



Universidad de Granada

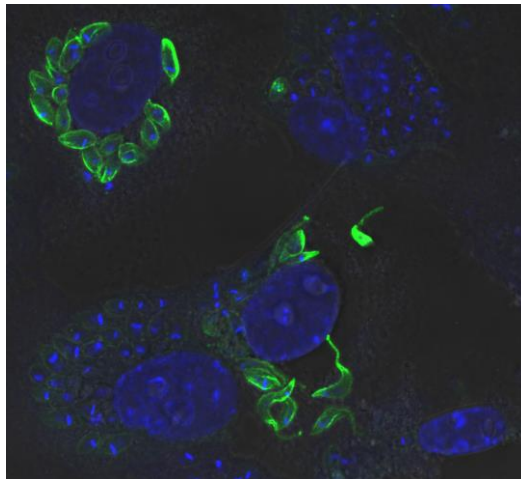


Instituto de Biotecnología

Caracterización molecular y funcional de las Prohibitinas 1 y 2 de *Trypanosoma cruzi*

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Biomedicina



Ana Karina Ibarrola Vannucci

2019



Universidad de Granada



Instituto de Biotecnología

**Caracterización molecular y funcional
de las Prohibitinas 1 y 2 de
*Trypanosoma cruzi***

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Biomedicina

Memoria presentada por

Ana Karina Ibarrola Vannucci

para optar al título de Doctora en Biomedicina
(con Mención de Doctorado Internacional)

VºBº de los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz Fdo. Susana Vílchez Tornero

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ana Karina Ibarrola Vannucci
ISBN: 978-84-1306-214-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/55926>

La doctoranda **Ana Karina Ibarrola Vannucci** y los directores de la tesis **Antonio Osuna Carrillo de Albornoz** y **Susana Vílchez Tornero**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 22 de febrero de 2019

Directores de la Tesis

Fdo. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz Fdo. Susana Vílchez Tornero

Doctoranda

Fdo. Ana Karina Ibarrola Vannucci

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el “Grupo de Investigación Bioquímica y Parasitología Molecular CTS183” perteneciente al Instituto de Biotecnología y Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada. La Movilidad Internacional se ha realizado en el “Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas” perteneciente al Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI), CONICET, Buenos Aires.

Parte de los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido presentados en:

- XX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA). Tenerife (España). 19 al 21 de julio de 2017. Póster presentado: **Sobreexpresión de las PHB1 y PHB2 de *Trypanosoma cruzi*. Ibarrola, A., Vílchez, S., Osuna, A.**
- IV Simposio Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas. Santa Fe (Argentina). 21 al 23 de noviembre 2016. Póster presentado: **Clonación y sobreexpresión de las Prohibitinas 1 y 2 en *Trypanosoma cruzi*. Ana Karina Ibarrola Vannucci, Susana Vílchez Tornero, María de los Ángeles Curto, Alejandro Gabriel Schijman, Antonio Osuna Carrillo de Albornoz.**
- XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA) y del II Encuentro Internacional de Parasitólogos de España. Vitoria-Gasteiz (España). 23 al 25 de julio de 2015. **Póster presentado: Clonación y expresión de la PHB1 y PHB2 de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Ibarrola, A., Vílchez, S., Osuna, A.**

- XII Congreso Centroamericano del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, ACACPMT Punta Cana (República Dominicana). 12, 13 y 14 de Junio del 2015. Póster presentado: **Rastreo de los genes codificantes de la PHB1 y PHB2 en diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Ibarrola, A., Vílchez, S., Osuna, A.**

Y publicados (o en elaboración):

- Cruz-Bustos, T[†]., **Ibarrola-Vannucci, A. K[†].,** Díaz-Lozano, I., Ramírez, J. L., & Osuna, A. (2018). Characterization and functionality of two members of the SPFH protein superfamily, prohibitin 1 and 2 in *Leishmania major*. *Parasites & Vectors*, 11(1), 622. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3195-8>.

[†]: contributed equally to this work

- **Ibarrola-Vannucci, A. K.,** Vílchez, S., Retana Moreira, L., De Pablos, L.M., Cruz-Bustos, T., Schijman, A.G., Ramírez, J. L., & Osuna, A. (2019). The Role of Prohibitins in *Trypanosoma cruzi*'s life cycle.

“Una locura es hacer la misma cosa una y otra vez esperando obtener resultados diferentes. Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”

Albert Einstein

Agradecimientos

A mi país, gracias por la beca otorgada para realizar el Doctorado, que sin la ayuda y confianza esto no hubiera sido posible.

A mis tutores, a Antonio por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, su tiempo, por toda paciencia y por compartir su valiosa experiencia durante el desarrollo de la tesis. A Susana por su apoyo, por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas, por su orientación constante, su paciencia y tiempo dedicado. Muchas gracias a los dos.

Al Dr. José Luis Ramírez de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) (Venezuela) por su interés, buena predisposición, colaboración y seguimiento constante. Al Dr. Alejandro Schijman del Instituto INGEBI-CONICET (Argentina) por haberme aceptado en su laboratorio para poder realizar la estancia internacional y por su interés en ayudar siempre. Al Dr. Luis Miguel de Pablos por estar siempre dispuesto a ayudar y sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio, a Lis mi compañera de mesa de trabajo y chocolates gracias por el apoyo y consejos. A Víctor, Tania, Mary y Sagrario por estar siempre dispuestos a darme una mano y por todos los momentos compartidos. Y sobre todo a Albert y a Romi, que hicieron que mi etapa final sea más llevadera, por todos los ánimos y momentos compartidos, sin ustedes no hubiera sido igual. A MJ, Lau, Ana, Rose, Martita y Ric por estar siempre presentes y sacarme una sonrisa. Al tener la familia lejos, los amigos se convierten en familia. Y por supuesto a mis amigos de toda la vida San, Perli, Nadius, Lou, Fabi, Natha, Silvita, Humbert, Huguito y Carlitos que aún en la distancia siempre sentí su apoyo y buena energía.

A mis padres Hugo y Gisley, gracias por su apoyo incondicional y por sentirse siempre tan orgullosos de mí. A mi madre, gracias por estar siempre para mí, por sus largas conversaciones y ánimos. A mis hermanos y sobrinos, que siempre me sacan una sonrisa. A mis abuelitas, Vovo Diva y a Pachi que en paz descanse, gracias por todo el cariño y apoyo.

Sin todos ustedes esto no hubiera sido posible, un sincero gracias.

Tabla de contenido

Tabla de contenido	i
Lista de abreviaturas y acrónimos	ix
Resumen	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas	3
1.1.1 Epidemiología	4
1.1.2 Triatomíneos	6
1.1.3 Vías de transmisión de la Enfermedad de Chagas	7
1.1.4 Manifestaciones clínicas	12
1.1.5 Diagnóstico	14
1.1.6 Tratamiento	15
1.2. <i>T. cruzi</i>	18
1.2.1 Fases evolutivas de <i>T. cruzi</i>	18
1.2.2 Ciclo biológico	19
1.2.3 Filogenia	21
1.2.4 Biología y estructuras celulares	22
1.2.5 Genómica	25
1.3 Disrupción genómica mediante CRISPR/Cas9	28
1.4 Productos reactivos del oxígeno (ROS) y <i>T. cruzi</i>	34
1.5. Superfamilia SPFH	43
1.6 La familia de las prohibitinas	48
1.7 Las PHBs en tripanosomátidos	49

2. OBJETIVOS	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1. Cultivos celulares y manejo de tripanosomátidos	59
3.1.1 Células Vero.....	59
3.1.2 Medio y condiciones de cultivos de los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i>	60
3.1.3 Aislamiento de exovesículas	62
3.1.4 Medio y condiciones de cultivos de <i>Leishmania major</i> y <i>Trypanosoma brucei</i>	63
3.1.5 Criopreservación de las diferentes formas de los tripanosomátidos	63
3.2 <i>Escherichia coli</i>	64
3.2.1 Cepas bacterianas utilizadas.....	64
3.2.2 Condiciones de cultivo.....	64
3.2.3 Criopreservación	64
3.3 Plásmidos utilizados	65
3.3.1 Plásmido pGEM-T.....	65
3.3.2 Plásmido pQE30-Xa	66
3.3.3 Plásmido pET-41c	67
3.3.4 Plásmido pTREXn-GW TAP-tag	68
3.3.5 Plásmido pUCsgRNA	69
3.3.6 Plásmido pTREXn/cas9	69
3.4 Aislamiento y concentración de ADN	70
3.4.1 Extracción de ADN plasmídico.....	70
3.4.2 Extracción de ADN genómico	71

3.4.3 Concentración de ADN.....	71
3.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	71
3.6 Cuantificación de la expresión de genes.....	75
3.6.1 Aislamiento del ARN y retrotranscripción.....	75
3.6.2 Amplificación y cuantificación de los niveles de expresión de las PHBs por RT-qPCR.....	76
3.7 Técnicas de manipulación del ADN y transferencia de plásmidos	77
3.7.1 Determinación de la concentración de ADN.....	77
3.7.2 Digestión del ADN	78
3.7.3 Desfosforilación de ADN con fosfatasa alcalina.....	78
3.7.4 Electroforesis del ADN y ARN en geles de agarosa	78
3.7.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y kit de purificación de productos de PCR.....	79
3.7.6 Reacción de Ligación con la T4 ADN ligasa.....	79
3.7.7 Estrategia Ek/LIC	79
3.7.8 Reacción de recombinación mediante la LR Clonasa.....	81
3.7.9 Transformación bacteriana mediante choque térmico	83
3.7.10 Rastreo de clones	84
3.8 Secuenciación del ADN.....	84
3.9 Técnicas para el estudio de proteínas	85
3.9.1 Cuantificación de proteínas.....	85
3.9.2 Preparación de las muestras de proteínas para electroforesis.....	85
3.9.3 Electroforesis en SDS-PAGE.....	85
3.9.4 Western blot	86
3.9.5 Tinción de los geles con azul de Coomassie	87

3.6.6 Tinción de los geles con nitrato de plata.....	88
3.9.7 Diálisis	89
3.10 Expresión y purificación de proteínas recombinantes	89
3.10.1 Expresión de las prohibitinas 1 y 2 de <i>T. cruzi</i> en <i>E. coli</i>	89
3.10.2 Aislamiento y purificación de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión.....	91
3.10.3 Cromatografía de afinidad.....	91
3.10.4 Purificación de proteínas recombinantes a través de geles de SDS-PAGE	92
3.11 Obtención de anticuerpos policlonales	93
3.12 Determinación de la capacidad antigénica de las PHBs mediante la técnica ELISA.....	94
3.13 Ensayos con hierro.....	95
3.13.1 Cromatografía de afinidad mediante matriz cromatografica ligada a iones Fe^{3+}	95
3.13.2 Cultivos suplementados con citrato de amonio férrico	97
3.14 Microscopia confocal y electrónica de transmisión	97
3.14.1 Microscopia confocal.....	97
3.14.2 Microscopia electrónica de transmisión.....	99
3.14 Sobreexpresión de las proteínas PHB1 y PHB2 en <i>T. cruzi</i>	101
3.15.1 Clonación y transfección.....	101
3.15.2 Purificación de las PHBs mediante cromatografía de afinidad en tándem	103
3.16 Disrupción genética por CRISPR/cas9	106
3.17 Ensayos de cuantificación del estrés oxidativo mediante citometría de flujo.....	107

3.18 Ensayos de protección del ADN frente al daño inducido por H ₂ O ₂ .	108
3.19 Bases de datos y herramientas bioinformáticas utilizadas.	109
3.19.1 NCBI (<i>The National Center for Biotechnology Information</i>). ..	109
3.19.2 TriTrypDB	109
3.18.3 EuPaGDT	110
3.19.4 Servidor de herramientas proteómicas ExPASy (<i>Expert Protein Analysis System</i>).....	110
3.19.5 EMBOSS (<i>The European Molecular Biology Open Software Suite</i>).....	110
3.19.6 CLUSTAL Omega.....	111
3.19.7 Otros programas utilizados.....	111
3.19.8 Programas para la edición de secuencias, imágenes y gráficos.	113
3.20 Análisis estadísticos.....	113
3.21 Soluciones y medios	113
A. Cultivos celulares:	113
B. Cultivos y manejo de tripanosomátidos	114
C. Medios de cultivos y soluciones utilizados en <i>Escherichia coli</i>	114
D. Soluciones para electroforesis en gel de agarosa:	115
E. Soluciones para la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida:	115
F. Soluciones de tinción de geles de poliacrilamida:	117
G. Soluciones utilizadas en los Western blots	118
H. Soluciones utilizadas en la solubilización y purificación de proteínas	118
I. Soluciones utilizadas para la realización de los ELISA	120
J. Soluciones para los estudios de microscopia.....	121

