3.18. En esta figura se puede evidenciar en los extractos de ambas líneas de parásitos, el reconocimiento de bandas correspondientes a la *TcrGrx* que expresa normalmente el parásito, de la que se comentó en el apartado anterior, y una banda a una altura esperada

correspondiente a la migración electroforética de la proteína de fusión, con una masa predicha de aproximadamente 57 KDa (de los cuales 32 KDa corresponden a la RFP). Se corroboró de esta manera que la proteína de fusión se exprese correctamente y que no se estuviesen expresando cantidades significativas de productos truncos.

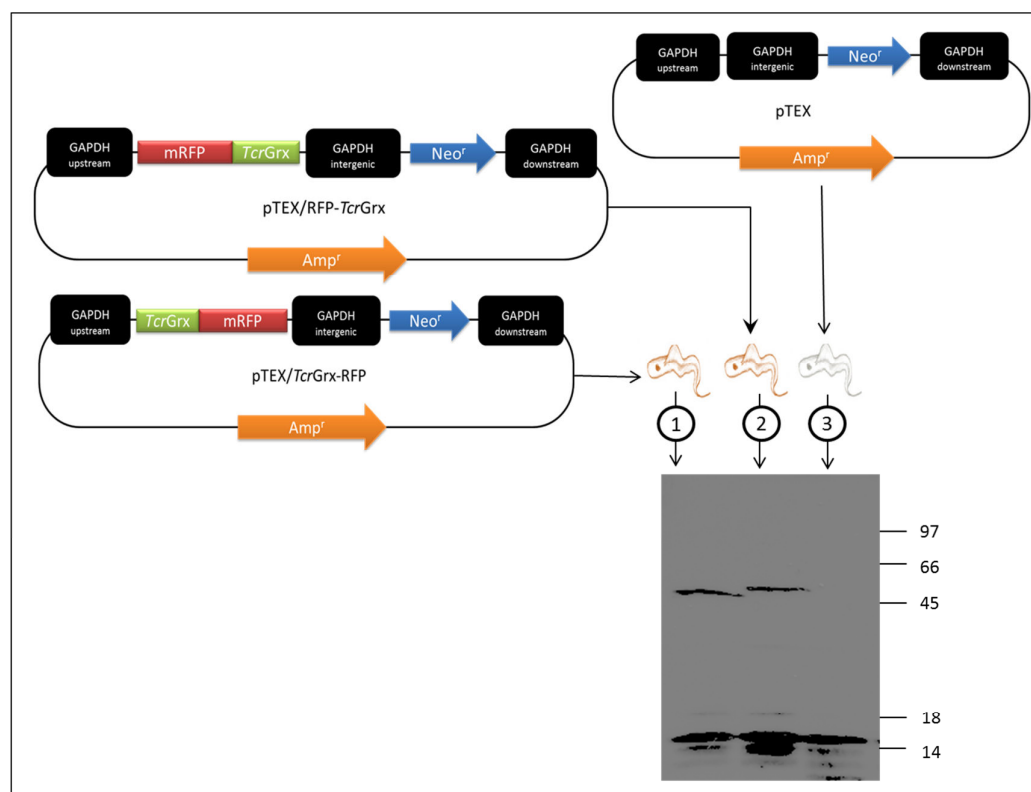


Fig. 4.3.18: Obtención de las líneas de parásitos expresando *TcrGrx* como proteína de fusión a RFP. Las construcciones conteniendo las versiones de la proteína de fusión *TcrGrx*-RFP (en la cual la RFP se encuentra hacia el C-terminal) y RFP-*TcrGrx* (en la que la RFP se encuentra en la región N-terminal de la fusión), se realizaron en el vector pTEX. En la parte inferior de la figura se observa un ensayo de Western Blot, en el que se analizaron extractos de parásitos transformados con cada una de las construcciones. Se emplearon anticuerpos anti-*TcrGrx* y el revelado se realizó por el método quimioluminiscente. Calle 1: Extracto de epimastigotes transformados con la construcción pTEX/*TcrGrx*-RFP. Calle 2: Extracto de epimastigotes transformados con la construcción pTEX/RFP-*TcrGrx*. Calle 3: Extracto de epimastigotes transformados con el vector pTEX.

Se realizó un preparado de cada uno de las líneas *T. cruzi* Dm28c[pTEX/RFP-*TcrGrx*] y *T. cruzi* Dm28c[pTEX/*TcrGrx*-RFP] para observar por microscopía confocal, la distribución de cada una de las proteínas de fusión en el interior de los epimastigotes. Las microfotografías obtenidas se muestran en la Fig. 4.3.19, en la que se puede evidenciar la misma distribución para ambas versiones de la proteína de fusión, con lo cual se corroboró que la posición de la RFP no condicionó la localización dependiente de la secuencia del gen de la *TcrGrx*.

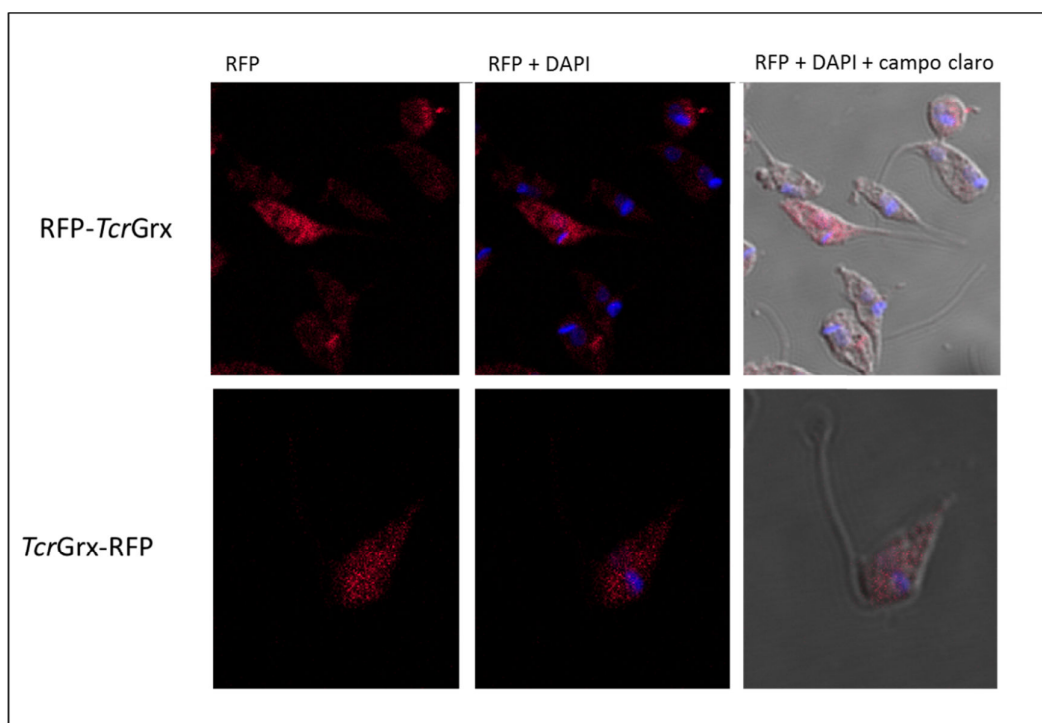


Fig. 4.3.19: Microfotografías de fluorescencia confocal, correspondientes a campos seleccionados en preparados de epimastigotes expresando las proteínas de fusión *Tcr*-RFP y RFP-*TcrGrx*.

Comprobadas las líneas de *T. cruzi* expresando las dos versiones de la proteína de fusión, estas se emplearon para los estudios de co-inmunolocalización. Con este objetivo, suspensiones de epimastigotes de estas líneas fueron fijados sobre portaobjetos, permeabilizados e incubados (en portaobjetos independientes) con los diferentes anticuerpos producidos contra proteínas marcadoras de localizaciones subcelulares, luego con anticuerpos secundarios marcados con FITC y finalmente fueron acondicionados con líquido de montaje conteniendo DAPI, para la marcación de núcleo y kinetoplasto. Las proteínas tomadas como marcadores de localización subcelular fueron las siguientes: *TcrcTXNPx* (triparredoxina peroxidasa citoplasmática) en citoplasma, *TcrmTXNPx* (triparredoxina peroxidasa mitocondrial) en matriz mitocondrial, *TbrcytC* (citocromo c) en espacio intermembrana mitocondrial. Los preparados realizados de esta manera fueron analizados por microscopía confocal, las microfotografías obtenidas se muestran en el panel de la Fig. 4.3.20.

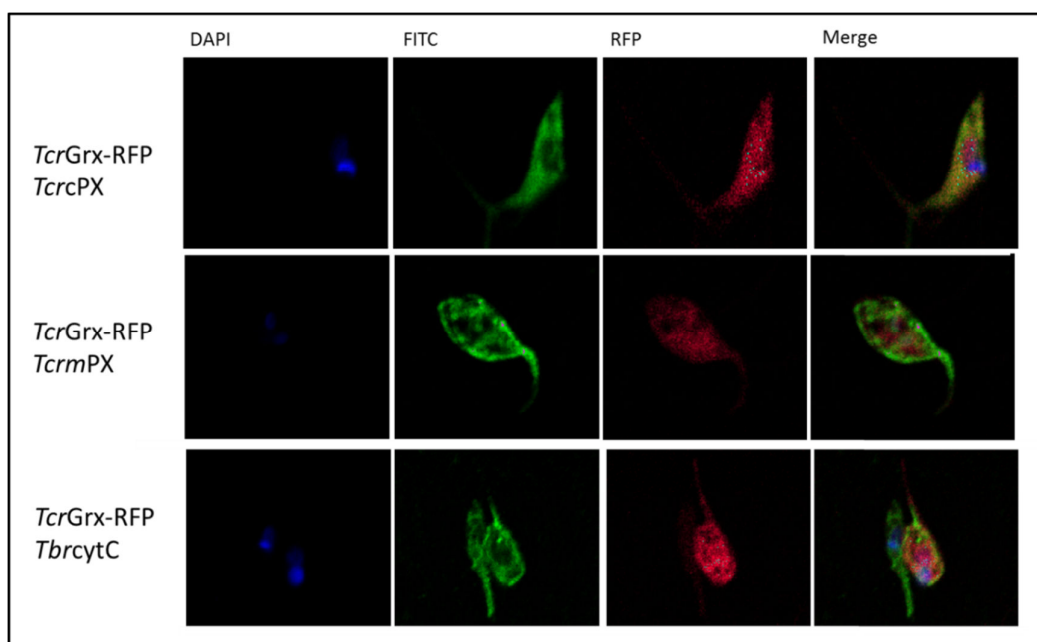


Fig. 4.3.20: Estudio de la localización subcelular de *TcrGrx* por co-inmunolocalización. Microfotografías de fluorescencia confocal, correspondientes a campos seleccionados a partir de preparados de parásitos expresando la proteína de fusión *TcrGrx*-RFP, incubadas independientemente con los anticuerpos anti-*Terc*TXNPX (marcador de citoplasma), o anti- *Tcrm*TXNPX (marcador de matriz mitocondrial), o anti-*TbrcytC* (marcador de espacio intermembrana mitocondrial). Las imágenes correspondientes al canal azul muestran el ADN teñido con DAPI. En el canal verde se observan las proteínas reconocidas por los anticuerpos empleados como marcadores de organelas (empleando anticuerpos secundarios marcados con FITC). En el canal rojo se detectó la proteína de fusión a RFP.

En estas microfotografías se observa que la señal fluorescente correspondiente a la *TcrGrx* fusionada a RFP co-localiza en gran porcentaje con la señal correspondiente a la ubicación de la *Terc*TXNPx, esto estaría indicando una localización citoplasmática para la *TcrGrx*. Por otra parte, se puede observar una señal correspondiente a la *Tcrm*TXNPx intensamente focalizada en una estructura fibrilar que ocupa una zona más delimitada y marginal, en las proximidades de la membrana plasmática del parásito, y que este no es el patrón de fluorescencia correspondiente a la *TcrGrx* fusionada a RFP. Un patrón similar al que corresponde al marcador mitocondrial es el que se observa para el de espacio intermembrana mitocondrial (*TbrcytC*), una localización sugerida para la Grx2 de *T. brucei*, que comparte el mayor porcentaje de homología con la *TcrGrx*, en comparación con la Grx1 de *T. brucei*.

Cabe destacar que no se ha observado exclusión de la región nuclear para el caso de la fluorescencia de la *TcrGrx* fusionada a RFP (en cualquiera de las dos versiones) lo cual

podría estar sugiriendo una localización dual citoplasmática y nuclear, a pesar de que la secuencia del gen que codifica para esta redoxina no contendría un péptido de señalización al núcleo evidente. Una localización dual de estas características fue descrita previamente para la Grx1 de mamíferos, traslocada oportunamente al núcleo por interacción con otra proteína (Rozell y col., 1993).