4. RESULTADOS	123
4.1 Estudio y obtención de las PHBs recombinantes de <i>T. cruzi</i>	125
4.1.1 Análisis bioinformático	125
4.1.2 Expresión heteróloga de los genes <i>phb1</i> y <i>phb2</i> en la cepa M15 de <i>E. coli</i>	130
4.2 Inmunización, estudios de especificidad de los anticuerpos y estudios de expresión de las proteínas nativas	145
4.2.1 Inmunización de la PHBs en animales y titulación de los anticuerpos en los sueros obtenidos	145
4.2.2 Estudio del patrón de reconocimiento antigénico de los anticuerpos policlonales obtenidos frente a PHB1 y PHB2	146
4.2.3 Análisis de los niveles de expresión de las PHBs nativas en diferentes estadios del parásito	147
4.2.3 Estudio de la especificidad de los anticuerpos obtenidos, ensayo frente a diferentes especies	149
4.2.3 Análisis de los niveles de expresión de las PHBs nativas en las diferentes unidades discretas de tipificación (DTUs) del parásito	152
4.3 Estudios de la expresión génica mediante RT-qPCR	154
4.3.1 Evaluación de la calidad del ARN	155
4.3.2 Estudio de la expresión génica	156
4.4 Inmunolocalización de las PHBs nativas	157
4.4.1 Inmunolocalización mediante microscopía láser confocal	157
4.4.2 Inmunolocalización de PHB1 y PHB2 mediante microscopía electrónica de transmisión	160
4.5 Localización de las PHBs en exovesículas	165
4.6 Ensayos de unión de las PHBs a Fe ³⁺	167
4.6.1 Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados	168

4.5.2	Expresión de las proteínas PHB1 y PHB2 en cultivos de parásitos en presencia de citrato de amonio férrico	170
4.7	Estudios de la sobreexpresión de las PHB1 y PHB2 en <i>T. cruzi</i>	172
4.7.1	Clonación de los genes <i>phbs</i> en el vector de expresión pTREX-TAPtag-GW	173
4.7.2	Transfección y sobreexpresión de las PHBs en <i>T. cruzi</i>	176
4.7.3	Estudio fenotípico de las líneas que sobreexpresan las PHBs en <i>T. cruzi</i>	182
4.7.4	Curvas de crecimiento	183
4.7.5	Cinética de diferenciación de las líneas celulares que sobreexpresan las PHBs	184
4.7.6	Sobreexpresión de las PHBs en los diferentes estadios	185
4.7.7	Microscopia de fluorescencia confocal durante el proceso de infección <i>in vitro</i> con los parásitos que sobreexpresan las PHBs	186
4.7.8	Evaluación del estrés oxidativo en <i>T. cruzi</i> de las líneas celulares que sobreexpresan las PHBs	189
4.7.9	Purificación de las PHBs por afinidad en tándem	191
4.8	Disrupción genética de PHB1 y PHB2 mediante el sistema CRISPR/cas9	194
4.8.1	Diseño y localización de los ARN guías a partir de los genes <i>phb1</i> y <i>phb2</i> de <i>T. cruzi</i>	195
4.8.2	Amplificación de los diferentes ARNs guías	198
4.8.3	Amplificación de los fragmentos lineales FRL1 y FRL2	204
4.8.4	Transfección de <i>T. cruzi</i> con los diferentes ARNg.....	208
4.9	Protección de las PHBs al daño inducido por el H ₂ O ₂	215
4.10	Capacidad Antigénica de la proteína recombinante PHB2 de <i>T. cruzi</i> en el potencial diagnóstico de pacientes chagásicos.	218
5.	DISCUSIÓN.....	221

Tabla de contenidos

6. CONCLUSIONES	255
7. BIBLIOGRAFÍA	267

Lista de abreviaturas y acrónimos

~	aproximado
Aa	aminoácido
Ac	anticuerpo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa
ADNc	ADN copia
ADNk	ADN de kinetoplástido
ADNg	ADN genómico
ADNp	ADN plasmídico
ARNasa	ribonucleasa
ARN	ácido ribonucleico
ARNg	ARN guía
ARNr	ARN ribosómico
ARNm	ARN mensajero
CRISPR	repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, <i>Clustered Regularly Interspaced Short Pa- lindromic Repeats</i>
CRISPR/Cas9	CRISPR asociado a la endonucleasa Cas9
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
dNTP	desoxinucleótidos
DTT	1,4- Ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético
DSB	roturas de doble hebras, <i>Double Strand Breaks</i>
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPI	glicosilinositol fosfato, <i>GlycosilPhosphate Inositol</i>
D.O.	densidad óptica
GFP	proteína verde Fluorescente, <i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutación S Transferasa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HR	recombinación homóloga, <i>Homologous Recombination</i>
IP	yoduro de propidio
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
MCS	sitio de clonación múltiple
MIF	intensidad de fluorescencia media
MMEJ	unión final mediada por microhomología; <i>Microhomology Mediated End Joining</i>
NHEJ	unión final no homóloga, <i>Non-Homologous end-joining</i>
pb	pares de bases

PCR	reacción en cadena de la polimerasa, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFR	cuerda paraxial, <i>Paraflagellar Rod</i>
PHB	prohibitina
RE	retículo endoplasmático
ROS	especies reactivas de oxígeno; <i>Reactive Oxygen Species</i>
RS	especies reactivas, <i>Reactive Species</i>
RT-PCR	reverso transcripción y PCR, <i>Reverse Transcription PCR</i>
RT-qPCR	RT-PCR cuantitativa; <i>quantitative RT-PCR</i>
TAPtag	marcador de purificación por afinidad en tándem, <i>Tandem Affinity Purification Tag</i>
TEV	virus del grabado del tabaco, <i>Tobacco Etch Virus</i>
SPFH	estomatina-prohibitina-flotilina-HflK/C, <i>Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C</i>
UTR	región no codificante; <i>UnTranslated Region</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucósido

Resumen

La Enfermedad de Chagas es la tercera enfermedad parasitaria más común a nivel mundial, estimándose que unos 10 millones de personas se encuentran infectadas, con casi 40.000 nuevos casos y produciendo aproximadamente 8.000 muertes por año. La enfermedad está presente en 21 países de Latinoamérica donde es originalmente endémica. Representando actualmente un problema de salud pública a nivel mundial, debido a las migraciones desde regiones endémicas de Latinoamérica a países no endémicos de Norteamérica (norte de Estados Unidos y Canadá), sudeste asiático (Japón y Australia) y Europa (España, Portugal, Francia o Suecia entre otros) generado la diseminación del parásito *Trypanosoma cruzi* por vías no vectoriales.

El ciclo completo de *T. cruzi* es digenético debido a su desarrollo en mamíferos y en insectos triatomíneos que actúan como hospedadores intermediarios. *T. cruzi* presenta tres fases biológicas y fisiológicamente diferentes, las cuales se identifican morfológicamente por la posición relativa del kinetoplasto en relación al núcleo y el flagelo, siendo las mismas: epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes (metacíclicos o sanguíneos), de las cuales los epimastigotes son la forma replicativa en el insecto vector y los amastigotes en el hospedador mamífero.

La enfermedad de Chagas puede resultar en diferentes formas clínicas, que dependen de factores ambientales y genéticos tanto del hospedador como del parásito. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se pueden dividir en fase aguda o crónica, siendo la fase aguda de duración corta (20 a 30 días) y alta parasitemia en sangre, en la cual se presenta signos clínicos poco definidos, como fiebre, astenia, cefalea, entre otros. Alcanzando posteriormente la fase crónica, las cuales se las puede dividir en asintomática y sintomática. En la primera, el sistema inmunitario del hospedador limita la proliferación inicial pero el parásito ejerce una inmunomodulación que

permite la persistencia y una baja parasitemia, permaneciendo durante años sin presentar signos clínicos de enfermedad. La segunda se caracteriza por la aparición de manifestaciones clínicas donde los individuos infectados, según el tropismo de la cepa que poseen, desarrollarán lesiones irreversibles del sistema nervioso autónomo, en el corazón, esófago, colon y sistema nervioso periférico, los cuales pueden llegar a ser letales.

Hasta hoy en día no se cuenta con una vacuna contra la enfermedad de Chagas, teniendo disponible sólo dos fármacos para el tratamiento, el Benznidazol y el Nifurtimox, los cuales pueden curar al menos el 50% de las infecciones que se encuentran en la fase aguda. Sin embargo, una vez que alcanzan la fase crónica, los medicamentos sólo ayudan a controlar la infección. El inconveniente de dichos fármacos es la necesidad de un período de tratamiento extenso y la variedad de efectos colaterales, pudiendo afectar incluso al sistema nervioso. Por todo ello, es de suma importancia buscar nuevas dianas terapéuticas o de diagnóstico para el control de la enfermedad, para lo cual es imprescindible entender la complejidad de su biología y de los diferentes estadios dentro de su ciclo de vida, así como los mecanismos que lo ayudan a sobrevivir.

Las Prohibitinas 1 (PHB1) y 2 (PHB2) son dos proteínas homólogas, las cuales pertenecen a la super familia SPFH (*Stomatin, Prohibitin, Flotillin and HflC*). En *T. cruzi* presentan un 41% de identidad entre sus secuencias aminoacídicas y ambas contienen el motivo PHB, también conocido como SPFH o Band-7, que se encuentra próximo al segmento transmembrana en el extremo N-terminal de las proteínas. La función exacta de dicho motivo es aún desconocida, aunque se encuentra conservado a lo largo de la escala evolutiva, desde procariontes a eucariontes, incluyendo al hombre; sugiriendo así una importante función celular. Se han descrito miembros de la familia de las PHBs con distintas localizaciones, encontrándose principalmente en la membrana interna de la mitocondria, el núcleo y la membrana plasmática, las

cuales han sido relacionadas con funciones como la proliferación celular, envejecimiento, apoptosis, estabilización del ADN mitocondrial, mantenimiento de la integridad mitocondrial, entre otros.

El principal propósito de esta Tesis Doctoral es la caracterización molecular y el estudio de la funcionalidad de las proteínas PHB1 y PHB2 de *T. cruzi*. Para ello, se ha realizado la clonación y expresión de las PHBs de *T. cruzi* en *E. coli*, a fin de obtener anticuerpos a partir de las proteínas recombinantes. Dichos anticuerpos se han utilizado para la determinación de la localización subcelular de las PHBs en diferentes estadios del parásito a través de microscopia de fluorescencia y electrónica, observándose una localización diferencial entre las distintas formas. Asimismo se ha analizado la expresión de las proteínas de interés en diferentes formas de *T. cruzi*, observándose una mayor expresión en el estadio de epimastigotes. También se ha determinado que al igual que las PHBs de *L. major*, las de *T. cruzi* poseen la capacidad de unión al Fe^{3+} y en ensayos *in vitro*, pueden proteger al ADN de la acción del H_2O_2 inhibiendo la reacción de Fenton, en la cual se forman especies reactivas de oxígeno (ROS).

Para determinar el papel de las PHBs en la biología del parásito se han sobreexpresado las PHBs de *T. cruzi* de forma exitosa y mediante el sistema CRISPR/Cas9 se ha intentado realizar líneas *knockout* para los genes *phb1* y *phb2*, de las cuales se ha conseguido una línea disminuida para la PHB1 y otra línea *knockout* para la PHB2, demostrando que la falta del gen *phb2* es letal para el parásito. Asimismo, con las líneas que sobreexpresaron a las PHBs se ha determinado el posible papel de dichas proteínas en los diferentes estadios de *T. cruzi*, observándose que en el estadio de epimastigotes la sobreexpresión de las PHBs no afectó al crecimiento del protozoo. Además se determinó que tanto la PHB1 como la PHB2 están implicadas en la protección al parásito frente a condiciones de estrés oxidativo. En este estudio también se ha determinado que las PHBs no favorecen la infección, pero una vez los

tripomastigotes penetraron en las células, si se observó que la sobreexpresión de las PHBs en el estadio de amastigotes favoreció la capacidad de multiplicación intracelular del parásito.

Finalmente, la antigenicidad de la PHB2 ha quedado demostrada dado que la proteína recombinante PHB2 es reconocida antigénicamente por los sueros de pacientes chagásicos.

Summary

Chagas disease is the third most common parasitic disease worldwide. Approximately 10 million people are infected, with almost 40,000 new cases and 8,000 deaths per year. This disease is present in 21 countries in Latin America where it is originally endemic. Due to migrations from endemic regions of Latin America to non-endemic countries of North America (northern of the United States and Canada), Southeast Asia (Japan and Australia) and Europe (Spain, Portugal, France, Sweden, etc.) this disease represents a worldwide public health problem, spreading the parasite *Trypanosoma cruzi* without the participation of the vector.

T. cruzi has a digenetic life cycle that includes developmental stages in mammals and in triatomine insects, which acts as intermediate hosts. This parasite has three different biological and physiological phases, which can be differentiated by the position of the kinetoplast in relation to the flagella and the nucleus, among others characteristics. These phases are epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes (metacyclic or bloodstream), being the epimastigote stage the replicative form inside the insect vector and the amastigote stage inside the mammalian host.

Chagas disease can result in different clinical forms, which depend on environmental and genetic factors of the host and the parasite. The clinical manifestations of this disease can be divided into acute and chronic phases. The acute phase is characterized for having short duration (20 to 30 days) and for the presence of high parasitemia in blood, with inespecific clinical signs such as fever, asthenia, and headache, among others. Later, the chronic phase develops and can be divided into asymptomatic and symptomatic. In the first, the host immune system limits the initial proliferation, but the parasite exerts immunomodulation that allows persistence and a low parasitemia, remaining for years without presenting clinical signs. The second is characterized by the

appearance of clinical manifestations, where the infected individuals depending, on the tropism of the infecting parasite's strain, could develop irreversible lesions of the autonomic nervous system, the heart, esophagus, colon and peripheral nervous system.

At the moment, there is no vaccine against Chagas disease and only two drugs are available for the treatment: Benznidazole and Nifurtimox. These drugs can cure at least 50% of the infections while in the acute phase. However, once they reach the chronic phase, medication can only help to control the infection. The drawback of these drugs are the need of a long treatment period and a wide range of side effects, including the nervous system. Therefore, to improve the control of Chagas disease it is important to search for new diagnostic or therapeutic targets, and in this quest, it is essential to understand the complexity of the biology and the different stages of the parasite within its life cycle, as well as their survival mechanisms.

Prohibitins 1 (PHB1) and 2 (PHB2) are two homologous proteins, that belong to the superfamily SPFH (Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflC). In *T. cruzi*, they have 41% of identity in their amino acid sequences and both contain the PHB motif, also known as SPFH or Band-7, which is located close to the transmembrane segment at the N-terminal of these proteins. The exact function of this motif is still unknown, but it is conserved along the evolutionary scale, from prokaryotes to eukaryotes, including man, thus suggesting an important cellular function. Members of the PHBs family have been described at different cell locations, mainly found in the inner mitochondrial membrane, the nucleus and the plasma membrane. These proteins have been associated with many functions such as cell proliferation, ageing, apoptosis, the stabilization of mitochondrial DNA, and maintenance of mitochondrial integrity, among others.

The main purpose of this Doctoral Thesis is the molecular characterization and the functional study of the PHB1 and PHB2 proteins of *T. cruzi*. First, in order to obtain antibodies, cloning and expression of the PHBs from *T. cruzi* in *E. coli* have been carried out. These antibodies have been employed to determine the subcellular localization of the PHBs through fluorescence and electronic microscopy, observing a differential localization among the different forms of the parasite. Likewise, it has been compared the expression of these proteins in the different forms of *T. cruzi*, observing a major expression in the epimastigote stage. It has also been determined in vitro that PHBs from *T. cruzi*, as well as *L. major*, possess the ability to bind Fe^{3+} and protect the DNA from the action of H_2O_2 , inhibiting the Fenton reaction, which reactive oxygen species (ROS) are generated.

To determine the role of PHBs in the parasite's biology, these proteins have been successfully overexpressed and attempted to make knockout lines for the *phb1* and *phb2* genes. For the first line, a decrease in the expression of the PHB1 has been observed and for the second one, a knockout line, the lack of *phb2* was demonstrated to be lethal to the parasite. In the stage of epimastigotes, the lines overexpressing the PHBs did not affect the parasite's growth, but these lines were more capable to resist oxidative stress. In this study, it was also determined that the PHBs do not favor the infection, but once the trypomastigotes penetrated the host cells, those cells overexpressing PHBs favored the intracellular multiplication of the amastigotes forms.

Finally, antigenicity of PHB2 has been demonstrated since the recombinant PHB2 protein is recognized by the sera of chagasic patients.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas es la tercera enfermedad parasitaria más común a nivel mundial después de la malaria y la esquistosomiasis (1). Se estima que aproximadamente unos 10 millones de personas se encuentran infectadas a nivel mundial (2,3), con unos casi 40.000 nuevos casos y aproximadamente 8.000 muertes por año (4), presente en 21 países de Latinoamérica donde es originalmente endémica. Se calcula que solo en Colombia, el gasto anual por cuidados médicos fue de 267 millones de dólares en 2008, con un gasto por control del vector de 5 millones de dólares. Lee, B. et al. (2013) (5) calculó que los gastos originados en la sanidad mundial a causa de esta enfermedad, están por encima de enfermedades muy reconocidas por la sanidad de los países más desarrollados como son las infecciones por rotavirus (~2.000 millones US\$) o cáncer cervical (7.000 millones de US\$), mientras que el Chagas a nivel global supera estas cifras llegando a los 9.000 millones de US\$. La enfermedad representa un problema de Salud Pública, ya que las inmigraciones desde regiones endémicas de Latinoamérica a países no endémicos de Norteamérica (norte de Estados Unidos y Canadá), Sudeste asiático (Japón y Australia) y Europa (España, Portugal, Francia, Italia, etc.) han generado la diseminación por vías no vectoriales (6,7).

La enfermedad fue descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, quien describió tanto al parásito como a las diferentes fases clínicas y las vías de transmisión(8). El agente causal es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* perteneciente al Orden **Kinetoplastida**, Familia **Trypanosomatidae**, Género **Trypanosoma**, el cual se caracteriza por presentar un flagelo y una sola mitocondria, la cual contiene el kinetoplasto, estructura particular de la mitocondria que poseen los organismos pertenecientes a este Orden y que contiene parte del genoma del parásito (9).

1.1.1 Epidemiología

Considerada dentro de las llamadas Enfermedades Tropicales Olvidadas (NTDs, *Neglected Tropical Disease*), la enfermedad de Chagas afecta particularmente a regiones rurales y periurbanas, donde se puede hallar al vector y en donde las diferentes medidas tomadas para combatirlo permitieron que en 2003 se redujera el número de casos a 7-8 millones según los últimos informes de la OMS (10).

La transmisión endémica de la enfermedad de Chagas en los seres humanos y animales silvestres, se encuentra restringido al continente Americano y corresponde en gran medida con la distribución de los triatomíneos, entre las latitudes 42° N y 46° S (desde los estados Sur de EE.UU. hasta la Patagonia) (Figura 1.1).



Figura 1.1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. En gris se muestra las áreas endémicas y en blanco las áreas enzoóticas (ciclo silvestres de transmisión). Tomado de Rodrigues Coura, J. et al. (2014) (11).

Dentro de dichos países endémicos, mi país, Paraguay sería un ejemplo, con menos de 7 millones de habitantes se estima que el 2.2 % de la población se encuentra infectada con la enfermedad de Chagas (12). Afectando sobre todo a las poblaciones más desfavorecidas, como son las de bajos recursos económicos y comunidades indígenas (**Figura 1.2**), siendo un problema social difícilmente erradicable y multifactorial, el cual afecta a la salud pública en el Paraguay y toda América Latina.



Figura 1.2. Comunidad indígena “10 Leguas” del chaco paraguayo, región afectada por la enfermedad de Chagas. Fotografía original: Ana Karina Ibarrola Vannucci.

El flujo migratorio de países de América Latina a países socialmente más desarrollados, hicieron que la enfermedad de Chagas pase a ser de una enfermedad autóctona y endémica del continente Americano a ser un problema a nivel mundial (**Figura 1.3**). En 2006, se estimó que el 3.8% de los 80.522 inmigrantes latinoamericanos que migraron a Australia o que el 3.5% de los 156.960 que emigraron a Canadá estaban infectados. Cifras similares se describieron en Japón, donde en 2007 de 80.912 inmigrantes, 3.592 estaban infectados. En el año 2000 se estimó que en EEUU el 1.9% de los aproximadamente 13 millones de inmigrantes latinoamericanos y el 2% de 17 millones en el 2007, estaban infectados con *T. cruzi*. España, en el año 2008,

recibió 678.711 inmigrantes procedentes de países endémicos de América Latina, de los cuales el 5.2% estaban potencialmente infectados con *T. cruzi*. Esta situación ha llevado a que en algunos países de Europa y EE.UU sean obligatorias las pruebas serológicas de Chagas a todos los donantes que hayan pasado más de un mes en áreas endémicas, así como a las embarazadas (6,13). España fue el primer país europeo en legislarla y aplicarla a partir del Real Decreto 1088/2005.

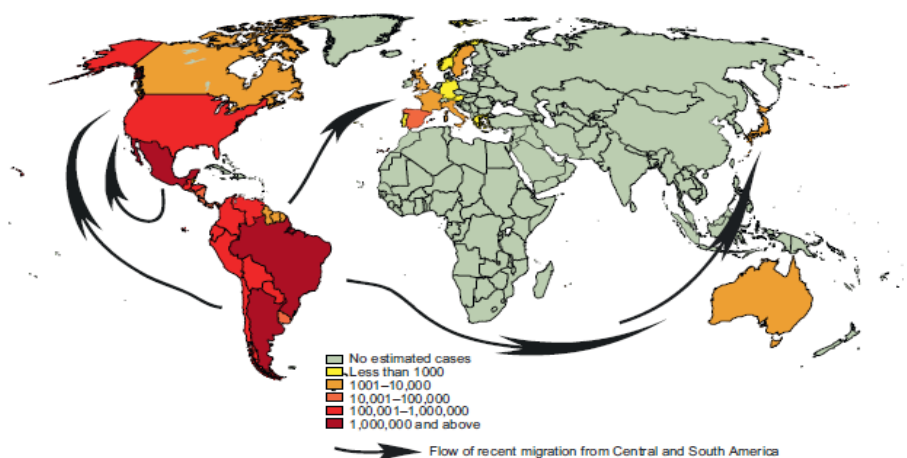


Figura 1.3. Estimación y flujos migratorios de la población infectada con *T. cruzi*. Tomado de Guhl, F. (2010) (13).

1.1.2 Triatominos

La transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas se realiza por insectos triatominos, lo cual en función de su reservorio establece diferentes formas de transmisión: zoonótica, antropozoonótica o zooantroponótica (14). Estos insectos hematófagos forman parte de la subfamilia Triatominae dentro de la familia Reduviidae, orden **Hemiptera**, familia **Reduviidae**, subfamilia **Trianominae**, siendo tres géneros los principales trasmisores de la enfermedad de Chagas los cuales son **Rodhnius**, **Pastrongylus** y **Triatoma**, conocidos a través de diversos nombres en diferentes regiones: como

vinchuca (desde Ecuador hasta la Patagonia), chipo (Venezuela), pito (Colombia) y Barbeiro (Brasil) (15).

Se considera que todas las especies de la subfamilia **Triatominae** son vectores potenciales del “Mal de Chagas”, sin embargo las siguientes especies constituyen, epidemiológicamente, los vectores más importantes: *Rhodnius prolixus*, *Rhodius pallescens*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* y *Mepraia spinola* (13).

1.1.3 Vías de transmisión de la Enfermedad de Chagas

1.1.3.1 Vía vectorial

La enfermedad de Chagas es una zoonosis transmitida en focos naturales o unidades ecológicas dentro de un entorno geográfico bien definido. La unidad ecológica se compone de los mamíferos silvestres o domésticos y los triatominos silvestres, infectados con *T. cruzi*. La transmisión continua, está garantizada con o sin la intervención del hombre en la vía selvática de la enfermedad.

La transmisión en humanos se realiza a través de triatominos domésticos o peri domésticos, estos pueden vivir en las grietas, las ranuras, techos de palma o en el adobe de las casas en zonas rurales (**Figura 1.4**) o suburbanas. Por lo que la eliminación de los vectores de las viviendas es la principal intervención para reducir la transmisión (16).



Figura 1.4. Ejemplo de vivienda rural en la comunidad indígena “10 Leguas” del chaco paraguayo. Fotografía original: Ana Karina Ibarrola Vannucci.

La transmisión se produce durante la noche, cuando los insectos están más activos, momento en el que se alimentan succionando la sangre de los seres humanos que se encuentran dormidos (**Figura 1.5**). La picadura produce generalmente una abrasión en la piel que permite que el parásito liberado en las heces, penetre por vía cutánea o por las mucosas (16).



Figura 1.5. *Rhodnius prolixus* sobre la piel humana, alimentándose. Tomado de Brenière, S.F. et al. (2010) (16).

1.1.3.2 Vía transfusional

Los movimientos migratorios desde zonas rurales a las ciudades producidas en América Latina en las décadas de los años 1970 al 2000 cambió el patrón

epidemiológico tradicional de la enfermedad de Chagas, pasando de ser una enfermedad rural a una enfermedad urbana que puede transmitirse por transfusión de sangre (17). Por esta razón, en la mayoría de los países de América Latina, al igual que en otras de migración de población latinoamericana, es ahora obligatorio realizar controles serológicos de los donantes en bancos de sangre.

La movilidad creciente de la población y la migración hacia países no endémicos han extendido la infección a través de la transfusión de sangre, trasplante de órganos y de forma congénita entre los inmigrantes. El riesgo está relacionado con el país de origen de los migrantes y la tasa de prevalencia en ese país (**Tabla 1.1**), observándose que la mayor prevalencia se encuentra en los inmigrantes procedentes de Bolivia.