Estudio de la localización subcelular por digestión parcial con digitonina.

Paralelamente a la estrategia descrita en el apartado anterior, el estudio de la localización subcelular de la *TcrGrx* en el parásito se realizó por una metodología ampliamente utilizada para este tipo de estudios, en células eucariotas en general, y en tripanosomátidos en particular. Se trata de la digestión sucesiva de una biomasa de parásitos empleando soluciones de digitonina de concentraciones crecientes, y se basa en la ruptura selectiva de las endomembranas de la célula como consecuencia de su composición (en lo que respecta a la proporción de esteroides) y su ubicación. Así, la membrana plasmática es más sensible a bajas concentraciones de digitonina, liberando el contenido del citoplasma al medio. De manera opuesta, la mitocondria puede lisarse a altas concentraciones de digitonina, por lo que a concentraciones de digitonina insuficientes, el contenido de la matriz mitocondrial permanece en el interior de esta. El procedimiento extractivo puede ser llevado a cabo de dos maneras diferentes, i) aplicando soluciones de digitonina de concentraciones crecientes sobre sendos pellets celulares ó ii) aplicando sucesivamente diferentes concentraciones sobre el mismo pellet. En este trabajo se aplicó en una primera instancia la metodología indicada en segundo lugar, y las fracciones solubles obtenidas luego de cada digestión parcial fueron sometidas a ensayos de western blot para identificar la proteína de interés y proteínas marcadoras de localizaciones celulares conocidas. En este caso se emplearon como marcadores de localización subcelular: *TcrcTXNPx* (citoplasma), *TcrTXNPx* (mitocondria), *TcrAPx* (ascorbato peroxidasa, retículo endoplasmático), *TcrGlcK* (glucoquinasa, glicosomas), *TbrcytC* (espacio intermembrana mitocondrial). Luego del revelado con cada anticuerpo, se obtuvieron los resultados que se muestran en el panel de la Fig. 4.3.21.

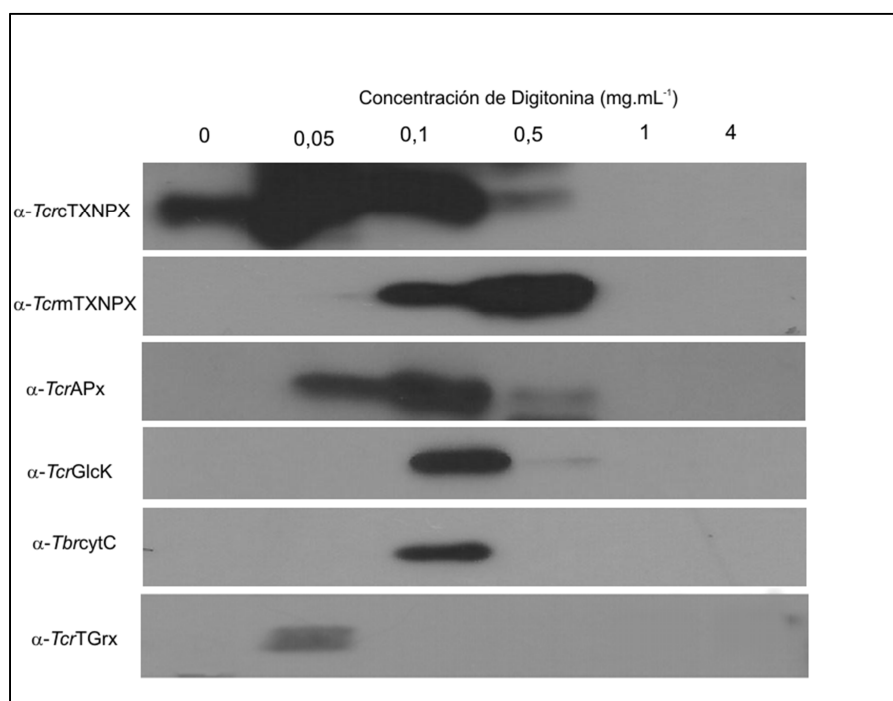


Fig. 4.3.21: Estudio de la localización subcelular de *TcrGrx* por digestión parcial con digitonina. Ensayos de Western blot de las fracciones extraídas con diferentes concentraciones de digitonina (aplicadas sobre una biomasa de epimastigotes). Se utilizaron los anticuerpos primarios (indicados a la izquierda) y el revelado se realizó por el método quimioluminiscente.

Luego de comparar los perfiles obtenidos en las extracciones, se concluyó que mediante esta metodología la localización de la *TcrGrx* también resulta citoplasmática, ya que la fracción donde se detectó esta proteína corresponde con la de mayor densidad relativa del marcador citoplasmático. Como es deseable, la proteína de localización incógnita fue liberada en una única fracción, como se puede observar en la Fig. 4.3.21, esto no fue así para la mayoría de los marcadores y esto podría atribuirse a las concentraciones en que muchas de las proteínas tomadas como marcadoras se encuentran presentes en el parásito. Es decir, la mayoría de los marcadores de localización subcelular elegidos son proteínas muy abundantes en las células. Así por ejemplo, se puede observar en el caso del marcador de citoplasma que comienza a liberarse desde la etapa de lavados del pellet celular (aun cuando la solución buffer contiene sacarosa como agente osmoprotector).

Por otra parte, otro ensayo fue realizado, implicando la extracción parcial con digitonina en presencia de proteinasa K que digiere las proteínas liberadas durante la extracción. Este ensayo, conocido con el nombre de ensayo de protección, se ha aplicado por

ejemplo para el estudio de la localización de TXNs en tripanosomátidos (Castro y col., 2010; Arias y col., 2013b). Las fracciones obtenidas en este caso también fueron ensayadas mediante western blot, utilizando anticuerpos contra las proteínas marcadoras como se describió en el ensayo del apartado anterior. La identificación del espacio de localización subcelular por este método, se basa en que luego de ser liberada de su compartimiento por acción de la digitonina, la proteína en estudio se encuentra directamente expuesta a la acción de la proteasa y por lo tanto no será detectada en etapa de western blot. Luego del revelado con los anticuerpos correspondientes, se obtuvieron los perfiles que se muestran en la Fig. 4.3.22.

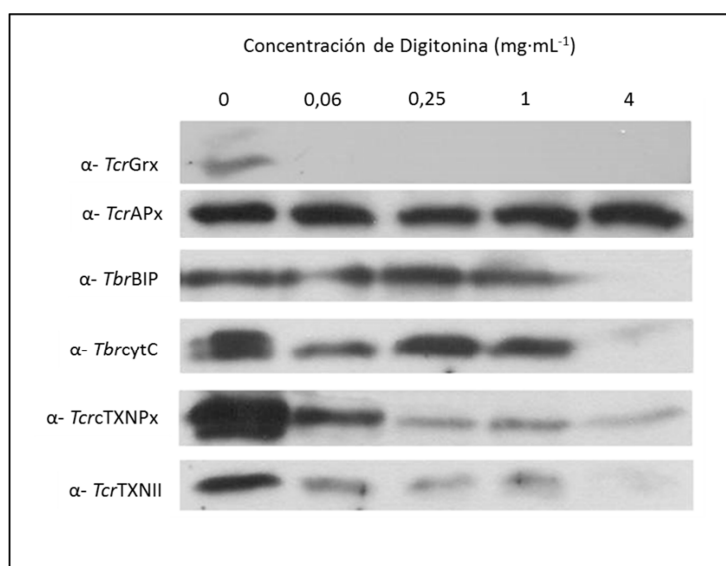


Fig. 4.3.22: Estudio de la localización subcelular de la *TcrGrx* mediante el ensayo de protección. Análisis por Western blot de las fracciones obtenidas luego de la aplicación de soluciones de digitonina de diferentes concentraciones (sobre sendas biomazas), conteniendo proteínasa K. Los anticuerpos primarios utilizados en cada caso se indican a la izquierda, el revelado se realizó por el método quimioluminiscente.

Del análisis de esta figura es posible confirmar que la localización de la *TcrGrx* es citoplasmática, ya que luego de la primera extracción con digitonina, liberado el contenido citoplasma, las proteínas presentes en esta fracción comenzaron a ser digeridas por la proteínasa K. Como se puede apreciar, toda la *TcrGrx* presente en los parásitos fue degradada por la proteasa en esta etapa, coincidente con la degradación del mayor porcentaje de la proteína marcadora de citoplasma, con las consideraciones respecto a la abundancia relativa de estas proteínas que se comentaran más arriba. Nótese que la desaparición de proteínas marcadoras de otras organelas, como el retículo

endoplasmático o el espacio intermembrana mitocondrial se evidencian a concentraciones de digitonina más altas respecto a la que fue necesaria para exponer tanto a la *TcrGrx* como al marcador citoplasmático a la acción de la proteínasa.

4.3.3.8 Estudios de funcionalidad *In vivo*

Ensayos de inducción de estrés oxidativo

Para investigar los procesos de *T. cruzi* en los que esta *TcrGrx* podría estar involucrada se realizaron ensayos empleando una cepa de *T. cruzi* sobreexpresando esta proteína. Para obtener esta línea sobreexpresante, se transformaron por electroporación cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* CLBrenner con las construcciones que se esquematizan en la Fig. 4.3.23. Una de las transformaciones se realizó con el vector pTEX (vector vacío), la línea de epimastigotes obtenida, se utilizó como control. También se empleó una construcción basada en el vector pTEX, conteniendo el gen que codifica para la GFP, la línea obtenida de la transformación con esta construcción no solo se tomó como control del proceso de transformación, sino que durante los ensayos de cultivos también fue empleada como control, en este caso de la sobreexpresión de una proteína aunque no relacionada con funciones redox. La línea transformada con el objeto de sobreexpresar *TcrGrx* fue electroporada con la construcción pTEX-*TcrGrx*. Luego de un proceso de selección acorde con lo recomendado para obtener una población de parásitos expresando niveles deseables de la proteína, los niveles de esta expresión fueron evaluados en ensayos de western blot, empleando anticuerpos anti-*TcrGrx*.

Como se puede observar en la Fig. 4.3.23, en la calle en la que se sembró el extracto correspondiente a la línea transformada con la construcción pTEX-*TcrGrx*, se observa un nivel de expresión mayor que en el caso de los extractos correspondientes a las líneas transformadas con pTEX o pTEX-GFP. La sobreexpresión también fue corroborada por inmunolocalización utilizando los anticuerpos anti-*TcrGrx*, observándose mayor intensidad de fluorescencia citoplasmática en el caso de la línea sobreexpresando esta tioltransferasa, aunque lamentablemente no fue posible registrar esta diferencia en microfotografías. Como se puede observar, los niveles de sobreexpresión no son demasiado elevados, si se compara con los niveles reportados para otras proteínas, incluso correspondientes al metabolismo redox (Allaoui y col., 1999; Piacenza y col., 2008; Piñeyro y col., 2008). Sin embargo, un nivel moderado de sobreexpresión puede considerarse como un aspecto positivo, y de hecho ésta fue una de las razones para

seleccionar el vector pTEX y no otros vectores, como el pTREX o pRIBOTEX, estos últimos han sido optimizados para obtener niveles altos de sobreexpresión. Se prefirió trabajar con una línea de parásito que sobreexpresara niveles moderados del gen de interés sobre la base de la prevención de una posible expresión ectópica del gen en estudio.