Tabla 1.1. Número de inmigrantes en España y el número estimado de infectados en el 2008 según el país de origen. Tomado de Schmunis & Yadon (2010) (18).

Countries	Number of immigrants	Estimated <i>T. cruzi</i> infected immigrants
Argentina	196,447	16,109
Bolivia	236,023	36,348
Brazil	119,209	1,550
Chile	48,939	1,370
Colombia	284,043	11,078
Costa Rica	1,651	71
Ecuador	415,535	4,986
El Salvador	5,029	307
Guatemala	3,424	270
Honduras	21,520	1,248
Mexico	23,673	166
Nicaragua	8,391	143
Panama	2,228	201
Paraguay	66,950	6,226
Peru	123,173	3,695
Uruguay	61,407	737
Venezuela	61,069	2,443
Total	1,678,711	86,948 (5.2%)

(). Estimates of percentage of infected immigrants.

1.1.3.3 Vía transplacentaria

La transmisión transplacentaria puede ocurrir tanto en la fase aguda como en la crónica de la enfermedad (19,20) y se repite en cada embarazo durante todo el período fértil en la vida de la mujer. En la mayoría de los casos se trata de madres con infección crónica y residentes de áreas endémicas en Latinoamérica (20).

Tales características epidemiológicas específicas para la infección por *T. cruzi* sugieren un riesgo particularmente a largo plazo de la transmisión madre-hijo; a través del grupo de mujeres embarazadas infectadas en los países endémicos, así como en áreas no endémicas. Esto señala la infección congénita por *T. cruzi* como un importante problema de salud pública que puede ampliarse fácilmente en el espacio (a través de las migraciones) y el tiempo (20,21).

Se estima que más de 8.000 niños nacen al año en el mundo con infección por *T. cruzi*, siendo esta forma de transmisión clave para el control de la enfermedad tanto dentro como fuera de Latinoamérica. En un estudio prospectivo realizado en Madrid se demostró que, 1.244 gestantes latinoamericanas mostraron una prevalencia del 3.2%, de los cuales el 85% era procedentes de Bolivia, 10% de Paraguay, 2.5% de Ecuador y 2.5% de Argentina, siendo la tasa de transmisión vertical de un 2.8% (22). En otro estudio llevado a cabo en el Centro de Maternidad en Valencia se pudo detectar que de un total de 624 embarazadas latinoamericanas, 29 mujeres fueron positivas para Enfermedad de Chagas siendo todas asintomáticas y cuyos niños fueron positivos en los test de diagnósticos para Chagas. Nuevamente la nacionalidad boliviana fue la que más frecuentemente estuvo afectada (24 de 137, 17.5%) (23). Además, en un estudio en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid se observó un prevalencia del 27.6%, de los cuales un 69.4% fueron mujeres, siendo un 95.9% de nacionalidad boliviana y la

mayoría de una zona rural (75.5%) (24). Así mismo la Comunidad Valenciana en su Circular 3/2007 sobre la Regulación del control de infecciones congénitas y perinatales incluyó el diagnóstico y control con serología convencional (HAI+IFI o HAI+ELISA) o PCR para *T. cruzi*, y en aquellos recién nacidos de madres con serología positiva se remite nueva muestra de cordón umbilical a un centro de referencia para la confirmación con PCR (25). Estas medidas han sido pioneras en el control en Europa, habiendo sido posteriormente adoptadas por países como Italia o Reino Unido y representando un ejemplo para otros países como por ejemplo E.E.U.U o incluso países americanos como Chile.

1.1.3.4 Transmisión por trasplante de órganos

El trasplante de corazón proveniente de pacientes chagásicos no está recomendado, y para otros órganos se debe evaluar, donde el donante debe recibir tratamiento 30 días previos a la donación. La transmisión por trasplante de órganos también puede ocurrir en países no endémicos y el impacto depende del órgano trasplantado (26,27).

1.1.4.5 Vía oral

Esta vía de transmisión no fue considerada viable en el pasado, pese a que ya en 1913 y 1927 se demostró la transmisión vía oral infectando ratas vía mucosa oral y a través la mucosa gástrica, donde se obtuvo unas tasas de transmisión del 66%. En los últimos 10 años se han descrito muchos brotes de la enfermedad de Chagas aguda adquiridos por vía oral en diferentes zonas geográficas de América del Sur. Esto incluye cinco muertes y 121 casos agudos en la Amazonia brasileña; 34 casos incluidas cuatro muertes en Colombia; un gran brote urbano de la enfermedad de Chagas aguda en una escuela en Caracas, que afectó a 103 niños y otros casos en un mercado de

Caracas. Lo que hace, que la vía de transmisión oral sea cada vez más considerada (28).

En general, estos brotes llevan a la muerte a un porcentaje importante de individuos infectados, lo que indica una alta patogenicidad de los parásitos y demuestra su capacidad para penetrar a través de la mucosa gástrica, pese al pH ácido de la misma (29). Además, la presencia de formas metacíclicas de *T. cruzi* en las secreciones de las glándulas anales de la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*), un animal con hábitos silvestres y peri-urbanos, no puede pasarse por alto como una fuente de transmisión oral (30).

1.1.4 Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico que presentan las personas infectadas por *T. cruzi* es variable, lo cual dependerá del inóculo inicial así como de las características biológicas de las cepas de *T. cruzi* que establezcan la infección y de la respuesta inmunológica del hospedador (31).

Clásicamente, en la enfermedad de Chagas se describen dos fases:

i) **Fase aguda:** de duración corta (20 a 30 días), presenta signos clínicos poco definidos, como fiebre, astenia, cefalea, entre otros. El clásico signo de Romana (chagoma ocular) en los casos que se presenta, revela la puerta de entrada de la infección, permitiendo así un diagnóstico y tratamiento de la enfermedad más temprano y eficaz. Este signo se presenta solo en el 4% de los pacientes, y se caracteriza por la inflamación indolora del párpado superior e inferior de un solo ojo, así como del lado facial afectado.

Las lesiones de la fase aguda se caracterizan por reacciones inflamatorias, con la presencia de granulomas localizados en el músculo o tejido cardíaco. En algunos casos, existe hiperplasia reticular en ganglios linfáticos y en otros

casos se acompaña de una miocarditis aguda, habiendo destrucción de neuronas cardíacas y del plexo mesentérico (14). La infección sólo puede ser demostrada por pruebas serológicas, PCR y pruebas parasitológicas clásicas.

ii) **Fase crónica:** Se la puede dividir en asintomática y sintomática.

- **Asintomática:** la respuesta inmune celular por los linfocitos Th1 CD4+ (32) limitan la proliferación inicial pero el parásito ejerce una inmunomodulación que permite la persistencia y una baja parasitemia, permaneciendo durante años sin presentar signos clínicos de enfermedad.
- **Sintomática:** la aparición de manifestaciones clínicas determinan esta fase, donde del 20 al 35% de los individuos infectados, según el tropismo de la cepa, desarrollarán lesiones irreversibles del sistema nervioso autónomo en el corazón, esófago, colon y sistema nervioso periférico. La patología cardíaca se caracteriza por una miocarditis crónica, con desarrollo de cardiomegalia, insuficiencias cardíacas y arritmias (33,34). Como parte de la patología cardíaca en la fase crónica, existe una extensa fibrosis miocárdica, destrucción de sistemas conductores de los haces de Purkinje y una gran reducción en el número de neuronas cardíacas. Es frecuente encontrar hipertrofia de las fibras miocárdicas y dilatación de las cavidades cardíacas, observándose la aparición de aneurismas y trombos de sangre (35). En su forma digestiva, en casos avanzados del mal de Chagas, se observan dilataciones del esófago, duodeno y/o colon (megaesófago, megaduodeno y megacolon), dando lugar a la destrucción de gran número de neuronas de los plexos mesentéricos (particularmente esófago y colon), lo cual conlleva a una dilatación de estos órganos con la aparición de síndromes y de otras vísceras tales como la vejiga, uréter y/o vesícula biliar (31).

1.1.5 Diagnóstico

La detección de la enfermedad de Chagas en la fase aguda supone un punto clave para un tratamiento eficaz. No obstante, debido a su sintomatología poco específica y solapada con otras enfermedades, el diagnóstico de la enfermedad en esta fase es difícil en la mayoría de ocasiones. El diagnóstico se realizará en función de la fase de la enfermedad que se sospecha:

- **Fase aguda:** esta fase se caracteriza por presentar un número importante de parásitos en sangre, su detección es una señal inequívoca de la infección por *T. cruzi*. Durante esta fase, el diagnóstico de laboratorio se basa en la visualización del parásito en sangre de pacientes infectados por métodos directos recomendados para esta etapa, indicándose en orden creciente de complejidad y sensibilidad son:
 - **Métodos de concentración:** Microhematocrito Strout, gota gruesa y gota fresca
 - **Métodos moleculares:** técnica de PCR y variantes, como PCR anidada y PCR en tiempo real. El diagnóstico con estas dos variantes es más rápido y sensible otros métodos de amplificación. La principal limitación del método es que una reacción PCR negativa no indica ausencia de infección debido a que la parasitemia es variable y puede ser no detectable en el momento del estudio. Un resultado positivo significa presencia de ADN de *T. cruzi* asociado a la infección.

- **Fase crónica:** en esta fase la parasitemia disminuye significativamente respecto a la fase aguda, por lo que se deben utilizar los métodos serológicos que detectan anticuerpos específicos. Dichos métodos emplean antígenos de composición muy variable y ninguno alcanza por sí sólo el 100% de efectividad en el diagnóstico. Se deben utilizar dos técnicas con antígenos diferentes procedentes de cepas de distinto origen geográfico y que permita alcanzar un rango de sensibilidad entre 98 y 99.5%. Común-

mente se utilizan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayos de hemaglutinación indirecta (HIA). Estas técnicas suelen usarse por su simplicidad, bajo costo y buen rendimiento, se utilizan kits comerciales basados en estas técnicas, consiguiendo sensibilidades entre el 95 al 99% en muchos casos (36). La OMS recomienda usar paralelamente al menos dos pruebas que tengan como base antígenos diferentes; si ambas pruebas son eficaces la sensibilidad asciende, llegando a tener una sensibilidad del 100%. Si los resultados de esas dos pruebas no concuerdan se requiere la realización de un tercer ensayo generalmente mediante inmunofluorescencia (36,37).

1.1.6 Tratamiento

La quimioterapia contra la enfermedad de Chagas principalmente depende del uso de dos medicamentos, el Nifurtimox y el Benznidazol. Estos medicamentos pueden curar al menos 50% de las infecciones recientes, mostrando la desaparición de los síntomas y negativización de la parasitemia y serología (38,39). Sin embargo, el tratamiento de la infección aguda no es uniforme en los distintos países, probablemente como consecuencia de la diferente sensibilidad de las distintas cepas de *T. cruzi* a los fármacos. Ambos fármacos tienen efectos secundarios que son más comunes en adultos que en niños, aunque desaparecen cuando se interrumpe el tratamiento. Otro inconveniente de estos fármacos es la necesidad de un período de tratamiento extenso. El Nifurtimox se utiliza entre 30 y 120 días, mientras que benznidazol se utiliza al menos 30 días (39).

El Nifurtimox (Bayer) es un derivado de nitrofurano. Tiene efecto tripanomicida, actuando frente las formas amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*. Fue aprobado su uso frente a la enfermedad de Chagas en el año 1965. Ha demostrado ser efectivo en la fase aguda, en la fase crónica asintomática y en la crónica sintomática de la enfermedad, con una cura parasitológica del

76% en la etapa aguda y porcentaje variable en la etapa crónica, habiendo obtenido resultados contradictorios en algunos ensayos. La acción de este medicamento está relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno, frente a los cuales el tripanosoma es deficiente en mecanismos de detoxificación, lo que lo hace susceptible al estrés oxidativo. Los efectos secundarios del medicamento se presentan en el 30% de los casos, especialmente en adultos. Puede producir anorexia, pérdida de peso, manifestaciones gastrointestinales como náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, dermatitis y compromiso del SNC con insomnio, alucinaciones, parestesias y psicosis (40).

El Benznidazol (Roche) es también un fármaco tripanomicida. Actúa uniéndose de forma covalente a los intermediarios de la nitrorreducción con los componentes del parásito, ADN, lípidos y proteínas. Es eficaz en el tratamiento de la fase aguda, en la fase crónica asintomática y en la crónica sintomática, como se ha demostrado en estudios realizados en niños en Brasil y Argentina. Los efectos adversos se dividen en tres tipos:

- Dermatológicos: erupción cutánea que aparece entre los 7 a 10 días de tratamiento, edema generalizado, fiebre, adenopatías, mialgia y artralgia.
- Hematológicos: depresión de la médula ósea con trombocitopenia, púrpura y agranulocitosis, que es la manifestación más grave.
- Compromiso neurológico: polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica.

En animales de experimentación se ha demostrado un efecto mutagénico y teratogénico, lo que no se ha evidenciado en el hombre. Está contraindicado en mujeres embarazadas y en pacientes con insuficiencia hepática y renal (40).

Las reacciones de toxicidad y los efectos colaterales debidos al Benznidazol y Nifurtimox pueden ser importantes. El Nifurtimox provoca más comúnmente manifestaciones del aparato digestivo tales como anorexia, náuseas, vómitos y

pérdida de peso, siendo contraindicado en mujeres embarazadas y en pacientes con insuficiencia renal y hepática (40).

El estudio multicéntrico BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) realizado entre el 2004 y el 2011 en 49 centros en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia y El Salvador; que incluyó 2.854 pacientes en tratamiento con Benznidazol y con seguimiento a 5.4 años, demostró una negativización del parásito por PCR en el grupo tratado del 66.2% frente al grupo control 33.5%, en tanto que la presencia de eventos cardíacos (muerte, RCP, taquicardia ventricular sostenida, inserción de marcapasos o implantes, fallo cardíaco, ACV u otro evento tromboembólico) en el grupo tratado fue del 27.5% frente al grupo control del 29.1%, no observándose diferencias significativas entre los grupos (p:0.31). Asimismo con este ensayo clínico se determinó que una vez establecida la enfermedad ni siquiera la cura parasitológica podría evitar la progresión de la misma, lo cual demuestra que el daño directo es responsable de la progresión de las patologías (41).

Otros compuestos de interés para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas son los azoles. Su uso se describió por primera vez en 1981 por tener actividad frente *T. cruzi*. Compuestos como el miconazol y econazol mostraron una potente acción inhibidora del crecimiento del parásito, disminuyendo el contenido de 5,7-dieno esteroides (42). El ketoconazol y otros potentes antimicóticos son útiles ya que inhiben la multiplicación intracelular de los parásitos y en el bloqueo de la biosíntesis de los esteroides, ergosterol, de tipo micótico (43,44).

1.2. *T. cruzi*

1.2.1 Fases evolutivas de *T. cruzi*

T. cruzi presenta tres formas biológicas, morfológicas y fisiológicamente diferentes, las cuales se identifican por la posición relativa del kinetoplasto en relación al núcleo y el flagelo:

- **Amastigotes:** presentes en el interior del citoplasma de células nucleadas del hospedador mamífero, de aspecto redondeado y con un flagelo corto y poco visible a microscopía óptica, de aproximadamente 2.5 μm de longitud y 2 μm de diámetro, se multiplican por fisión binaria longitudinal (**Figura 1.6 A**).
- **Epimastigotes:** presentes en el tracto intestinal y orina del insecto vector, donde se multiplican por fisión binaria longitudinal y con un flagelo libre que sale a través de la bolsa del flagelo por delante del núcleo, de aproximadamente 20 a 40 μm (**Figura 1.6 B**) por unas 2.5 a 3 μm de ancho.
- **Tripomastigotes:** esta forma las podemos encontrar bajo dos tipos diferentes: metacíclicos (TM) y sanguíneos (T) (**Figura 1.6 C**). Tanto los tripomastigotes metacíclicos como los sanguíneos, presentan un gran flagelo libre que se origina posterior al núcleo formando una membrana ondulante que recorre todo el protozoo. Estas formas tripomastigotas sanguíneas, presentes en la sangre de los hospedadores mamíferos, son capaces de infectar a los insectos transmisores durante la ingestión de sangre (posiblemente las formas *stumpy*) mientras que las formas tripomastigotas *slender* serían las encargadas de invadir nuevas células del mamífero. Las formas tripomastigotas metacíclicas se encuentran en las heces y orina de los triatomos, los cuales se eliminan durante la succión de la sangre. Los tri-

pomastigotes metacíclicos se originan a partir de las formas epimastigotes por un proceso llamado metaciclogénesis, dichas formas no son multiplificativas pero si infectivas (45,46).

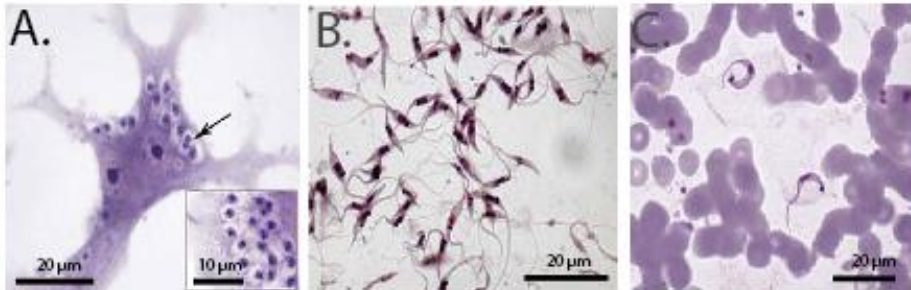


Figura 1.6. Formas evolutivas de *T. cruzi* teñidas con Giemsa. A. Amastigotes B. Epimastigotes C. Tripomastigotes sanguíneos. Tomado de Lana, M & Menezes Machado, L. M. (2010) (45).

1.2.2 Ciclo biológico

El ciclo completo de *T. cruzi* es digenético, debido a su desarrollo en mamíferos y en insectos triatominos que actúan como hospedadores intermediarios, tal y como se describió anteriormente (47). El ciclo biológico se inicia cuando el insecto se alimenta de la sangre contaminada de un mamífero, algunas horas después de la alimentación con los tripomastigotes contenidos en la sangre, se transforman en epimastigotes y esferomastigotes en el intestino medio del triatomo. Una vez establecidos los epimastigotes se dividen rápidamente por fisión binaria y finalmente una gran proporción de epimastigotes se adhieren a la cutícula rectal, donde realizan el proceso de transformación a la forma tripomastigotas metacíclicas del parásito, en un proceso conocido como metaciclogénesis, para continuar con su establecimiento y desarrollo (48,49). Los tripomastigotes metacíclicos se concentran en la parte terminal del tubo digestivo del insecto y durante la ingesta de sangre o poco después, los insectos defecan y depositan las heces infectadas en la piel o cerca de las mucosas, conteniendo las formas

tripomastigotas metacíclicas, que entran en el hospedador a través de la escarificación que se produce tras el rascado de la picadura, de las membranas mucosas o conjuntivas.

En el interior del hospedador, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células epiteliales nucleadas cercanas al lugar de la inoculación (macrófagos y células epiteliales, por ejemplo), diferenciándose a amastigotes intracelulares, siendo la única forma replicativa del parásito en el hospedador mamífero. Mediante fisión binaria, los amastigotes se dividen y se diferencian a tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados a los espacios intercelulares, la linfa y circulación sanguínea. Dado que estas formas no tienen capacidad de división, necesitan parasitar nuevas células nucleadas y replicarse como amastigotes y/o ser ingeridos por un nuevo insecto a fin de comenzar un nuevo ciclo (**Figura 1.7**) (50,51).

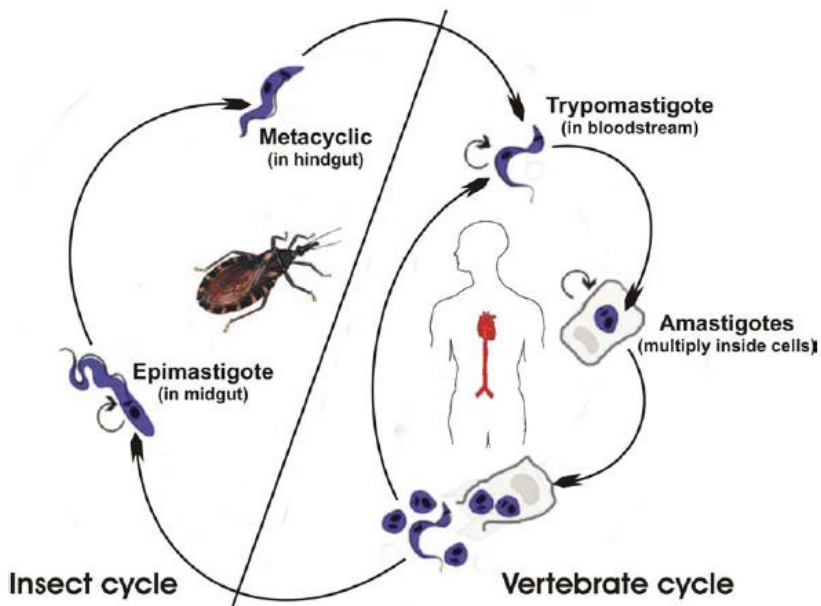


Figura 1.7. Ciclo de vida de *T. cruzi*, que muestra las diferentes etapas de desarrollo de los protozoos en los invertebrados (triatominos) y en hospederos vertebrados (mamíferos). Tomado de Vazquez, M.(2007) (52).

1.2.3 Filogenia

T. cruzi es genéticamente diverso y se clasifica en una serie de cepas o subtipos. Esta diversidad genética se descubrió utilizando un conjunto de marcadores isoenzimáticos para investigar las diferencias entre los parásitos que intervienen en los ciclos doméstico y selvático, en el estado de Bahía en Brasil (53). Las variantes descritas fueron clasificadas como zimodemos I y II (ZI y ZII) (**Tabla 1.2**). Posteriormente se demostró que la cepa asociada con el ciclo selvático en Brasil (ZI), en Venezuela era la principal causa de enfermedad en humanos. En las siguientes dos décadas, numerosos autores caracterizaron muchas otras cepas, teniendo como resultado un aumento de la diversidad y de los zimodemos que había descritos originalmente. Esto llevó a que las denominaciones de los subtipos descritos en la literatura comenzaron a ser confusas. Para estandarizar la nomenclatura, la comunidad científica decidió formalmente reconocer dos grupos principales correspondientes a los zimodemos originales, a los cuales se les designó TcI y TcII (13).

Tabla 1.2. Diferentes nomenclaturas de los distintos linajes o cepas de *T. cruzi*. Tomado de Miles, M. A. (54).

Zymodeme ^a	DTU ^b	Reference strains	New DTUs ^c
ZI	TcI	Sylvio X10/1	TcI
ZII	TcIIb	Esm cl3	TcII
ZIII/ZI ASAT	TcIIc	M5631 cl5	TcIII
ZIII	TcIIa	CanIII cl1	TcIV
Bolivian ZII	TcII d	Sc43 cl1	TcV
Paraguayan ZII	TcII e	CL Brener	TcVI

^a Basadas en la Electroforesis de enzimas multilocus (MLEE)

^b Basadas MLEE, amplificación aleatoria de ADN polimórfico y *loci* nucleares.

^c Designación más reciente, Unidades discretas de tipificación.

Posteriormente se determinaron como 6 unidades discretas tipificación (DTU), las cuales indican mejor las relaciones filogenéticas entre las cepas. TcI y TcII son las más antiguas y divergentes. TcIII y TcIV muestran similitudes y es considerada como el resultado de un evento de hibridación entre TcI y TcII. Finalmente, TcV y TcIV, son generalmente aceptados como híbridos derivados de las cepas TcII y TcIII (13).

1.2.4 Biología y estructuras celulares

La composición de la superficie celular juega un papel muy importante en los parásitos intracelulares, siendo clave en el proceso de infección que éstos desencadenan. Por ello es importante entender su organización estructural, composición y propiedades funcionales. La superficie celular de *T. cruzi* está formada por la bicapa lipídica y por una serie de componentes glicosilados, como glicolípidos y glicoproteínas (junto a una serie de enzimas como mucinas, transialidasas, etc.) que interactúan con el medio extracelular, constituyendo el glicocálix.

Se pueden observar tres zonas en la célula de *T. cruzi*: el cuerpo celular, el flagelo y el bolsa flagelar (55) **Figura 1.8**.

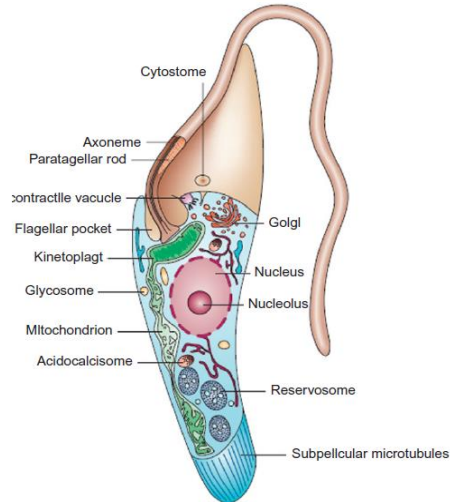


Figura 1.8. Representación esquemática de la sección longitudinal de un epimastigote de *T. cruzi*, mostrando sus principales estructuras y orgánulos. Tomado de Docampo, R. & Moreno, S.N. (2011) (44).