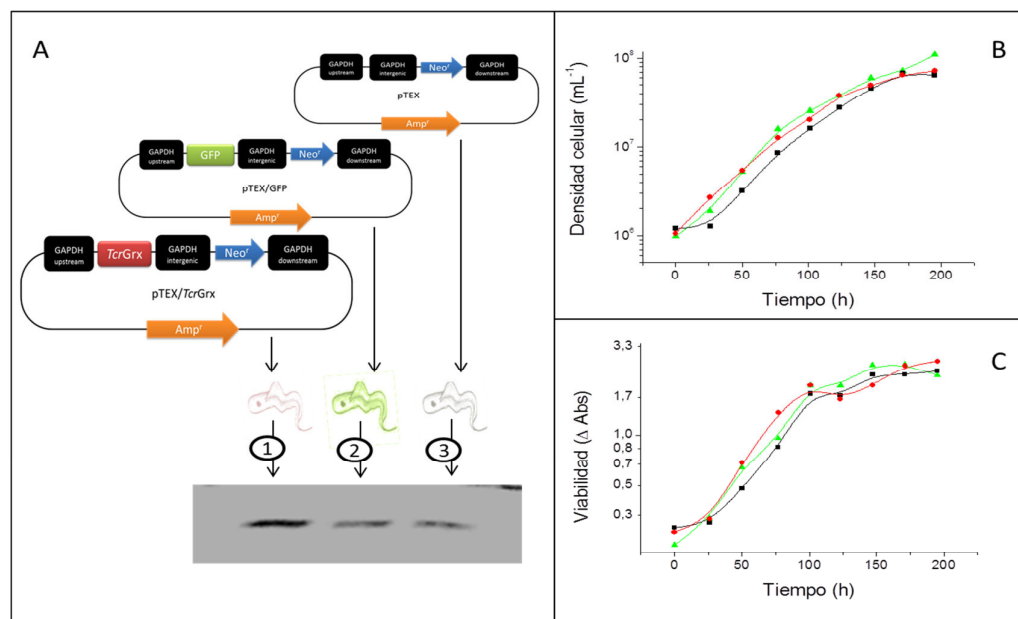


Fig. 4.3.23: Obtención de líneas de epimastigotes de *T. cruzi* sobreexpresando *TcrGrx* y proliferación en cultivos. A) Construcciones realizadas sobre el vector pTEX utilizadas para transformar epimastigotes de *T. cruzi* CLBrenner, una vez establecidos se analizaron los niveles de expresión por Western Blot. Calle 1) Extracto de $5 \cdot 10^6$ epimastigotes transformados con pTEX/*TcrGrx*. Calle 2: Extracto de $5 \cdot 10^6$ epimastigotes transformados con pTEX/GFP. Calle 3: Extracto de $5 \cdot 10^6$ epimastigotes transformados con pTEX. B) Evolución de la densidad de epimastigotes (obtenida por recuento en cámara de Neubauer) y C) evolución de la densidad de parásitos viables (por determinación colorimétrica en el ensayo de reducción de resazurina) en los cultivos (no estresados) de las líneas de parásitos transformados con: ■- pTEX, ▲- pTEX/GFP, y ●- pTEX/*TcrGrx*.

Una vez obtenidas las líneas a estudiar, se realizaron cultivos en condiciones normales (no estresadas) para evaluar la incidencia de la sobreexpresión de la *TcrGrx* sobre la proliferación de los epimastigotes. Cultivos de las líneas *wild type*, y transformadas con pTEX y pTEX-*TcrGrx* se realizaron en medio LIT (10% SFB), y se muestrearon diariamente para cuantificar las densidades de parásitos totales y viables. Para cuantificar el número de parásitos viables se adaptó una metodología (Rolon y col., 2006) que consistió en la adición de una solución de resazurina a una alícuota del cultivo, en condiciones asépticas. Esta mezcla se incubó a la temperatura de cultivo de los parásitos durante 16-24 hs, período en el cual la resazurina (compuesto de color azul) fue reducida a resorufina (compuesto de color rosa) por enzimas diaforasas

mitocondriales activas en los parásitos viables. Se registra el cambio en la absorbancia para inferir la densidad de parásitos viables.

En la Fig. 4.3.23 (B y C) se muestran las evoluciones de la densidad de parásitos totales y viables en los cultivos. Como se puede observar, las velocidades específicas de crecimiento fueron similares para las tres líneas. Las densidades máximas alcanzadas, tanto en términos de epimastigotes totales como de viables, también fueron similares para las tres líneas. Se observa que las metodologías empleadas mostraron patrones de evolución similar, indicando que en la fase de crecimiento exponencial ambas metodologías son equivalentes para realizar el seguimiento de estos parámetros de cultivo. Por otra parte, a partir de las 100 hs de cultivo, lo que en la curva de densidad de parásitos totales puede interpretarse como una fase de desaceleración del crecimiento, se evidencia claramente como una fase estacionaria en la curva de densidad de parásitos viables. Estas observaciones permiten suponer a la metodología de cuantificación de parásitos viables como una alternativa más adecuada para la interpretación de los parámetros fisiológicos de los epimastigotes en cultivo. Se concluyó además a partir de este ensayo, que la presencia de mayores niveles de la *TcrGrx* no tendría incidencia sobre los valores de reducción de la resazurina (proceso que ocurriría fundamentalmente en la mitocondria) en el interior de los parásitos, ya que de ocurrir deberían haberse denotado mayores niveles de absorbancias en el caso de la línea que la sobreexpresa.

Para inferir la funcionalidad de la *TcrGrx* en el parásito frente al estrés oxidativo, se desafiaron las líneas de epimastigotes obtenidas con glucosa oxidasa (GOD) en medio LIT fresco, que contiene glucosa. En presencia de este azúcar la GOD produce H_2O_2 y a diferencia del agregado directo del peróxido, se logra un desafío sostenido impulsado por la actividad oxidasa. Se ensayaron diversas concentraciones de GOD en cultivos independientes, de los que se tomaron muestras para evaluar la viabilidad, por el método ya mencionado. En la Fig. 4.3.24 se muestran las gráficas obtenidas a diferentes tiempos, de viabilidad en función de la concentración inicial de GOD para las tres líneas evaluadas. En ellas se observa que similares porcentajes de inhibición de la viabilidad se ejercieron sobre las líneas transformadas con pTEX o pTEX-GFP, mientras que en el caso de la línea transformada con pTEX-*TcrGrx* el efecto inhibitorio fue menor. Es decir que mayores porcentajes de parásitos permanecieron viables luego del desafío oxidante en el caso de la línea sobreexpresando la *TcrGrx*.

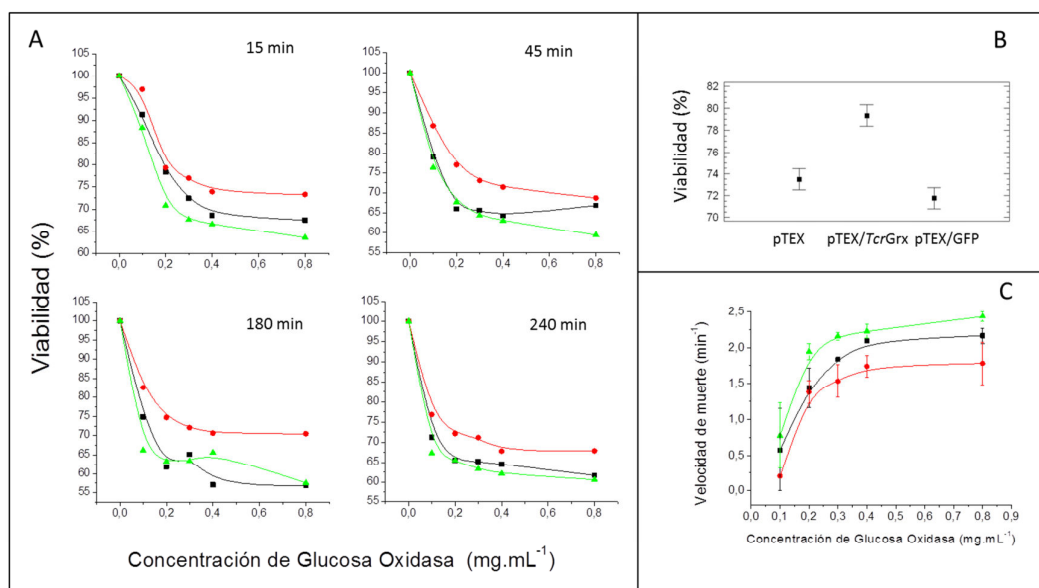


Fig. 4.3.24: Ensayo de inducción de estrés oxidativo en cultivos de epimastigotes de las líneas de epimastigotes de parásitos transformados con: -■- pTEX, -▲- pTEX/GFP, y -●- pTEX/TcrGrx. A) Porcentajes de viabilidad determinados a diferentes tiempos de incubación con concentraciones crecientes de glucosa oxidasa. B) Análisis de la varianza de los porcentajes de viabilidad cuantificados. Se muestran los valores medios y los rangos de LSD (*less significant difference*) obtenidos para este análisis, considerando un $p < 0,05$. C) Velocidades de muerte de los epimastigotes en cada cultivo a diferentes concentraciones de glucosa oxidasa

Se realizó el análisis estadístico de los porcentajes de viabilidad medidos (Fig. 4.3.24-B), a través del análisis de la varianza, tomando como factores el tiempo, la concentración y la línea de epimastigotes. Se pudo establecer que para los tiempos estudiados y a las diferentes concentraciones de GOD evaluadas, las diferencias en la viabilidad observadas son significativas ($p < 0,05$) para la línea sobreexpresando la *TcrGrx*.

Se calcularon también las velocidades de muerte (como inhibición de la viabilidad de los parásitos), calculadas entre los 0 y los 15 min, ya que en este período se observó el mayor descenso en la viabilidad, individualmente para cada concentración de GOD ensayada. En la Fig. 4.3.24 (C) se representan estas velocidades en función de la concentración del estresor, en la que se puede observar que estas velocidades fueron siempre menores en el caso de la línea que sobreexpresa la *TcrGrx*.

Estudios de inducción de la apoptosis en cultivos de epimastigotes

En células de mamíferos se ha encontrado que frente a ciertos estímulos que desencadenan la muerte celular programada por apoptosis, la Grx2 cumple un rol protector que se ha estudiado a diferentes niveles, evitando la apoptosis en estas células. Resultó de interés estudiar si la *TcrGrx* cumple alguna función a nivel fisiológico en el caso de *T. cruzi* cuando se induce la muerte celular programada frente al estímulo con suero humano fresco (SHF) como fuente de complemento. Ciertamente se ha reportado que el complemento induce, en el estadio epimastigote de *T. cruzi*, un tipo de muerte celular programada con algunos rasgos fenotípicos similares a los observados durante la apoptosis en metazoos. A los fines de simplificar la nomenclatura, estos parásitos se denominarán “tipo apoptótico”, como comúnmente ocurre en la bibliografía especializada. Se han reportado varios inductores de la muerte celular programada en tripanosomátidos, y no necesariamente las respuestas fenotípicas observadas han sido similares (Jimenez-Ruiz y col., 2010). Para estudiar las implicancias de la *TcrGrx* en este proceso, se realizaron cultivos de epimastigotes de las mismas líneas que se probaron en el ensayo del apartado anterior, transformadas con pTEX, pTEX-GFP y pTEX-*TcrGrx*. Estos cultivos fueron desafiados con dos porcentajes, 10 y 15 % (v/v) de SHF. Se tomaron muestras a diferentes tiempos post-estímulo para evaluar el porcentaje con fenotipo tipo apoptótico. Se consideraron parásitos con este fenotipo aquellos que de morfología redondeada y que han perdido la movilidad, acorde con lo descrito previamente (Kosec y col., 2006b). Se realizaron tres réplicas biológicas de cada ensayo con partidas de suero diferentes, observándose las mismas tendencias en todos los casos. Sin embargo, dado que los niveles de complemento en cada suero pudieron ser diferentes, los valores absolutos de porcentajes variaron, por este motivo se prefirió mostrar uno de los ensayos representativo de cada porcentaje en la Fig. 4.3.25. Queda representado en estas gráficas mayores porcentajes de epimastigotes con fenotipo tipo apoptótico en el caso de la línea transformada con pTEX-*TcrGrx*, sugiriendo que la sobreexpresión de esta *TcrGrx* tendría un efecto pro-apoptótico sobre los parásitos. En la gráfica de la Fig. 4.3.25, correspondiente a la inducción con 15 % de SHF, se puede observar la evolución de los parásitos con esta morfología en las suspensiones de epimastigotes a las que se realizó el tratamiento control, incubados con el mismo suero pero que ha sido deplementado por tratamiento térmico. En estas suspensiones de parásitos no se observó la conversión de los mismos al fenotipo tipo apoptótico.

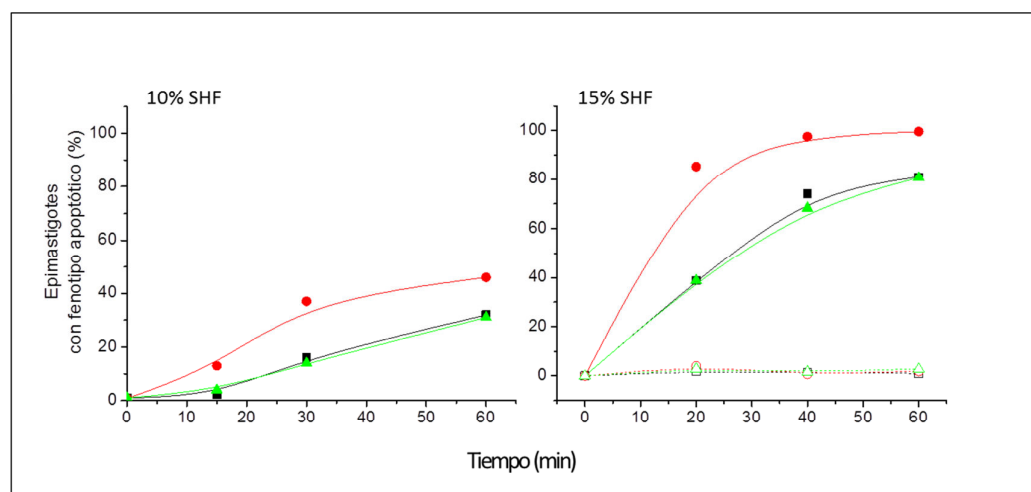


Fig. 4.3.25: Inducción de la apoptosis en cultivos de epimastigotes por incubación con complemento. Evolución del porcentaje de epimastigotes con el fenotipo considerado apoptótico, en cultivos de las líneas de parásitos transformados con: -■- pTEX, -▲- pTEX/GFP, y -●- pTEX/*TcrGrx*, incubados con SFH (Suero Humano Fresco, es decir no inactivado) en una proporción del 10 o el 15% (v/v). En líneas discontinuas y símbolos vacíos se indica la evolución en los cultivos controles correspondientes a las mismas líneas de epimastigotes, pero conteniendo 15% del mismo lote de suero inactivado por calor.

Para corroborar estas observaciones, se realizaron cultivos para estudiar la actividad tipo caspasa y la tinción TUNEL, dos tipos de determinaciones comúnmente utilizadas para analizar las respuestas de diferentes tipos celulares en proceso de apoptosis. Su utilización para estudiar estos fenómenos en cultivos de *T. cruzi* ya ha sido previamente reportada (Piacenza y col., 2002; Kosec y col., 2006b; Piacenza y col., 2007). Estos ensayos están indicados para medir respuestas que se evocan a diferentes momentos post-inducción, siendo la actividad caspasa considerada de mediano plazo y la tinción TUNEL, indicativa de degradación del ADN, de largo plazo. Para cuantificar la actividad caspasa se utilizaron cultivos en fase exponencial de las líneas transformadas con pTEX o pTEX- *TcrGrx*, que se suspendieron en PBS y a los que se indujo con 10 % de SHF. Como se puede observar en la Fig. 4.3.26 (A), mayores valores de actividad tipo caspasa 3 se cuantificaron en los extractos de los parásitos de la línea pTEX- *TcrGrx*, acorde con los mayores niveles de parásitos con el fenotipo tipo apoptótico observados en el ensayo comentado en el apartado anterior.

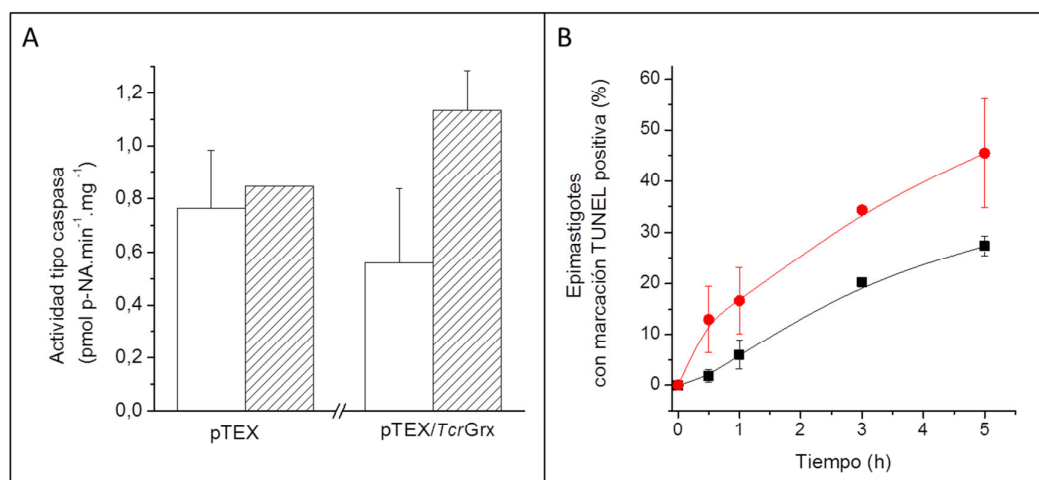


Fig. 4.3.26: Evaluación de parámetros vinculados a la apoptosis en cultivos de epimastigotes. A) Cuantificación de la actividad de tipo caspasa-3 en cultivos de las líneas de epimastigotes transformados con pTEX y pTEX/TcrGrx, las barras vacías representan los niveles de actividad en cultivos no inducidos con complemento, mientras que las barras rellenas (en patrón de rayas oblicuas) representan los niveles de actividad caspasa alcanzados en cultivos inducidos con SHF. B) Evolución del porcentaje de epimastigotes con marcación positiva para el ensayo de TUNEL, en cultivos de las líneas de epimastigotes transformados con: -■- pTEX y -●- pTEX/TcrGrx, inducidos con SHF.

Los valores obtenidos para esta actividad en los extractos son más altos que los reportados previamente por otros autores (Piacenza y col., 2002), aún en el caso de los extractos correspondientes a la situación basal, es decir para la incubación sin la fuente de complemento. Se puede deducir de la Fig. 4.3.26 (A) que los valores de actividad tipo caspasa 3 cuantificados para la línea correspondientes a los parásitos transformados con pTEX no mostró una diferencia significativa entre la situación en que los parásitos fueron inducidos con SHF o no. Esta escasa diferencia podría atribuirse a la metodología elegida para la determinación, basada en un método colorimétrico que posiblemente sea muy poco sensible, combinado con un límite de detección alto. Es probable que valores que permitan diferenciar mejor los niveles de actividad tipo caspasa 3 en diferentes condiciones puedan ser obtenidos utilizando otras alternativas disponibles en el mercado, como el método fluorimétrico. Otro sustrato alternativo al utilizado en este trabajo, basado en el clivaje de un péptido de otra composición y también de naturaleza fluorogénica fue utilizado en otros trabajos (Kosec y col., 2006a; Kosec y col., 2006b) en los que se observa una buena capacidad de esta técnica para discriminar muestras de diferentes tratamientos. Independientemente, se realizó un ensayo control empleando los extractos de *T. cruzi* [pTEX-TcrGrx], a los que se determinó la actividad tipo caspasa 3 en presencia o ausencia del inhibidor específico

Ac-DEVD-CHO (provisto por el fabricante del *kit* utilizado), a través del que se pudo comprobar la especificidad de la actividad cuantificada, ya que según se ha reportado otras actividades proteinasas, como las que provienen de la cruzipaina, no son inhibidas por este compuesto.

Se estudió el porcentaje de parásitos que resultaron positivos frente a la marcación TUNEL, como respuesta final del proceso tipo apoptótico. Se tomaron muestras de los parásitos de ambas líneas (transformados con pTEX o con pTEX-*TcrGrx*) a diferentes tiempos post-inducción con SHF. Una vez realizada la marcación TUNEL, se analizaron al microscopio de epifluorescencia, realizando recuentos por campos de los parásitos totales y los que resultaron marcados, para luego el realizar el cálculo de los porcentajes. El resultado de este análisis se observa en la Fig. 4.3.26 (B). Acorde con los resultados obtenidos para los otros análisis comentados anteriormente, para cada tiempo post-inducción, mayores porcentajes de epimastigotes resultaron positivos a la marcación TUNEL en las muestras correspondientes a la línea sobreexpresando *TcrGrx*. De manera similar a lo que se observó respecto al porcentaje de parásitos con morfología tipo apoptótica, al focalizar el análisis en los primeros 15 min post-inducción, parece evidente además una mayor velocidad de aparición de epimastigotes con el fenotipo estudiado, en el caso de la línea sobreexpresando la *TcrGrx*.

Tomados en simultáneo, la medición de los diferentes parámetros relacionados a la muerte tipo apoptosis sugieren que, comparativamente con la línea control (transformada con pTEX), en los parásitos sobreexpresando *TcrGrx* este tipo de muerte estaría exacerbado, frente al estímulo producido por el complemento. Esta respuesta, pro-apoptótica frente a este inductor particular, parece a priori un resultado contradictorio si tenemos en cuenta la respuesta protectora evaluada en los ensayos de desafío de los cultivos con H₂O₂ (aunque en ese ensayo ninguno de los parámetros indicadores de apoptosis fue objeto de estudio). Sin embargo, es necesario considerar la posibilidad de que los blancos de *TcrGrx* no sean iguales frente a cada situación fisiológica de estrés. Similares funciones han sido informadas por otros autores para otras glutaredoxinas (Allen y Mieyal, 2012), por ejemplo el caso de las Grxs de mamíferos. Aquí, se ha descrito que la Grx regularía negativamente la apoptosis, a través de la deglutinationilación de un receptor (Fas), que inicia la muerte frente al estímulo por ciertas citoquinas (FasL) (Allen y Mieyal, 2012). Mientras, frente a otro estímulo que en este caso está constituido por el TNF α , la misma Grx tiene una

actividad pro-apoptótica, a través de la deglutinationilación de la caspasa-3 (Pan y Berk, 2007). En síntesis, la misma actividad tioltransferasa actuaría frente a diversos targets en situaciones diferentes. Diversos autores atribuyen este comportamiento al tipo celular en que han sido estudiados estos fenómenos y a la diferencia en el estímulo, que desencadenan vías de señalización diferentes. Otro caso que ha suscitado interés es el del rol de las glutarredoxinas ditiólicas de *S. cerevisiae*. Gomes y col. (Gomes y col., 2008) han demostrado que frente a la inducción de la muerte tipo apoptosis con cadmio, la Grx2 de esta levadura, pero no la Grx1. Por otro lado, en este mismo organismo, la inducción de la muerte por la exposición a otro metal, el Selenio, es estudiada más detalladamente por Izquierdo y col. (Izquierdo y col., 2010). Estos autores encuentran que en diferentes rangos de concentración del metal la muerte ocurre por mecanismos diferentes, acorde con un nivel de injuria celular distinto en cada situación. Concluyen que el rol protector de ambas Grx ditiólicas de la levadura se limita a la prevención de la muerte de tipo no apoptótica, mientras que no cumplen rol alguno durante la muerte por apoptosis. Es decir que en el caso de *S. cerevisiae* vías de muerte diferentes son señalizadas por diferentes metales y concentraciones de los mismos como inductores, pudiendo en cada caso variar el rol de las Grxs. En el caso de los tripanosomátidos, resolver esta cuestión puede resultar un poco más compleja que en el caso de las células de mamíferos, ya que las vías de señalización que se activan frente a los diferentes estímulos y el fenotipo final han sido escasamente caracterizadas. Es probable que los resultados que se obtengan de los estudios proteómicos relacionados a las proteínas capturadas en el ensayo de *biotin-switch* en cada condición de estrés, sean de gran importancia para identificar cada uno de los partners de *TcrGrx* y caracterizar su función.

Ensayos de infección de cultivos celulares.

A medida que fue creciendo la comprensión de la relación entre las fases clínicas de la enfermedad de Chagas, el tropismo a nivel de tejidos en el hospedador y los mecanismos moleculares del parásito vinculados con este tropismo, el estudio de la infección con *T. cruzi* en células no fagocíticas fue cobrando interés (Andrade y Andrews, 2005). Particularmente, las evidencias que relacionan a la fase crónica de la enfermedad con la persistencia de los parásitos en células no fagocíticas como por ejemplo las células musculares, fueron factores claves para generar interés en el estudio

a nivel molecular de los procesos de infección de este tipo de células, tanto desde la perspectiva del hospedador como del parásito (Andrade y Andrews, 2005).

En este trabajo, se estudiaron parámetros relacionados con el proceso de infección de células de la línea HeLa, que permitieron vislumbrar las posibles implicancias de la *TcrGrx* en el proceso de invasión y de replicación de estas células no fagocíticas. Para estos estudios, una nueva línea de parásitos sobreexpresando *TcrGrx* fue obtenida, por electroporación de epimastigotes con la construcción pTEX/6his*TcrGrx*, que se muestra en la Fig. 4.3.27 (A). A diferencia de la línea empleada en los ensayos de estrés comentados anteriormente, la *TcrGrx* es expresada con un tag de seis histidinas, una construcción planificada a los fines de futuros ensayos de *pull-down*. Esta construcción fue diseñada además para facilitar la comprobación de la expresión del producto de interés, a través de ensayos de western blot utilizando anticuerpos anti *his-tag* como el que se muestra en la Fig. 4.3.27.