- *Flagelo*: presenta una estructura típica con nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central. Incluso en la forma amastigote puede observarse un flagelo, aunque muy corto.
- *Cuerda paraxial (Paraxial flagellar rod (PFR))*: es una estructura que se encuentra unida al axonema a través de una matriz de filamentos, compuesto por un gran número de proteínas, destacando dos de ellas, las denominadas *Paraxial flagellar rod 1* y *2* (PFR1 y PFR2), caracterizadas por ser altamente antigénicas, por lo que han sido consideradas como dianas para diagnóstico y vacunación.

En el citoplasma de *T. cruzi* se pueden identificar los siguientes orgánulos:

- *Mitocondria*: única y tubular con crestas y paredes irregulares, de apariencia dependiente del estadio del parásito. Se caracteriza por la presencia de del cinetoplasto, el cual es una estructura propia del Orden Kinetoplastida que contiene el ADN mitocondrial o ADN del cinetoplasto (ADNk) (56). Esta estructura supone el 16 al 30% del ADN total del pará-

sito. El ADNk se compone de 5.000 a 20.000 copias de ADN minicírculos y unas 50 copias de maxicírculos, difiriendo del ADN nuclear en composición de bases, estructura molecular y ausencia de uniones a histonas. Los minicírculos son muy heterogéneos, conservando cierto grado de identidad entre ellos y secuencias conservadas. El ADN de los maxicírculos se encarga de codificar las proteínas de la cadena respiratoria, mientras que el ADN de los minicírculos codifica ARN guía para la edición del ARN. El kinetoplasto se localiza en la porción ensanchada de la mitocondria, siempre cercana al cuerpo basal con el que se conecta mediante estructuras filamentosas. No obstante, la forma y organización estructural del kinetoplasto varían según el estado morfológico del protozoo (55) **(Figura 1.9).**

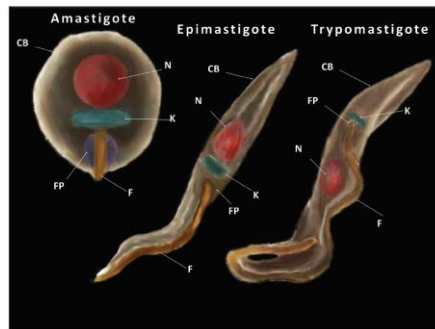


Figura 1.9. Diferentes vistas del kinetoplasto y de la organización general de las formas de *T. cruzi* (amastigote, epimastigote y tripomastigote). F: flagelo; K: kinetoplasto; N: núcleo; FP: bolsa flagelar; CB: cuerpo celular. Tomado de Solís-Oviedo, R. et al. (2018) (57).

- *Kinetosoma o cuerpo basal del flagelo*: se asocia estrechamente al kinetoplasto mediante numerosos filamentos proteicos. Contiene numerosas proteínas, siendo las mayoritarias las proteínas PRP1 y PRP2, altamente antigénicas.
- *Glicosomas*: estructuras esféricas o alargadas con una membrana homogénea que contienen la mayor parte de la maquinaria de la ruta glucolítica. Se consideran una forma especial de peroxisoma.

- *Aparato de Golgi*: de estructura similar al de mamíferos. Emite vesículas que se asocian a la bolsa flagelar para ser liberadas.
- *Citostoma*: una invaginación de la membrana especializada en funciones endocíticas rodeada de microtúbulos subpeliculares que permite que se realice en epimastigotes hasta el 85% de toda la ruta endocítica.
- *Reservosomas*: estructuras esféricas o irregulares rodeadas por una sola membrana. Se encuentran en la región posterior del parásito y desaparecen en la metacicloogénesis. Acumula proteínas de la ruta endocítica, por lo que se suelen observar inclusiones, y contiene proteasas como la cruzipaina, una cisteínproteasa propia de *T. cruzi*.
- *Acidocalcisomas*: estructuras esféricas altamente electrodensas situadas en la periferia del cuerpo del parásito, especialmente predominante en amastigotes. Almacenan Ca^{2+} , P y PPI, Na^+ , K^+ y Zn^{2+} . Participan en la homeostasis de pH y osmorregulación (58).
- *Vacuola pulsátil*: estructura que juega un papel fundamental en la regulación de los procesos osmóticos, consiste en varios túbulos conectados a una vacuola central ubicada cerca del bolsillo flagelar. Dicha estructura también participa en el tráfico de proteínas ancladas a la membrana plasmática mediante GPI (glicosilfosfatidilinositol) (59).

1.2.5 Genómica

En 1994, parasitólogos y representantes de la Organización Mundial de la Salud plantearon la secuenciación del genoma de varios parásitos, entre ellos el de *T. cruzi*. Para tal fin se seleccionó el genoma de *T. cruzi* de la cepa CL Brener, el cual es una cepa híbrida de dos haplotipos: Esmeraldo y no Esmeraldo, presentando alto grado de diferencia entre cromosomas homólogos y caracterizándose por: i) aislarse del vector peri-domiciliario *Triatoma infestans*, ii) poseer un patrón de infectividad conocido en modelo murino, iii) poseer tropismo cardíaco hacia los miocitos, iv) presentar fase

aguda en infecciones por accidentes, v) ser susceptible a fármacos habituales utilizados en el tratamiento de Enfermedad de Chagas (60).

La secuenciación del genoma de *T. cruzi* formó parte del proyecto “TriTryps”, en el cual se secuenciaron conjuntamente los genomas de *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* (61). Los dos haplotipos presentan altos niveles de genes sinténicos, con una mayoría de las diferencias producidas por inserciones y deleciones en las regiones intergénicas y subteloméricas y/o ampliaciones de secuencias repetidas. El porcentaje medio de la divergencia de las secuencias entre los dos haplotipos CL Brener es del 5.4%. La disponibilidad simultánea de las secuencias del genoma completo de otros dos tripanosomátidos como *T. brucei* y *L. major*, permitió comparar el contenido de genes y la arquitectura del genoma de los tres parásitos, así como una mejor comprensión de la genética y las bases evolutivas de los diferentes modos de vida de estos parásitos. El genoma haploide de *T. cruzi* se ensambló en 8.740 *contigs* presentando un total de 67 megabases (Mb), con unos 12.000 genes codificantes (22.570 proteínas codificadas teniendo en cuenta el genoma diploide). Por otra parte, se estima que el genoma diploide de *T. cruzi* es mayor que el de otros tripanosomátidos y oscila entre 106.4 y 110.7 Mb, distribuido en 41 pares de cromosomas homólogos cuyos tamaños oscilan entre 74 Kb a 2.4 Mb (62,63). El genoma haploide de otros kinetoplástidos como *T. brucei* y *L. major* tiene un tamaño de 25 Mb y 33 Mb, con 8.100 y 8.300 genes codificantes respectivamente (62).

La comparación de un gran subconjunto de genes ortólogos (COG) de los “TriTryps”, revela una identidad promedio de 57% entre *T. cruzi* y *T. brucei*; y el 44% de identidad entre *T. cruzi* y *L. major*, lo que demuestra una relación filogenética alta entre las tres especies (64–66) (**Figura 1.10**). En cuanto a los genes específicos de cada especie, el 32% del genoma de *T. cruzi* es específico del parásito, mientras que *T. brucei* y *L. major* poseen un 26 y 12% respectivamente. No existe sintenia en los genes de las regiones internas y

subteloméricas y de miembros de grandes familias de antígenos de superficie (62).

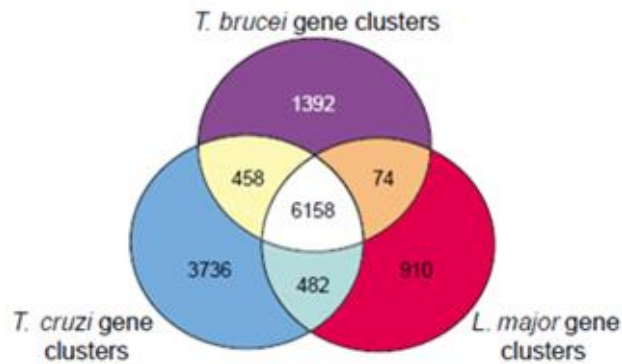


Figura 1.10. Distribución de grupos de genes ortólogos (COGs) entre los “TriTryps”. Tomado de El-Sayed, M. N., et al. (2005)(62).

El 50% del genoma de *T. cruzi* está compuesto por ADN repetido, como retrotransposones y genes pertenecientes a familias multigénicas codificantes para proteínas de superficie, incluyendo transalidasas (TS), mucinas, la glicoproteína de superficie gp63 y los genes de la familia multigénica MASP.

Tras una divergencia hace 200 a 500 millones, los genomas de estas tres especies de kinetoplastidos aún poseen porciones cromosómicas altamente sinténicas (situación en la que los genes están ordenados en bloques similares en diferentes especies). El examen de los puntos en los que se rompe dicha sintenia revela que el 40% estaba precisamente asociado a expansiones de las mencionadas familias multigénicas, retroelementos y ARNs estructurales correspondientes a genes *Mucine associated surface proteins* (MASP) (glicoproteínas específicas sin ortólogos en otros tripanosomátidos) con 1.377 miembros que se sitúa como la segunda familia de mayor tamaño en este tripanosomátido, tras la familia de las transalidasas (TSs) (**Tabla 1.3**). De los 1.617 dominios proteicos identificados en los genomas de “TriTryps”, menos del 5% son únicos de una especie. En *T. cruzi*, estas islas no sinténicas suelen localizarse en las regiones subteloméricas de los cromosomas y están

constituidas por *arrays* entrelazados de genes pertenecientes a las familias MASP, TSs (*transialidases*), mucinas, DGF-1 (*dispersed gene family-1*), genes y pseudogenes codificantes para RHS (*retrotransposon hot spot*), así como los retrotransposones VIPER (*vestigial interponed retroelements*), SIRE (*short interspersed repetitive elements*) L1Tc, NARTc (*T. cruzi nonautonomous non-LTR retrotransposons*), y/o los retroelementos DIRE (62).

Tabla 1.3. Familias multigénicas de la cepa CL Brener de *T. cruzi*. En paréntesis se indica el número de pseudogenes. Tomado de De Pablos, L. M, et al. (67).

Producto génico	Miembros	Ortólogos <i>T. tritryp</i>
Transialidasa (TS)	1,430 (693)	<i>T. brucei</i>
MASP	1,377 (433)	No
Mucinas	863 (201)	No
Retrotransposon hot spot proteins (RHS)	752 (557)	<i>T. brucei</i>
Dispersed gene family-1 (DGF-1)	565 (136)	No
Proteasa gp63	425 (251)	<i>T. brucei</i> + <i>L. major</i>

1.3 Disrupción genómica mediante CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) es un mecanismo de defensa presente en bacterias y arqueas cuya función es la protección del genoma bacteriano frente al ADN exógeno (como virus o plásmidos) o endógeno (como es el caso de elementos móviles) (68). El funcionamiento de CRISPR requiere de la presencia de uno o varios genes asociados llamados *cas* (*CRISPR associated genes*), generalmente adyacentes a CRISPR. Se trata de repeticiones palindrómicas cortas dispuestas en grupos y separadas por un ADN espaciador. Los espaciadores nuevos generalmente se agregan a un lado del CRISPR, lo que convierte al CRISPR en un registro

cronológico de los virus o segmentos de ADN extraños que la célula y sus ancestros han estado en contacto (68).

Las secuencias y longitud de los espaciadores se encuentran conservados en el *locus* CRISPR. Las secuencias repetidas pueden tener un tamaño entre 21 a 48 pb y los espaciadores entre 26 a 72 pb aproximadamente. Cabe de esperar la variación observada en cuanto al tamaño, ya que este sistema se encuentra extendido y el número de espaciadores puede ser desde unos pocos a cientos de ellos. Además, los genomas pueden tener un solo o múltiples *loci* CRISPR y en algunas especies, inclusive estos *loci* pueden formar una parte importante del cromosoma (68,69).

El proceso de defensa mediado por CRISPR/Cas se puede dividir en tres etapas (**Figura 1.11**). La primera etapa, **la adaptación**, conduce a la inserción de nuevos espaciadores en el *locus* CRISPR. En la segunda etapa, **la expresión**, el sistema se prepara expresando los genes *cas* y transcribiendo un precursor largo ARN CRISPR (pre-ARNcr). El pre-ARNcr se procesa posteriormente en un ARNcr maduro uniéndose a las proteínas Cas y factores asociados. En la tercera y última etapa, **la interferencia**, el ácido nucleico diana se reconoce y se destruye por la acción combinada del ARNcr y la/las proteínas Cas (68).