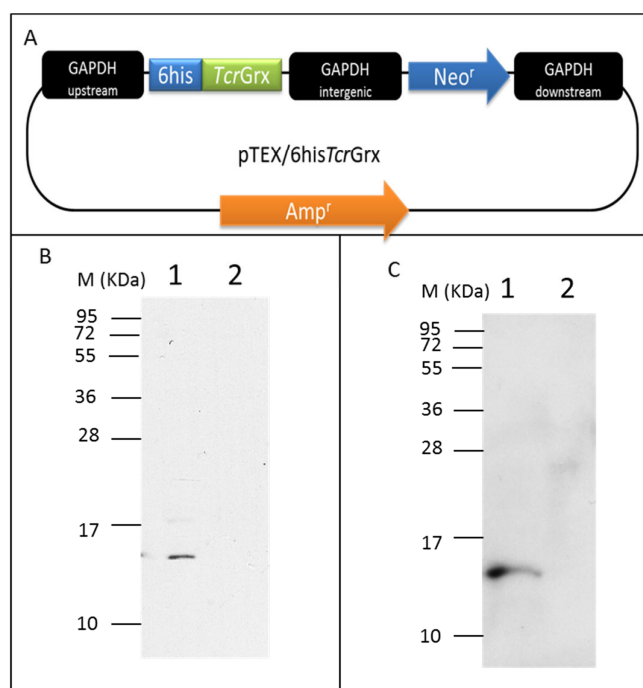


Fig. 4.3.27: Obtención y evaluación de la cepa de *T. cruzi* para los ensayos de infección. A) Construcción empleada para transformar epimastigotes de *T. cruzi* a fin de obtener los parásitos expresando la proteína *TcrGrx* fusionada a un tag de 6 histidinas. B y C) Ensayos de western blot sobre extractos de epimastigotes (B) y tripomastigotes derivados de células (C), transformados con pTEX/6his*TcrGrx* (calle 1) o transformados con pTEX (calle 2). En cada calle, se sembraron 10 μ g de proteínas del extracto correspondiente.

En la misma se muestra señal de reconocimiento del anticuerpo anti his-tag en una banda cuya masa molecular coincide con la de la *TcrGrx*, en la calle en la que se sembró el extracto de los epimastigotes transformados con pTEX-6his*TcrGrx*, como se puede ver en la Fig. 4.3.27 (B). Una vez comprobada la sobreexpresión, se indujo la producción de los tripomastigotes metacíclicos, con los que se infectaron cultivos de células de la línea VERO. De estos cultivos infectados se obtuvieron tripomastigotes (del tipo derivados de células) de las líneas transformadas con pTEX y pTEX-*TcrGrx*. La obtención de mayores niveles de expresión de la *TcrGrx* se verificó también en los extractos de tripomastigotes, mediante ensayos de western blot. Como se aprecia en la Fig. 4.3.27 (C), se identificó la señal correspondiente a la 6his*TcrGrx* en los extractos de tripomastigotes derivados de células, obtenidos a partir de los epimastigotes transformados con pTEX-6his*TcrGrx*.

El ensayo realizado para obtener parámetros de infección, se realizó empleando monocapas de células HeLa preparadas horas previas al ensayo. Los tripomastigotes de cada línea se cuantificaron, de modo tal de realizar las infecciones con una la relación 5:1 (tripomastigotes: célula). Bajo estas condiciones controladas, se incubaron los parásitos con las células, permitiendo un tiempo conveniente para el contacto parásito-célula. Luego las monocapas de células se lavaron para prevenir re-infecciones que dificulten el análisis de los parámetros. Se tomaron muestras de monocapas tanto recientemente infectadas (tiempo 0) y como también a las 48 hs post-infección. Estas se procesaron convenientemente mediante la tinción del ADN con DAPI. Posteriormente se analizaron por microscopía de epifluorescencia para obtener el número de células infectadas, el de parásitos internalizados inmediatamente luego de la infección (en el caso de las muestras de tiempo 0), o los amastigotas que proliferaron en el interior de las células (en el caso de las muestras de 48 hs post-infección). Se puede observar en la Fig. 4.3.28 (A) que inmediatamente después de la internalización de los parásitos, el porcentaje de células infectadas resultó similar, alrededor del 33 %, en las monocapas infectadas con cualquiera de las dos líneas de tripomastigotes. Además se corroboró que el número de tripomastigotes internalizados por célula no difirió significativamente ($p < 0,05$), los recuentos obtenidos fueron de $1,26 \pm 0,04$ para el cultivo infectado con los tripomastigotes transformados con pTEX y $1,36 \pm 0,04$ para el infectado con tripomastigotes transformados con pTEX-*TcrGrx*.

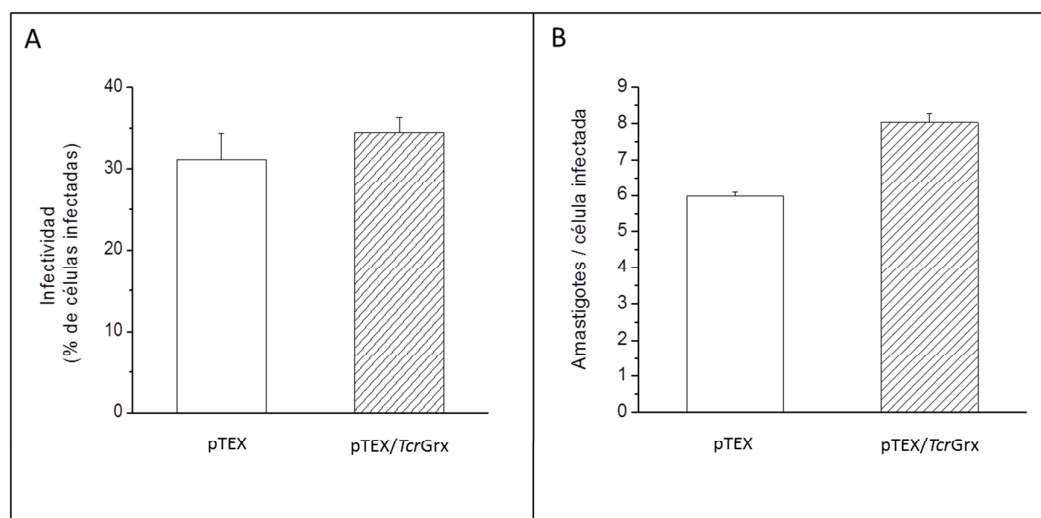


Fig. 4.3.28: Ensayos de infección de cultivos celulares. Las infecciones se realizaron empleando tripomastigotes transformados con pTEX (barras vacías) y pTEX/*TcrGrx* (barras rellenas con patrón rayado). A) Infectividad, calculada como el porcentaje de células infectadas en monocapas tomadas al inicio de la infección. B) Replicación de amastigotas en el interior de las células, calculada como el número de amastigotes por célula infectada en monocapas muestreadas a las 48hs post-infección.

Por otra parte, en la Fig. 4.3.28 (B) se observa que los recuentos realizados a las 48 hs mostraron que en las monocapas infectadas con los tripomastigotes sobreexpresando *TcrGrx* se alcanzaron mayores densidades de amastigotas por células, respecto a la línea control, transformados con pTEX. Estas observaciones sugieren alguna función que podría estar cumpliendo esta tioltransferasa en la proliferación de los parásitos, en el interior de las células hospedadoras de algún modo contribuyendo a mantener la infección. Si bien existen numerosos antecedentes sobre la importancia de las enzimas del metabolismo redox en el proceso de invasión de células, especialmente fagocíticas (Piacenza y col., 2009), existen relativamente pocos antecedentes que vinculan a las enzimas de este metabolismo con la replicación intracelular de amastigotes dentro de células no fagocíticas, pese a la trascendencia que este proceso de proliferación podría tener en el mantenimiento de la infección en la etapa crónica de la enfermedad. Un ejemplo de esto se encuentra reseñado en el trabajo de Piñeyro y col. (Piñeyro y col., 2008), quienes realizaron ensayos de infección de células tanto fagocíticas como no fagocíticas con líneas sobreexpresando *TcrTXNPxs*.

Luego del proceso de invasión, una vez que el parásito escapó de la vacuola parasitófora hacia el citoplasma, se diferencia a amastigota y comienza la replicación. Si bien el citoplasma de la célula hospedadora no es generalmente considerado un entorno hostil,

es necesario tomar en cuenta que también en este tipo celular se generarían ROS derivadas del metabolismo aeróbico, como se comentó en el apartado de introducción. Algunos datos sugieren que la adhesión o anclaje de los amastigotas en el citoesqueleto de la célula hospedadora, así como también la interrupción del proceso apoptótico ejercido por el tripanosoma sobre el huésped, serían algunos factores del parásito vinculados a la mayor replicación del parásito en el hospedero. Un estudio realizado en células HeLa indica que varias vías metabólicas son reguladas de manera particular frente a la infección con los parásitos, y que entre éstas habría una conexión con las vías equivalentes del parásito, para lo cual el tripanosoma debe adaptarse a través de la regulación de estas vías (Caradonna y col., 2013). De este modo, la replicación de los amastigotas toma ventaja de la β -oxidación de los ácidos grasos, metabolismos de las piridinas, y vías de señalización como la dependiente de *Akt* (proteín kinasa B) de la célula de mamífero (Caradonna y col., 2013). Estos datos abren la posibilidad de una amplia gama de vías de señalización en el parásito que podrían ser reguladas por la *TcrGrx*, y para cuya elucidación deberán realizarse estudios de mayor profundidad, por ejemplo estudios de *pull-down* utilizando extractos de amastigotes y estudios de proteómica para identificar proteínas glutationiladas diferencialmente en amastigotas *wild type* y amastigotas *knockout* para los genes que codifican esta *TcrGrx* en *T. cruzi*.

4.3.4 Conclusiones del Capítulo 3

A partir de los resultados de los estudios experimentales realizados y presentados en este capítulo fue posible enunciar las siguientes conclusiones.

En *T. cruzi* existen dos genes que codifican para glutarredoxinas ditiólicas, estos presentan diferencias a nivel de su secuencia nucleotídica, sin embargo la proteína codificada es la misma.

La *TcrGrx* recombinante presenta una estructura monomérica, con una masa molecular similar a las Grxs de otros organismos, incluso similar a otras proteínas de la familia de las tiorredoxinas. Esta Grx no forma agregados covalentes en presencia de agentes oxidantes o reductores.

Los tioles de baja masa molecular GSH, T(SH)₂ y Gsp, presentes en *T. cruzi* (así como en otros tripanosomátidos), son capaces de reducir a la *TcrGrx*. Estos podrían ser sus reductores fisiológicos en el parásito. Comparativamente y considerando las

concentraciones de este tiol en el parásito, es probable que esta reducción ocurra mayoritariamente por T(SH)₂. Sin embargo, es preciso considerar que otro podría ser el escenario metabólico en el caso de la disminución de los niveles de este tiol frente a una situación de estrés.

La *TcrGrx* recombinante fue capaz de catalizar la reducción de varios compuestos de baja masa molecular como el DHA, GSSG, GSNO. Por otra parte, en sistemas acoplados en los que se estudió la reducción de disulfuros proteicos se constató que la *TcrGrx* no transfirió los equivalentes de reducción a estos sustratos. En consecuencia, las observaciones realizadas sugieren una preferencia de la *TcrGrx* por los sustratos (tanto oxidantes como reductores) que contengan el motivo glutatión.

A través de diferentes metodologías, se comprobó que la *TcrGrx* cataliza la deglutatiónilación de disulfuros mixtos entre las cisteínas presentes en diversas proteínas y glutatión. Contando con la metodología puesta a punto en este trabajo, se dispone una alternativa válida para el desafío de identificar las proteínas que sean blanco de esta glutatiónilación en condiciones relevantes para el ciclo de vida de *T. cruzi*.

Empleando epimastigotes de *T. cruzi* sobreexpresando la *TcrGrx* sometidos a un entorno oxidante, se concluye que la sobreexpresión de esta proteína ejerce un efecto protector en esta situación. Por otra parte, en otra situación fisiológica importante dentro del ciclo de vida de *T. cruzi*, se evaluó que los eventos relacionados con la muerte celular programada se encuentran exacerbados en los parásitos sobreexpresando esta Grx ditiólica. Al utilizar los parásitos sobreexpresando la *TcrGrx* en ensayos de infección de cultivos celulares se comprobó que esta oxidorreductasa tiene un efecto positivo sobre la proliferación del estadio amastigote en la célula hospedadora.

Los resultados obtenidos alientan la planificación de nuevos experimentos contemplando la obtención de líneas de *T. cruzi knockout* para esta Grx, con el fin de profundizar en la comprensión de sus funciones *in vivo*, en situaciones fisiológicamente relevantes.

5 Bibliografía

Aesif, S. W.; Janssen-Heininger, Y. M. y Reynaert, N. L. (2010). Protocols for the detection of s-glutathionylated and s-nitrosylated proteins in situ. *Methods Enzymol* **474**:289-296.

Aguirre, J.; Rios-Momberg, M.; Hewitt, D. y Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* **13** (3):111-118.

Allaoui, A.; François, C.; Zemzoumi, K.; Guilvard, E. y Ouaiissi, A. (1999). Intracellular growth and metacyclogenesis defects in *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele. *Mol Microbiol* **32** (6):1273-1286.

Allen, E. M. y Mieyal, J. J. (2012). Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins. *Antioxid Redox Signal* **17** (12):1748-1763.

Andrade, L. O. y Andrews, N. W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol* **3** (10):819-823.

Arias, D. G.; Cabeza, M. S.; Erben, E. D.; Carranza, P. G.; Lujan, H. D.; Iñon, M. T. T.; Iglesias, A. A. y Guerrero, S. A. (2011). Functional characterization of methionine sulfoxide reductase A from *Trypanosoma* spp. *Free Radic Biol Med* **50** (1):37-46.

Arias, D. G.; Marquez, V. E.; Cabeza, M. S.; Iglesias, A. A. y Guerrero, S. A. (2013a). Glutathione metabolism in protozoan parasites: making the difference. En *Glutathione: Biochemistry, Mechanisms of Action and Biotechnological Implications*. (Labrou, N. y Fflemetakakis, E., ed) Nova Science Publishers Nueva York. USA.

Arias, D. G.; Marquez, V. E.; Chiribao, M. L.; Gadelha, F. R.; Robello, C.; Iglesias, A. A. y Guerrero, S. A. (2013b). Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: Functional characterization of tryparedoxins revisited. *Free Radic Biol Med* **63**:65-77.

Ariyanayagam, M. R. y Fairlamb, A. H. (2001). Ovothiols and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115** (2):189-198.

Ariyanayagam, M. R.; Oza, S. L.; Mehlert, A. y Fairlamb, A. H. (2003). Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **278** (30):27612-27619.

Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* **10** (1):2-18.

Aslund, F.; Berndt, K. D. y Holmgren, A. (1997). Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J Biol Chem* **272** (49):30780-30786.

Aslund, F.; Ehn, B.; Miranda-Vizuete, A.; Pueyo, C. y Holmgren, A. (1994). Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (21):9813-9817.

Atkinson, H. J. y Babbitt, P. C. (2009). An Atlas of the Thioredoxin Fold Class Reveals the Complexity of Function-Enabling Adaptations. *PLoS Comput Biol* **5** (10):e1000541.

Banerjee, R. (2008). Redox metabolism and life. Pages 1-9 En *Redox Biochemistry*.(Banerjee, R.; Becker, D.; Dickman, B.; Gladyshev, V. y Ragsdale, S., ed) John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, EUA.

Banerjee, R. y Becker, D. (2008). Redox coenzymes. Pages 35-47 En *Redox Biochemistry*.(Banerjee, R.; Becker, D.; Dickman, B.; Gladyshev, V. y Ragsdale, S., ed) John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, EUA.

Barrett, M. P.; Burchmore, R. J. S.; Stich, A.; Lazzari, J. O.; Frasch, A. C.; Cazzulo, J. J. y Krishna, S. (2003). The trypanosomiases. *The Lancet* **362** (9394):1469-1480.

Barycki, J. (2008). Glutathione. Pages 11-21 En *Redox Biochemistry*.(Banerjee, R.; Becker, D.; Dickman, B.; Gladyshev, V. y Ragsdale, S., ed) John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, EUA.

Bollinger, J. M., Jr.; Kwon, D. S.; Huisman, G. W.; Kolter, R. y Walsh, C. T. (1995). Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. Purification, cloning,

overproduction, and characterization of a bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase. *J Biol Chem* **270** (23):14031-14041.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.

Bräutigam, L.; Jensen, L. D. E.; Poschmann, G.; Nyström, S.; Bannenberg, S.; Dreij, K.; Lepka, K.; Prozorovski, T.; Montano, S. J.; Aktas, O.; Uhlén, P.; Stühler, K.; Cao, Y.; Holmgren, A. y Berndt, C. (2013). Glutaredoxin regulates vascular development by reversible glutathionylation of sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110** (50):20057-20062.

Brigelius, R.; Muckel, C.; Akerboom, T. P. y Sies, H. (1983). Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* **32** (17):2529-2534.

Bushweller, J. H.; Aaslund, F.; Wuethrich, K. y Holmgren, A. (1992). Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14.fwdarw.S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* **31** (38):9288-9293.

Caradonna, Kacey L.; Engel, Juan C.; Jacobi, D.; Lee, C.-H. y Burleigh, Barbara A. (2013). Host Metabolism Regulates Intracellular Growth of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Host Microbe* **13** (1):108-117.

Carrillo, C.; Canepa, G. E.; Algranati, I. D. y Pereira, C. A. (2006). Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* **344** (3):936-940.

Castro, H.; Romao, S.; Carvalho, S.; Teixeira, F.; Sousa, C. y Tomas, A. M. (2010). Mitochondrial redox metabolism in trypanosomatids is independent of tryparedoxin activity. *PLoS One* **5** (9):e12607.

Ceylan, S.; Seidel, V.; Ziebart, N.; Berndt, C.; Dirdjaja, N. y Krauth-Siegel, R. L. (2010). The dithiol glutaredoxins of African trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism. *J Biol Chem* **285** (45):35224-35237.

Circu, M. L. y Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* **48** (6):749-762.

Claser, C.; Curcio, M.; de Mello, S. M.; Silveira, E. V.; Monteiro, H. P. y Rodrigues, M. M. (2008). Silencing cytokeratin 18 gene inhibits intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* in HeLa cells but not binding and invasion of trypanosomes. *BMC Cell Biol* **9**:68.

Collinson, E. J. y Grant, C. M. (2003). Role of Yeast Glutaredoxins as Glutathione S-transferases. *J Biol Chem* **278** (25):22492-22497.

Comini, M.; Menge, U. y Flohe, L. (2003). Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol Chem* **384** (4):653-656.

Comini, M.; Menge, U.; Wissing, J. y Flohe, L. (2005). Trypanothione synthesis in crithidia revisited. *J Biol Chem* **280** (8):6850-6860.

Comini, M. A.; Guerrero, S. A.; Haile, S.; Menge, U.; Lunsdorf, H. y Flohe, L. (2004). Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radic Biol Med* **36** (10):1289-1302.

Comini, M. A.; Krauth-Siegel, R. L. y Bellanda, M. (2013). Mono- and dithiol glutaredoxins in the trypanothione-based redox metabolism of pathogenic trypanosomes. *Antioxid Redox Signal* **19** (7):708-722.

Cotgreave, I. A.; Gerdes, R.; Schuppe-Koistinen, I. y Lind, C. (2002). S-glutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of thiol oxidation and catalysis by glutaredoxin. *Methods Enzymol* **348**:175-182.

Coura, J. R. y Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* **115** (1-2):5-13.

Chance, B. y Williams, G. R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **17**:65-134.

Chiang, B.-Y.; Chen, T.-C.; Pai, C.-H.; Chou, C.-C.; Chen, H.-H.; Ko, T.-P.; Hsu, W.-H.; Chang, C.-Y.; Wu, W.-F.; Wang, A. H.-J. y Lin, C.-H. (2010). Protein S-Thiolation

- by Glutathionylspermidine (Gsp): The role of *Escherichia coli* Gsp Synthetase/Amidase in redox regulation. *J Biol Chem* **285** (33):25345-25353.
- Dalle-Donne, I.; Milzani, A.; Gagliano, N.; Colombo, R.; Giustarini, D. y Rossi, R. (2008). Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* **10** (3):445-473.
- Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, G.; Giustarini, D. y Milzani, A. (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* **34** (2):85-96.
- Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Colombo, R. y Milzani, A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med* **43** (6):883-898.
- Dansen, T. B. y Wirtz, K. W. A. (2001). The Peroxisome in Oxidative Stress. *IUBMB Life* **51** (4):223-230.
- De Souza, W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid biology and disease* **1** (1):3.
- De Souza, W.; de Carvalho, T. M. U. y Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* **2010**.
- Discola, K. F.; de Oliveira, M. A.; Rosa Cussioli, J. R.; Monteiro, G.; Barcena, J. A.; Porras, P.; Padilla, C. A.; Guimaraes, B. G. y Netto, L. E. (2009). Structural aspects of the distinct biochemical properties of glutaredoxin 1 and glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **385** (3):889-901.
- Dixon, D. P.; Skipsey, M.; Grundy, N. M. y Edwards, R. (2005). Stress-Induced Protein S-Glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138** (4):2233-2244.
- Dormeyer, M.; Reckenfelderbaumer, N.; Ludemann, H. y Krauth-Siegel, R. L. (2001). Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* **276** (14):10602-10606.
- DosReis, G. A. (2011). Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Braz J Med Biol Res* **44**:84-90.

Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* **82** (1):47-95.

Dufernez, F.; Yernaux, C.; Gerbod, D.; Noel, C.; Chauvenet, M.; Wintjens, R.; Edgcomb, V. P.; Capron, M.; Opperdoes, F. R. y Viscogliosi, E. (2006). The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med* **40** (2):210-225.

Dvorak, J. A. y Howe, C. L. (1976). The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells in vitro. *J Protozool* **23** (4):534-537.

Eckers, E.; Bien, M.; Stroobant, V.; Herrmann, J. M. y Deponte, M. (2009). Biochemical Characterization of Dithiol Glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: The Catalytic Redox Mechanism Redux (dagger). *Biochemistry* **48**:13.

El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A. N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J. F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P. T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasch, A. C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M. J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C. R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J. C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J. L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S. L.; Sanchez, D. O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A. J.; Sisk, E.; Tammi, M. T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D. y Andersson, B. (2005a). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309** (5733):409-415.

El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Blandin, G.; Berriman, M.; Crabtree, J.; Aggarwal, G.; Caler, E.; Renauld, H.; Worthey, E. A.; Hertz-Fowler, C.; Ghedin, E.; Peacock, C.; Bartholomeu, D. C.; Haas, B. J.; Tran, A. N.; Wortman, J. R.; Alsmark, U. C.; Angiuoli, S.; Anupama, A.; Badger, J.; Bringaud, F.; Cadag, E.; Carlton, J. M.; Cerqueira, G. C.;

Creasy, T.; Delcher, A. L.; Djikeng, A.; Embley, T. M.; Hauser, C.; Ivens, A. C.; Kummerfeld, S. K.; Pereira-Leal, J. B.; Nilsson, D.; Peterson, J.; Salzberg, S. L.; Shallom, J.; Silva, J. C.; Sundaram, J.; Westenberger, S.; White, O.; Melville, S. E.; Donelson, J. E.; Andersson, B.; Stuart, K. D. y Hall, N. (2005b). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **309** (5733):404-409.

Fairlamb, A.; Ridley, R. y Vial, H. (2003). Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues. Discoveries and drug development. World Health Organization, Ginebra. Suiza.

Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T. y Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* **227** (4693):1485-1487.

Fairlamb, A. H. y Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* **46**:695-729.

Faundez, M.; Pino, L.; Letelier, P.; Ortiz, C.; López, R.; Seguel, C.; Ferreira, J.; Pavani, M.; Morello, A. y Maya, J. D. (2005). Buthionine Sulfoximine Increases the Toxicity of Nifurtimox and Benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Ch* **49** (1):126-130.

Fernandes, A. P.; Fladvad, M.; Berndt, C.; Andresen, C.; Lillig, C. H.; Neubauer, P.; Sunnerhagen, M.; Holmgren, A. y Vlami-Gardikas, A. (2005). A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **280** (26):24544-24552.

Filser, M.; Comini, M. A.; Molina-Navarro, M. M.; Dirdjaja, N.; Herrero, E. y Krauth-Siegel, R. L. (2008). Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of *Trypanosoma brucei* monothiol glutaredoxin-1. *Biol Chem* **389** (1):21-32.

Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* **194** (1):7-15.

Flohe, L.; Steinert, P.; Hecht, H. J. y Hofmann, B. (2002). Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase. *Methods Enzymol* **347**:244-258.

Foucher, A. L.; Papadopoulou, B. y Ouellette, M. (2006). Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. *J Proteome Res* **5** (7):1741-1750.