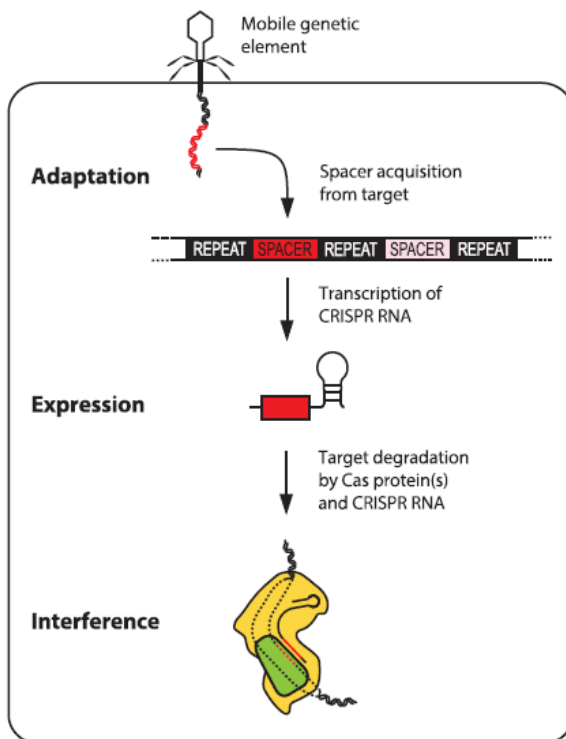


Figura 1.11. Pasos clave de la inmunidad CRISPR-Cas. 1) **Adaptación:** inserción de nuevos espaciadores en el locus CRISPR. 2) **Expresión:** transcripción del locus CRISPR y procesamiento del ARNcr. 3) **Interferencia:** detección y degradación de elementos genéticos móviles mediante la asociación del ARNcr y la proteína Cas. Tomado de Rath, D., et al. (2015) (68).

CRISPR/Cas9, es un sistema CRISPR de tipo II de *Streptococcus pyogenes*. Dicho sistema es el utilizado comúnmente para la edición de genomas que se ha adaptado a muchos organismos. Dicho sistema contiene una endonucleasa (Cas9) y una ARN quimera o ARNs_g o ARN_g, conformando un complejo ribonucleoproteico el cual reconoce el ADN y produce un corte de doble hebra (DSB, *Double Strand Breaks*), dando lugar a cambios en la secuencia del genoma, el cual depende de la maquinaria de reparación del organismo (**Figura 1.12**). En general se diseña al ARN_g conteniendo una secuencia de 20 pb como diana de un gen de interés denominado protoespaciador y aguas arriba de la secuencia de unión del protoespaciador, se encuentra una secuencia denominada motivo adyacente al protoespaciador (PAM,

Protospacer Adjacent Motif), dicha secuencia es NGG (donde N es cualquier nucleótido y G es la guanina), la cual es requerida para el reconocimiento y escisión por parte de la Cas9 de *S. pyogenes*, produciendo el DSB anteriormente mencionado (70) y de esta manera comenzará el sistema de reparación, el cual depende del organismo en el que se encuentre.

La reparación incorrecta de los DSB puede generar mutaciones y promover la inestabilidad del genoma, pudiendo provocar la muerte celular. Se han descrito dos vías principales de reparación de los DSB: (i) recombinación homóloga (HR, *Homology Recombination*); y (ii) unión final no homóloga del ADN (NHEJ, *Non Homologous DNA End Joining*). La HR emplea una plantilla homóloga como fuente desde la cual se copian las secuencias de ADN perdidas, mientras que la NHEJ sella la ruptura sin depender de una plantilla. HR y NHEJ operan de manera competitiva y colaborativa, dependiendo del contexto de reparación y los atributos específicos del ADN roto (71). Dentro del grupo de los Apicomplexa, *Toxoplasma gondii* posee el sistema de reparación por NHEJ, en cambio *Plasmodium spp.* que también pertenece a dicho grupo, carece del sistema de reparación mencionado; por lo tanto, en la estrategia CRISPR/Cas9 se debe incluir una molécula donadora luego del DSB, para inducir la reparación directa por recombinación homóloga (HDR, *Homologous Directed Repair*). Asimismo, se ha descrito que algunos protistas poseen como alternativa al sistema de reparación por NHEJ, el sistema de reparación del ADN mediante unión final mediada por microhomología (MMEJ, *Microhomology Mediated End Joining*), el cual implica la alineación de secuencias micro-homólogas cercanas a los extremos rotos antes de unirse, este sistema ha sido descrito en principio como mecanismo alternativo al sistema de reparación NHEJ en levaduras (72,73). Por todo lo expuesto anteriormente, a la hora de diseñar una estrategia específica para CRISPR/Cas9 se debe tener en cuenta el mecanismo de reparación de DSB que posee cada organismo (70).

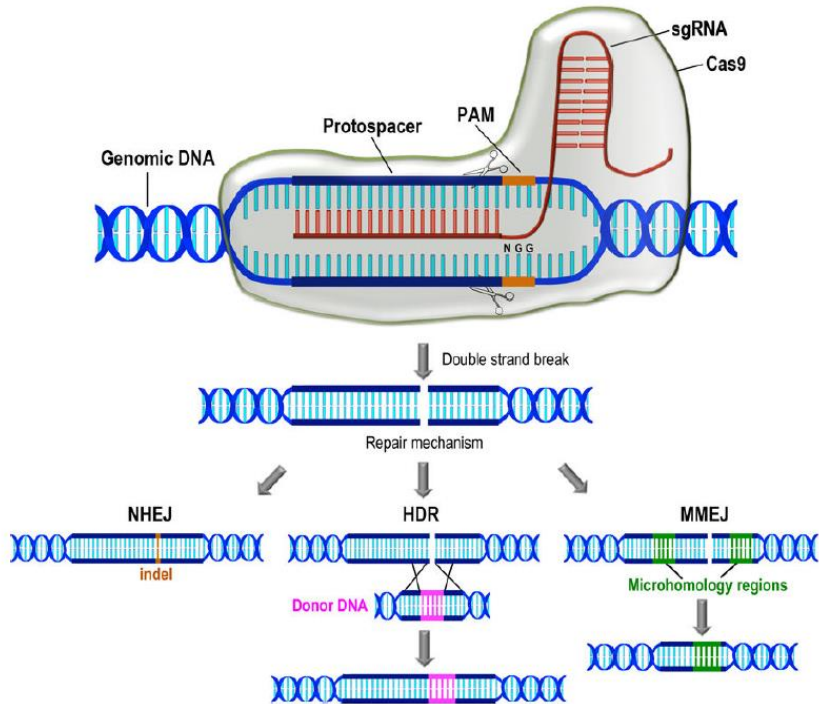


Figura 1.12. Representación esquemática del sistema CRISPR/Cas9 tipo II para la edición de genomas. Cas9 y un ARNg específico se ensamblan en un complejo ribonucleoproteico donde el ARNg se empareja con una región específica del ADN a editar (protoespaciador). El protoespaciador se ubica inmediatamente aguas arriba de una secuencia NGG denominada PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). Cas9 produce una rotura de doble hebra (DSB) en sitios específicos y la reparación del ADN se produce mediante mecanismos de reparación alternativos descritos hasta ahora en protistas. La unión final no homóloga (NHEJ) conduce a pequeñas inserciones o deleciones (indels) en el ADN. La reparación homóloga dirigida (HDR) se produce en presencia de una molécula donadora de ADN, las regiones de homología corresponden a secuencias ascendentes y descendentes cerca del sitio de corte de la endonucleasa Cas9. En la reparación de ADN mediante unión final mediada por microhomología (MMEJ), se alinean secuencias microhomólogas cercanas a ambos sitios de ruptura, para guiar la reparación. La reparación por MMEJ siempre conduce a la eliminación de la secuencia de ADN entre la microhomología. Tomado de Lander, N. et al. (2016) (70).

Hace nueve años, el sistema CRISPR/Cas9 fue redirigido para la edición de una secuencia específica del genoma (74), desde entonces, se ha utilizado con éxito para una amplia gama de aplicaciones: generación de modelos animales,

edición del genoma somático, selección genómica funcional, la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional, ya sea para activar genes (CRISPRa) o para reprimirlos (CRISPRi) (75), corrección de trastornos genéticos y tratamiento de enfermedades infecciosas (76). Varios autores han adaptado las aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en patógenos humanos unicelulares, como *Plasmodium falciparum* (77), *Toxoplasma gondii* (78), *Cryptosporidium parvum* (79), *Leishmania spp.* (80–82) y recientemente en *T. cruzi* (83); esta herramienta es importante debido a que puede acelerar el estudio de la función de las proteínas y conducir a la identificación de dianas quimioterapéuticas o inmunológicas (70,84,85).

Para *T. cruzi* en comparación con otros tripanosomátidos como *T. brucei* y *L. major*, existen muy pocas herramientas genéticas disponibles para la disminución de la expresión (*knock down*) o eliminación de un gen (*knock out*). Este protozoo, al ser predominantemente diploide, necesita de dos rondas de reemplazo genético para el silenciamiento de sus genes. Además, cuando se intenta generar mutantes nulos mediante una recombinación homóloga, en algunas ocasiones se obtiene el reemplazamiento pero a su vez el parásito es capaz de generar copias adicionales de los genes mediante aneuploidía o amplificación de genes (83,86), lo que interfiere en el silenciamiento de los genes diana que se pretenden silenciar.

Además, a diferencia de *T. brucei* y de *L. brasiliensis*, *T. cruzi* carece de las proteínas Argonauta (AGO) y asociadas, las cuales son fundamentales para muchas vías de silenciamiento génico transcripcional y postranscripcional (87–89) dificultando de esta manera los estudios de silenciamiento génico en *T. cruzi*, motivando de esta manera a los investigadores a adaptar el sistema CRISPR/Cas 9 a *T. cruzi*. Peng et al. (2015) (90) realizaron el primer trabajo en *T. cruzi* usando dicha tecnología. En este trabajo los autores demostraron que el sistema de reparación en el mencionado parásito se debía a MMEJ, causando pequeñas deleciones en la región DSB. Estos resultados fueron

consistente con el hecho de que se sabía con anterioridad, que la ruta NHEJ se encuentra ausente en tripanosomátidos (91). Además estos autores, observaron un efecto citotóxico de la Cas9 en los parásitos mutantes, lo cual conllevó a una baja eficiencia en los porcentajes de edición del genoma, siendo inclusive menores cuando co-transfectaron con una molécula donadora de ADN (HDR).

Posteriormente Lander, N. et al. (2015) (83) mediante otra estrategia generaron exitosamente con la tecnología CRISPR/Cas9 líneas *knockout* para los genes *pfr* (*paraflagellar rod*) 1 y 2, determinando que las proteínas PFR1 y PFR2 están involucradas en el ensamblaje del flagelo al cuerpo celular y la movilidad del parásito. En este caso no se observó ninguna toxicidad detectable por parte de la proteína Cas9 sobre los parásitos, apreciándose en las curvas de crecimiento un crecimiento similar entre las líneas transfectadas con el sistema Cas9 y la silvestre. Asimismo, estos autores demostraron que la introducción de un donador de ADN al inducir el DSB, la reparación mediante HDR incrementa la eficiencia de la edición del genoma en un 100%, generando una población *knockout* homogénea para los genes de interés en aproximadamente en 5 semanas.

Recientemente, se describió que es posible transfectar amastigotes extracelulares mediante una electroporación convencional, demostrando de esta manera, que se pueden realizar *knockouts* mediante el sistema CRISPR/Cas9 en amastigotes extracelulares (92).

1.4 Productos reactivos del oxígeno (ROS) y *T. cruzi*

T. cruzi, aparte de tener que hacer frente con los metabolitos tóxicos endógenos producidos como subproductos del metabolismo aeróbico, también como parásito obligatorio que es, debe hacer frente al desencadenamiento oxidativo producido por el sistema de defensa tanto del insecto vector como

del mamífero (dependiendo del estadio evolutivo en el cual se encuentre), los cuales incluyen la producción de aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) (**Figura 1.13**) (93). Dichas especies son definidas como derivados moleculares del oxígeno, los cuales pueden incluir a moléculas y radicales libres (94). Los radicales libres son especies químicas con al menos un electrón desapareado, dentro de los cuales podemos encontrar al hidrógeno (un electrón no apareado), la mayoría de los metales de transición, la propia molécula de oxígeno O_2 (dos electrones no apareados), entre otros (95).

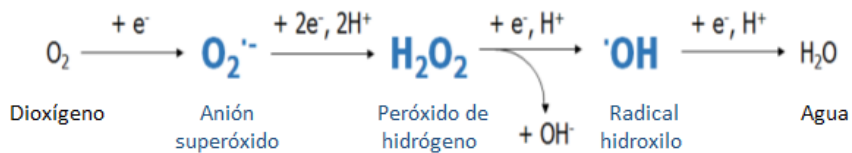


Figura 1.13. Captación de electrones y protones en el proceso de generación de ROS. La generación de ROS (azul) a partir de oxígeno se produce gracias a la captación sucesiva de electrones y protones. Modificado de Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1990) (96).