Fratelli, M.; Demol, H.; Puype, M.; Casagrande, S.; Villa, P.; Eberini, I.; Vandekerckhove, J.; Gianazza, E. y Ghezzi, P. (2003). Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics* **3** (7):1154-1161.

Fusari, C.; Demonte, A. M.; Figueroa, C. M.; Aleanzi, M. y Iglesias, A. A. (2006). A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Anal Biochem* **352** (1):145-147.

Gaballa, A.; Newton, G. L.; Antelmann, H.; Parsonage, D.; Upton, H.; Rawat, M.; Claiborne, A.; Fahey, R. C. y Helmann, J. D. (2010). Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. *Proc Natl Acad Sci* **107** (14):6482-6486.

Gallogly, M. M.; Starke, D. W. y Mieyal, J. J. (2009). Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxid Redox Signal* **11** (5):1059-1081.

Gerschman, R.; Gilbert, D. L.; Nye, S. W.; Dwyer, P. y Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* **119** (3097):623-626.

Gietz, R. D. y Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature protocols* **2** (1):31-34.

Gilbert, H. F. (1989). Catalysis of thiol/disulfide exchange: single-turnover reduction of protein disulfide-isomerase by glutathione and catalysis of peptide disulfide reduction. *Biochemistry* **28** (18):7298-7305.

Giustarini, D.; Milzani, A.; Aldini, G.; Carini, M.; Rossi, R. y Dalle-Donne, I. (2005). S-nitrosation versus S-glutathionylation of protein sulfhydryl groups by S-nitrosoglutathione. *Antioxid Redox Signal* **7** (7-8):930-939.

- Giustarini, D.; Rossi, R.; Milzani, A.; Colombo, R. y Dalle-Donne, I. (2004). S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med* **8** (2):201-212.
- Gomes, D. S.; Pereira, M. D.; Panek, A. D.; Andrade, L. R. y Eleutherio, E. C. (2008). Apoptosis as a mechanism for removal of mutated cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Grx2 under cadmium exposure. *Biochim Biophys Acta* **1780** (2):160-166.
- Gommel, D. U.; Nogoceke, E.; Morr, M.; Kiess, M.; Kalisz, H. M. y Flohe, L. (1997). Catalytic characteristics of tryparedoxin. *Eur J Biochem* **248** (3):913-918.
- Guerrero, S. A.; Flohe, L.; Kalisz, H. M.; Montemartini, M.; Nogoceke, E.; Hecht, H. J.; Steinert, P. y Singh, M. (1999). Sequence, heterologous expression and functional characterization of tryparedoxin1 from *Crithidia fasciculata*. *Eur J Biochem* **259** (3):789-794.
- Gürtler, R. E.; Diotaiuti, L. y Kitron, U. (2008). Commentary: Chagas disease: 100 years since discovery and lessons for the future. *Int J Epidemiol* **37** (4):698-701.
- Hahn-Deinstrop, E. (2007). *Applied Thin-Layer Chromatography*. Editorial Wiley, USA.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* **141** (2):312-322.
- Heby, O.; Persson, L. y Rentala, M. (2007). Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids* **33** (2):359-366.
- Herrero, E. y de la Torre-Ruiz, M. A. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol Life Sci* **64** (12):1518-1530.
- Herrero, E. y Torre-Ruiz, M. A. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64** (12):1518-1530.
- Hess, D. T.; Matsumoto, A.; Kim, S.-O.; Marshall, H. E. y Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6** (2):150-166.

- Holmgren, A. (1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* **254** (19):9627-9632.
- Holmgren, A. (1985). Glutaredoxin from *Escherichia coli* and calf thymus. *Methods Enzymol* **113**:525-540.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264** (24):13963-13966.
- Holmgren, A. (2008). The thioredoxin system. Pages 68-74 En *Redox Biochemistry*. (Banerjee, R.; Becker, D.; Dickman, B.; Gladyshev, V. y Ragsdale, S., ed) John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, EUA.
- Hunter, W. N.; Bailey, S.; Habash, J.; Harrop, S. J.; Helliwell, J. R.; Aboagye-Kwarteng, T.; Smith, K. y Fairlamb, A. H. (1992). Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design. *J Mol Biol* **227** (1):322-333.
- Irigoin, F.; Cibils, L.; Comini, M. A.; Wilkinson, S. R.; Flohe, L. y Radi, R. (2008). Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic Biol Med* **45** (6):733-742.
- Ismail, S. O.; Paramchuk, W.; Skeiky, Y. A.; Reed, S. G.; Bhatia, A. y Gedamu, L. (1997). Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **86** (2):187-197.
- Izquierdo, A.; Casas, C. y Herrero, E. (2010). Selenite-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*: protective role of glutaredoxins. *Microbiology* **156** (Pt 9):2608-2620.
- Izquierdo, A.; Casas, C.; Muhlenhoff, U.; Lillig, C. H. y Herrero, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryotic cell* **7** (8):1415-1426.
- Jimenez-Ruiz, A.; Alzate, J. F.; Macleod, E. T.; Luder, C. G.; Fasel, N. y Hurd, H. (2010). Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* **3**:104.

Jockers-Scherubl, M. C.; Schirmer, R. H. y Krauth-Siegel, R. L. (1989). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur J Biochem* **180** (2):267-272.

Johansson, C.; Kavanagh, K. L.; Gileadi, O. y Oppermann, U. (2007). Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. *J Biol Chem* **282** (5):3077-3082.

Johansson, C.; Roos, A. K.; Montano, S. J.; Sengupta, R.; Filippakopoulos, P.; Guo, K.; von Delft, F.; Holmgren, A.; Oppermann, U. y Kavanagh, K. L. (2010). The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem J* **433** (2):303-311.

Jönsson, T. J.; Murray, M. S.; Johnson, L. C.; Poole, L. B. y Lowther, W. T. (2005). Structural Basis for the Retroreduction of Inactivated Peroxiredoxins by Human Sulfiredoxin. *Biochemistry* **44** (24):8634-8642.

Kehr, S.; Jortzik, E.; Delahunty, C.; Yates, J. R., 3rd; Rahlfs, S. y Becker, K. (2011). Protein S-glutathionylation in malaria parasites. *Antioxid Redox Signal* **15** (11):2855-2865.

Kelly, J. M.; Taylor, M. C.; Smith, K.; Hunter, K. J. y Fairlamb, A. H. (1993). Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which over-express trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. *Eur J Biochem* **218** (1):29-37.

Kelly, J. M.; Ward, H. M.; Miles, M. A. y Kendall, G. (1992). A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* **20** (15):3963-3969.

Ken, C. F.; Chen, I. J.; Lin, C. T.; Liu, S. M. y Wen, L. (2011). Monothiol glutaredoxin cDNA from *Taiwanofungus camphorata*: a novel CGFS-type glutaredoxin possessing glutathione reductase activity. *J Agric Food Chem* **59** (8):3828-3835.

Koenig, K.; Menge, U.; Kiess, M.; Wray, V. y Flohé, L. (2005). Convenient isolation and kinetic mechanism of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. Vol. 272 (1997) 11908–11915. *J Biol Chem* **280** (8):7407.

- Koppenol, W. H. (1993). The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* **15** (6):645-651.
- Kosec, G.; Alvarez, V. y Cazzulo, J. J. (2006a). Cysteine proteinases of *Trypanosoma cruzi*: from digestive enzymes to programmed cell death mediators. *Biocell* **30** (3):479-490.
- Kosec, G.; Alvarez, V. E.; Agüero, F.; Sanchez, D.; Dolinar, M.; Turk, B.; Turk, V. y Cazzulo, J. J. (2006b). Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. *Mol Biochem Parasitol* **145** (1):18-28.
- Kosec, G.; Alvarez, V. E.; Agüero, F.; Sánchez, D.; Dolinar, M.; Turk, B.; Turk, V. y Cazzulo, J. J. (2006c). Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: Possible candidates for programmed cell death mediators. *Mol Biochem Parasitol* **145** (1):18-28.
- Kosower, N. S.; Kosower, E. M.; Wertheim, B. y Correa, W. S. (1969). Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun* **37** (4):593-596.
- Krauth-Siegel, R. L. y Comini, M. A. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1780** (11):1236-1248.
- Krauth-Siegel, R. L. y Leroux, A. E. (2012). Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid Redox Signal* **17** (4):583-607.
- Krauth-Siegel, R. L. y Ludemann, H. (1996). Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Mol Biochem Parasitol* **80** (2):203-208.
- Kwon, D. S.; Lin, C. H.; Chen, S.; Coward, J. K.; Walsh, C. T. y Bollinger, J. M., Jr. (1997). Dissection of glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Escherichia coli* into autonomously folding and functional synthetase and amidase domains. *J Biol Chem* **272** (4):2429-2436.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259):680-685.

Lillig, C. H.; Berndt, C. y Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* **1780** (11):1304-1317.

Lin, C. H.; Kwon, D. S.; Bollinger, J. M., Jr. y Walsh, C. T. (1997). Evidence for a glutathionyl-enzyme intermediate in the amidase activity of the bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36** (48):14930-14938.

Lind, C.; Gerdes, R.; Hammell, Y.; Schuppe-Koistinen, I.; von Lowenhielm, H. B.; Holmgren, A. y Cotgreave, I. A. (2002). Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch Biochem Biophys* **406** (2):229-240.

Lind, C.; Gerdes, R.; Schuppe-Koistinen, I. y Cotgreave, I. A. (1998). Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **247** (2):481-486.

Lopez, J. A.; Carvalho, T. U.; de Souza, W.; Flohé, L.; Guerrero, S. A.; Montemartini, M.; Kalisz, H. M.; Nogoceke, E.; Singh, M.; Alves, M. J. M. y Colli, W. (2000). Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic Biol Med* **28** (5):767-772.

Ludemann, H.; Dormeyer, M.; Sticherling, C.; Stallmann, D.; Follmann, H. y Krauth-Siegel, R. L. (1998). *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Lett* **431** (3):381-385.

Luikenhuis, S.; Perrone, G.; Dawes, I. W. y Grant, C. M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **9** (5):1081-1091.

Mannick, J. B. (2007). Regulation of apoptosis by protein S-nitrosylation. *Amino Acids* **32** (4):523-526.

Manta, B.; Pavan, C.; Sturlese, M.; Medeiros, A.; Crispo, M.; Berndt, C.; Krauth-Siegel, R. L.; Bellanda, M. y Comini, M. A. (2013). Iron-Sulfur Cluster Binding by Mitochondrial Monothiol Glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: Molecular Basis of

Iron-Sulfur Cluster Coordination and Relevance for Parasite Infectivity. *Antioxid Redox Signal*.

Marquez, V. E.; Arias, D. G.; Piattoni, C. V.; Robello, C.; Iglesias, A. A. y Guerrero, S. A. (2010). Cloning, expression, and characterization of a dithiol glutaredoxin from *Trypanosoma cruzi*. *Antioxid Redox Signal* **12** (6):787-792.

Martinez, L. I.; Piattoni, C. V.; Garay, S. A.; Rodrigues, D. E.; Guerrero, S. A. y Iglesias, A. A. (2011). Redox regulation of UDP-glucose pyrophosphorylase from *Entamoeba histolytica*. *Biochimie* **93** (2):260-268.

Mateo, H.; Marin, C.; Perez-Cordon, G. y Sanchez-Moreno, M. (2008). Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103** (3):271-276.

McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* **108** (8):652-659.

Mesecke, N.; Mittler, S.; Eckers, E.; Herrmann, J. M. y Deponete, M. (2008a). Two Novel Monothiol Glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* Provide Further Insight into Iron-Sulfur Cluster Binding, Oligomerization, and Enzymatic Activity of Glutaredoxins. *Biochemistry* **47** (5):1452-1463.

Mesecke, N.; Mittler, S.; Eckers, E.; Herrmann, J. M. y Deponete, M. (2008b). Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins. *Biochemistry* **47** (5):1452-1463.

Mesecke, N.; Spang, A.; Deponete, M. y Herrmann, J. M. (2008c). A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance. *Mol Biol Cell* **19** (6):2673-2680.

Meyer, Y.; Buchanan, B. B.; Vignols, F. y Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. *Annu Rev Genet* **43** (1):335-367.

Minning, T. A.; Weatherly, D. B.; Atwood, J., 3rd; Orlando, R. y Tarleton, R. L. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genom* **10**:370.

Molina, M. M.; Belli, G.; de la Torre, M. A.; Rodriguez-Manzaneque, M. T. y Herrero, E. (2004). Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J Biol Chem* **279** (50):51923-51930.

Mossner, E.; Huber-Wunderlich, M. y Glockshuber, R. (1998). Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci* **7** (5):1233-1244.

Moutiez, M.; Aumercier, M.; Schoneck, R.; Meziane-Cherif, D.; Lucas, V.; Aumercier, P.; Ouaiissi, A.; Sergheraert, C. y Tartar, A. (1995). Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* **310** (P2):433-437.

Moutiez, M.; Meziane-Cherif, D.; Aumercier, M.; Sergheraert, C. y Tartar, A. (1994). Compared reactivities of trypanothione and glutathione in conjugation reactions. *Chem pharm bull* **42** (12).

Moutiez, M.; Quemeneur, E.; Sergheraert, C.; Lucas, V.; Tartar, A. y Davioud-Charvet, E. (1997). Glutathione-dependent activities of *Trypanosoma cruzi* p52 makes it a new member of the thiol:disulphide oxidoreductase family. *Biochem J* **322** (P1):43-48.

Mumberg, D.; Muller, R. y Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156** (1):119-122.

Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R. y Saravia, N. G. Advances in leishmaniasis. *The Lancet* **366** (9496):1561-1577.

Nelson, J. W. y Creighton, T. E. (1994). Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry* **33** (19):5974-5983.

Newton, G. L.; Arnold, K.; Price, M. S.; Sherrill, C.; Delcardayre, S. B.; Aharonowitz, Y.; Cohen, G.; Davies, J.; Fahey, R. C. y Davis, C. (1996). Distribution of thiols in

microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J Bacteriol* **178** (7):1990-1995.

Niedenthal, R. K.; Riles, L.; Johnston, M. y Hegemann, J. H. (1996). Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12** (8):773-786.

Ojeda, L.; Keller, G.; Muhlenhoff, U.; Rutherford, J. C.; Lill, R. y Winge, D. R. (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281** (26):17661-17669.

Oza, S. L.; Ariyanayagam, M. R. y Fairlamb, A. H. (2002a). Characterization of recombinant glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Crithidia fasciculata*. *Biochem J* **364** (Pt 3):679-686.

Oza, S. L.; Shaw, M. P.; Wyllie, S. y Fairlamb, A. H. (2005). Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **139** (1):107-116.

Oza, S. L.; Tetaud, E.; Ariyanayagam, M. R.; Warnon, S. S. y Fairlamb, A. H. (2002b). A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **277** (39):35853-35861.

Pan, S. y Berk, B. (2007). Glutathiolation regulates Tumor Necrosis Factor- α - induced caspase-3 cleavage and apoptosis. *Circ res* **100**:213-219.

Phillips, G. J. (2001). Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett* **204** (1):9-18.

Piacenza, L.; Alvarez, M. N.; Peluffo, G. y Radi, R. (2009). Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Op Microbiol* **12** (4):415-421.

Piacenza, L.; Irigoin, F.; Alvarez, M. N.; Peluffo, G.; Taylor, M. C.; Kelly, J. M.; Wilkinson, S. R. y Radi, R. (2007). Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem J* **403** (2):323-334.

Piacenza, L.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Kelly, J. M.; Wilkinson, S. R. y Radi, R. (2008). Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J* **410** (2):359-368.

Piacenza, L.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Martinez, A. y Radi, R. (2012). *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. *Antioxid Redox Signal* **19** (7):723-734.

Piacenza, L.; Peluffo, G.; Radi, R.; Cadenas, E. y Packer, L. (2002). l-arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* in the regulation of programmed cell death. *Methods Enzymol* **359**:286-302.

Piattoni, C.; Guerrero, S. y Iglesias, A. (2013). A Differential Redox Regulation of the Pathways Metabolizing Glyceraldehyde-3-Phosphate Tunes the Production of Reducing Power in the Cytosol of Plant Cells. *Int J Mol Sci* **14** (4):8073-8092.

Piñeyro, M. D.; Parodi-Talice, A.; Arcari, T. y Robello, C. (2008). Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* **408** (1-2):45-50.

Porrás, P.; Pedrajas, J. R.; Martínez-Galisteo, E.; Padilla, C. A.; Johansson, C.; Holmgren, A. y Barcena, J. A. (2002). Glutaredoxins catalyze the reduction of glutathione by dihydrolipoamide with high efficiency. *Biochem Biophys Res Commun* **295** (5):1046-1051.

Pujol-Carrion, N. y de la Torre-Ruiz, M. A. (2010). Glutaredoxins Grx4 and Grx3 of *Saccharomyces cerevisiae* play a role in actin dynamics through their Trx domains, which contributes to oxidative stress resistance. *Appl Environ Microbiol* **76** (23):7826-7835.

Qanungo, S.; Starke, D. W.; Pai, H. V.; Mieczal, J. J. y Nieminen, A.-L. (2007). Glutathione Supplementation Potentiates Hypoxic Apoptosis by S-Glutathionylation of p65-NFκB. *J Biol Chem* **282** (25):18427-18436.

Rahlfs, S.; Fischer, M. y Becker, K. (2001). *Plasmodium falciparum* Possesses a Classical Glutaredoxin and a Second, Glutaredoxin-like Protein with a PICOT Homology Domain. *J Biol Chem* **276** (40):37133-37140.

- Rassi Jr, A.; Rassi, A. y Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet* **375** (9723):1388-1402.
- Reckenfelderbaumer, N. y Krauth-Siegel, R. L. (2002). Catalytic properties, thiol pK value, and redox potential of *Trypanosoma brucei* tryparedoxin. *J Biol Chem* **277** (20):17548-17555.
- Reynaert, N. L.; Ckless, K.; Korn, S. H.; Vos, N.; Guala, A. S.; Wouters, E. F. M.; van der Vliet, A. y Janssen-Heininger, Y. M. W. (2004). Nitric oxide represses inhibitory κ B kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (24):8945-8950.
- Rizzuto, R.; Brini, M.; Pizzo, P.; Murgia, M. y Pozzan, T. (1995). Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr Biol* **5** (6):635-642.
- Rodrigues, F.; van Hemert, M.; Steensma, H. Y.; Corte-Real, M. y Leao, C. (2001). Red fluorescent protein (DsRed) as a reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **183** (12):3791-3794.
- Rodríguez-Manzaneque, M. a. T.; Tamarit, J.; Bellón G.; Ros, J. y Herrero, E. (2002). Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes. *Mol Biol Cell* **13** (4):1109-1121.
- Rodriguez-Manzaneque, M. T.; Ros, J.; Cabisco, E.; Sorribas, A. y Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19** (12):8180-8190.
- Rodriguez-Pascual, F.; Redondo-Horcajo, M.; Magan-Marchal, N.; Lagares, D.; Martinez-Ruiz, A.; Kleinert, H. y Lamas, S. (2008). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability. *Molecular and cellular biology* **28** (23):7139-7155.
- Rolon, M.; Vega, C.; Escario, J. A. y Gomez-Barrio, A. (2006). Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* **99** (2):103-107.

- Rouhier, N.; Couturier, J.; Johnson, M. K. y Jacquot, J. P. (2010). Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem Sci* **35** (1):43-52.
- Rozell, B.; Barcena, J. A.; Martinez-Galisteo, E.; Padilla, C. A. y Holmgren, A. (1993). Immunochemical characterization and tissue distribution of glutaredoxin (thioltransferase) from calf. *Eur J Cell Biol* **62** (2):314-323.
- Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Scherer, W. F.; Syverton, J. T. y Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in an stable strain of human malignant epithelila cells (Strin HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. . *J Exp Med* **97** (5):695-710.
- Schmidt, H. y Krauth-Siegel, R. L. (2003). Functional and physicochemical characterization of the thioredoxin system in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **278** (47):46329-46336.
- Schuppe-Koistinen, I.; Moldeus, P.; Bergman, T. y Cotgreave, I. A. (1994). S-thiolation of human endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase after hydrogen peroxide treatment. *Eur J Biochem* **221** (3):1033-1037.
- Sedlak, J. y Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* **25** (1):192-205.
- Shaked, Z.; Szajewski, R. P. y Whitesides, G. M. (1980). Rates of thiol-disulfide interchange reactions involving proteins and kinetic measurements of thiol pKa values. *Biochemistry* **19** (18):4156-4166.
- Sousa, A. F.; Gomes-Alves, A. G.; Benitez, D.; Comini, M. A.; Flohe, L.; Jaeger, T.; Passos, J.; Stuhlmann, F.; Tomas, A. M. y Castro, H. (2014). Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med* **73C**:229-238.

- Steenkamp, D. J. (1993). Simple methods for the detection and quantification of thiols from *Crithidia fasciculata* and for the isolation of trypanothione. *Biochem J* **292** (P1):295-301.
- Stempin, C.; Giordanengo, L.; Gea, S. y Cerbán, F. (2002). Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J Leuk Biol* **72** (4):727-734.
- Stuart, K.; Brun, R.; Croft, S.; Fairlamb, A.; Gurtler, R. E.; McKerrow, J.; Reed, S. y Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* **118** (4):1301-1310.
- Sui, L.; Warren, J. C.; Russell, J. P. y Stourman, N. V. (2012). Comparison of the functions of glutathionylspermidine synthetase/amidase from *E. coli* and its predicted homologues YgiC and YjfC. *Int J Biochem Mol Biol* **3** (3):302-312.
- Tabor, H. y Tabor, C. W. (1975). Isolation, characterization, and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **250** (7):2648-2654.
- Taylor, M. C.; Huang, H. y Kelly, J. M. (2011). Genetic techniques in *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* **75**:231-250.
- Thomson, L.; Denicola, A. y Radi, R. (2003). The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys* **412** (1):55-64.
- Trujillo, M.; Alvarez, M.; Piacenza, L.; Hugo, M.; Peluffo, G. y Radi, R. (2013). Peroxynitrite as a cytotoxic effector against *Trypanosoma cruzi*: oxidative killing and antioxidant resistance mechanisms. Pages 215-237 En *Trypanosomatid Diseases*.(Jaeger, T.; Koch, O. y Flohé, L., ed) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Alemania.
- Turcotte, B.; Liang, X. B.; Robert, F. y Soontorngun, N. (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res* **10** (1):2-13.

- Whitesides, G. M.; Lilburn, J. E. y Szajewski, R. P. (1977). Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent. *J Org Chem* **42** (2):332-338.
- Wilkinson, S. R. y Kelly, J. M. (2003). The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol Chem* **384** (4):517-525.
- Wilkinson, S. R.; Meyer, D. J. y Kelly, J. M. (2000a). Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem J* **352 Pt 3**:755-761.
- Wilkinson, S. R.; Meyer, D. J.; Taylor, M. C.; Bromley, E. V.; Miles, M. A. y Kelly, J. M. (2002a). The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J Biol Chem* **277** (19):17062-17071.
- Wilkinson, S. R.; Obado, S. O.; Mauricio, I. L. y Kelly, J. M. (2002b). *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (21):13453-13458.
- Wilkinson, S. R.; Taylor, M. C.; Touitha, S.; Mauricio, I. L.; Meyer, D. J. y Kelly, J. M. (2002c). TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **364** (Pt 3):787-794.
- Wilkinson, S. R.; Temperton, N. J.; Mondragon, A. y Kelly, J. M. (2000b). Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **275** (11):8220-8225.
- Wyllie, S.; Oza, S. L.; Patterson, S.; Spinks, D.; Thompson, S. y Fairlamb, A. H. (2009). Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. *Mol Microbiol* **74** (3):529-540.
- Xiao, R.; Lundstrom-Ljung, J.; Holmgren, A. y Gilbert, H. F. (2005). Catalysis of thiol/disulfide exchange. Glutaredoxin 1 and protein-disulfide isomerase use different

mechanisms to enhance oxidase and reductase activities. *J Biol Chem* **280** (22):21099-21106.

Yasumura, Y. y Kawakita, Y. (1963). Studies on SV40 in tissue culture-preliminary step for cancer research in vitro. *Nippon rinsh* **21**:1201-1215.

Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* **78** (1):87-111.

Zaffagnini, M.; Bedhomme, M.; Groni, H.; Marchand, C. H.; Puppo, C.; Gontero, B.; Cassier-Chauvat, C.; Decottignies, P. y Lemaire, S. D. (2012). Glutathionylation in the Photosynthetic Model Organism *Chlamydomonas reinhardtii*: A Proteomic Survey. *Mol Cell Proteom* **11** (2).

Zaffagnini, M.; Michelet, L.; Marchand, C.; Sparla, F.; Decottignies, P.; Le Marechal, P.; Miginiac-Maslow, M.; Noctor, G.; Trost, P. y Lemaire, S. D. (2007). The thioredoxin-independent isoform of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation. *FEBS J* **274** (1):212-226.

Zhang, H. y Forman, H. J. (2012). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol* **23** (7):722-728.