Las ROS son inestables y reaccionan rápidamente con radicales libres y macromoléculas, pudiendo generar reacciones en cadena que generan oxidantes cada vez más nocivos. Estos pueden ser producidos ya sea por la acción de oxidasas y oxigenasas específicas (como por ejemplo, la xantina oxidasa y NADPH oxidasa), por peroxidasas (ejemplo, la mieloperoxidasa), en la reacción de Fenton y como subproducto de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, la cual contiene varios centros redox que pueden liberar electrones al oxígeno, constituyendo la fuente principal de $O_2^{\bullet-}$ en la mayoría de las células (94,97,98).

Los oxidantes derivados de NO recientemente han sido denominados especies reactivas del nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*) (97). El óxido nítrico (NO) es producido por la actividad enzimática de las óxido nítrico sintasas

(NOS), las cuales transfiriendo electrones desde NADPH oxidan la L-arginina (99).

La reacción de Fenton denominada así en honor a su descubridor, incluye una serie de posibles reacciones (**Figura 1.14**). La más conocida es aquella donde se producen radicales OH• en condiciones de ambiente ácido y usando peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y que se encuentra catalizada por el hierro (100,101). En condiciones fisiológicas, el hierro se encuentra ligado a proteínas, que además de transportar el hierro, lo mantienen soluble y "prácticamente" no-tóxico, por no ser capaz de llevar a cabo las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Fe³⁺ + O₂^{•-} → Fe²⁺ + O₂) (102). En situaciones de sobrecarga de hierro, se satura la capacidad de unión a proteínas, y el hierro no ligado origina daño celular (98,103), relacionándose la toxicidad del hierro con la química de Fenton y de Haber-Weiss, donde pequeñas cantidades del mineral son suficientes para formar radicales hidroxilo (OH•) a partir de superóxido (O₂^{•-}) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como se ha descrito anteriormente.

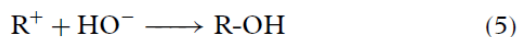
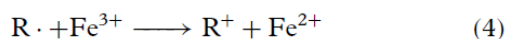
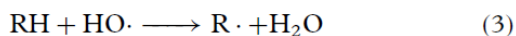
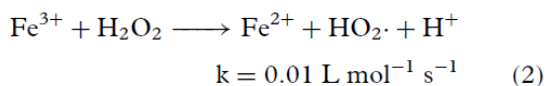
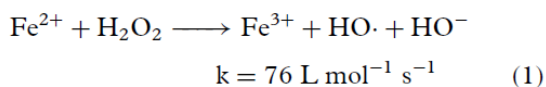


Figura 1.14. Eventos de la reacción de Fenton y posibles intermediarios. (1) Reacción descrita por Fenton (2) Regeneración del catalizador (3 al 5) Reacciones a partir de Fe³⁺ con radicales orgánicos intermediarios. Tomado de Bautista, P. et al. (2008) (101).

El término estrés oxidativo se utiliza para describir el desequilibrio entre la formación excesiva de ROS y/o RNS en comparación con los antioxidantes, así que cuando la cantidad de oxidantes tanto endógenos como exógenos es

mayor que la de los antioxidantes, se produce el daño celular, afectando a lípidos, proteínas y ADN (97). El desequilibrio puede deberse a un aumento en la producción de ROS o bien, o una disminución en los sistemas antioxidantes o de reparación, o a una combinación de estos factores (104). Se define como antioxidante a cualquier sustancia que a bajas concentraciones, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato. Otro término bastante utilizado es el *scavenger* o “basurero”, el cual hace referencia a cualquier compuesto que puede combinarse con un radical libre y alterar la cinética o el curso de las reacciones de radicales libres. Según Halliwell & Gutteridge, 1990 (96), existen varias estrategias de los antioxidantes para anular las especies reactivas, dentro de las cuales podemos destacar:

- i) **Agentes que catalíticamente eliminan especies reactivas**, así como las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).
- ii) **Agentes que controlan la formación de especies reactivas**, como por ejemplo el desacoplamiento de proteínas o el ensamblaje de transportadores de electrones en complejos que favorecen la pérdida de electrones al O₂. En esta categoría se incluye a proteínas capaces de minimizar la actividad de pro-oxidantes como iones de hierro, cobre o el grupo hemo. Son el caso de las transferrinas, la albúmina, haptoglobinas, hemopexina, hemooxigenasas y metalotioneína.
- iii) **Agentes que protegen a las biomoléculas frente al daño oxidativo mediante otros mecanismos**, como son las chaperonas, proteínas que recubren al ADN o enzimas que determinan los niveles de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana mitocondrial.
- iv) **Agentes de bajo peso molecular que captan ROS y RNS**, así como glutatión, α -tocoferol, bilirrubina, ácido úrico, entre otros.
- v) **Compartimentación**, un ejemplo sería los peroxisomas que se encuentran compartimentalizados para mantener los iones de hierro alejado del H₂O₂, evitando la formación de ROS más tóxicos.

De forma que cuando la célula se encuentra bajo estrés oxidativo, las ROS pueden oxidar lípidos (peroxidación), proteínas (carbonilación) e incluso el ADN. En los lípidos, el radical libre oxida los dobles enlaces de los ácidos grasos y en las proteínas produce la ruptura de la cadena peptídica, lo que puede provocar la desestabilización y finalmente destrucción de la membrana celular, llevando a la muerte celular. Otras dianas de las ROS son las proteínas y lípidos intracelulares, no sólo los de membrana. Por último, los radicales libres en el ADN pueden dañar las bases de la cadena de ribonucleótidos, por la acumulación de peroxinitrilo que acelera el envejecimiento tisular (105).

En tripanosomátidos, el hierro es esencial para la replicación del ADN, la defensa antioxidante, la respiración mitocondrial y también para la síntesis de la base modificada "J". Esta base nitrogenada es la única base hipermodificada encontrada en eucariotas, está presente en todos los kinetoplastos y algunos flagelados relacionados cercanamente con los tripanosomátidos, y posee un papel importante en la regulación de la expresión génica (106,107). Las herramientas que *T. cruzi* posee para lidiar con las ROS se describen a continuación:

i) **Estrés oxidativo generado por fuentes extracelulares:**

T. cruzi tiene un sistema antioxidante que se adapta a las condiciones impuestas por su ciclo de vida digenético, pudiendo encontrarse:

Dentro de los macrófagos: los macrófagos son una de las primeras líneas de defensa contra patógenos intracelulares que poseen los organismos superiores. Tradicionalmente, desde los años '80 se asumió que *T. cruzi* podía ser eliminado de los organismos mediante las ROS generados por los macrófagos activados que lanzarían en la llamada "bursa respiratoria", proceso por el cual se

denomina "estallido respiratorio". La detección de agentes infecciosos conduce a la activación de la NADPH oxidasa unida a la membrana, un complejo de múltiples subunidades que utiliza NADPH como un donante de electrones para reducir el oxígeno (O_2) a anión superóxido (O_2^-) dentro del fagosoma. La naturaleza aniónica del O_2^- restringe su difusión a través de las membranas de la vacuola, limitando su acción en el sitio de formación.

Los radicales superóxido pueden descomponerse espontáneamente o enzimáticamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un oxidante con mayor capacidad de difusión. Los iones de los metales de transición en presencia de H_2O_2 pueden generar radicales hidroxilo ($OH\bullet$), un oxidante que, debido a su alta reactividad, encierra una escasa selectividad contra objetivos celulares y puede ser altamente tóxico. Alternativamente, el anión O_2^- puede reaccionar con el óxido nítrico derivado de la iNOS (NO), para producir peroxinitrito (ONOO-), una molécula efectora citotóxica contra *T. cruzi* (108,109).

Dentro del insecto vector: la respuesta inmune innata del insecto también es eficaz para eliminar patógenos y se realiza a través de mecanismos de defensa tanto "humorales" como celulares (110). Las respuestas efectoras del sistema inmune del insecto son variadas y dependen de la especie de insecto, entre las que podemos distinguir la fagocitosis, la producción de intermedios reactivos de oxígeno (ROI), intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI), moléculas pro-apoptóticas y moléculas asociadas con el mantenimiento de la homeostasis redox intracelular (111). Actualmente hay una creciente evidencia de que O_2^- y ROS se encuentran involucrados en los mecanismos de defensa frente a patógenos que posee el insecto (93,112).

ii) **Estrés oxidativo generado intracelularmente:**

Como se ha mencionado anteriormente, una importante fuente de ROS en *T. cruzi* son los sub-productos de su propio metabolismo. Las ROS se produce

principalmente a partir de la salida de electrones desde la cadena transportadora de electrones de la mitocondria. Como otros parásitos, *T. cruzi* depende de la fuente de carbono del hospedador para la producción de energía, el cual depende de la fase biológica en el que se encuentre el parásito. En tripomastigotes sanguíneos, la glucosa es abundante, constituyendo la principal fuente de energía para esta forma, pudiendo fermentar la glucosa a CO₂, succinato y pequeñas cantidades de acetato a través de la glucólisis dentro de los glicosomas mediante fermentación aeróbica (113).

Los amastigotes, los cuales residen en el citoplasma rico en azúcares y ATP de las células, también dependen de la fermentación y posiblemente derivan su energía completamente de la glucólisis (114), aunque estudios de proteómica han dilucidado que durante la transformación de tripomastigotes a amastigotes disminuye la síntesis en general de transportadores de glucosa y aumenta la expresión de enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos (115). En cambio, las formas de epimastigotas al principio agotan rápidamente la glucosa disponible en el insecto y posteriormente tienen como principal fuente de energía la oxidación de la L-prolina (116), la cual contribuye así mismo a evitar el daño causado por las ROS (117).

En la forma epimastigotes es cuando la cadena transportadora de electrones es más eficiente, sugiriendo una adaptación a la disponibilidad nutricional del hospedador y la variación en las ROS producida por el metabolismo en cada etapa del desarrollo. Durante la transición de las formas epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos (metacicloogénesis) se ha descrito un aumento en la expresión de enzimas y sustratos antioxidantes para la defensa del parásito frente a ROS, siendo posiblemente una adaptación previa a la invasión de las células de los mamíferos y su entorno altamente oxidativo (93).

Mecanismos antioxidantes de *T. cruzi*

De modo general las células en eucariotas poseen un serie de mecanismos compensadores como antioxidantes enzimáticos, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la peroxiredoxina (Prx) y la glutatión peroxidasa (GPx). Estas enzimas trabajan en tándem para eliminar las ROS producidas en la célula. La SOD convierte $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , y puede encontrarse en diferentes isoformas con distinta localización celular (matriz mitocondrial, citoplasma, espacio entre las membranas de las mitocondrias, entre otros). La CAT, ubicada en los peroxisomas, convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 . La enzima Prx reduce los peróxidos, incluidos el H_2O_2 y los hidroperóxidos de alquilo. La GPx, se puede encontrar en 5 isoformas, las cuales utilizan glutatión (GSH) y reducen el H_2O_2 o los peróxidos lipídicos (ROOH) a H_2O o alcoholes (ROH) (98).

A diferencia de la mayoría de eucariotas, *T. cruzi* carece de enzimas como catalasa (118) y la glutatión peroxidasa (93), enzimas que son capaces de metabolizar altos niveles de peróxido de hidrógeno siendo importantes en eucariotas para hacer frente a ROS. No obstante, el parásito en estudio, posee un sistema antioxidante que se adapta a las condiciones impuestas por su ciclo de vida que consta de varias peroxidases, dos glutatión peroxidases dependientes de la cisteína, una hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (TcAPX) y dos peroxidases triparedoxina. Las peroxidases de triparedoxina difieren en su ubicación subcelular, una forma citosólica y una mitocondrial (TcCPX y TcMPX, respectivamente) y catalizan la reducción de H_2O_2 , hidroperóxidos orgánicos de cadena pequeña y $ONOO^-$. En el retículo endoplasmático, la TcAPX y la peroxidasa II dependiente de glutatión (GPX-II) metabolizan el H_2O_2 y los hidroperóxidos (119–121). *T. cruzi* contiene cuatro superóxido dismutasas que utilizan como cofactor el hierro (FeSOD), las cuales eliminan el superóxido por dismutación en H_2O_2 y oxígeno molecular (122). Existen evidencias de que esta red de antioxidantes puede

jugar un papel importante en la virulencia de los parásitos y en el éxito de la infección. Esto se corrobora con los parásitos que sobreexpresaron otras enzimas antioxidantes como TcCPX, TcMPX y SODA las cuales poseen una mayor capacidad de eliminar los compuestos oxidantes ONOO, H₂O₂ e hidroxidrogenasas orgánicas de cadena pequeña, después de la exposición al H₂O₂ en comparación con los parásitos silvestres, y son por tanto más resistentes a condiciones de estrés (119–121).

A pesar de este sistema antioxidante, las macromoléculas del parásito, particularmente el ADN, pueden sufrir daños por la oxidación que induce roturas en la macromolécula con los consiguientes efectos perjudiciales si no se reparan. Debido a su bajo potencial redox, la guanina (G) es la base más vulnerable. La oxidación de G da como resultado la formación de 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG), el cual se utiliza como un marcador celular del estrés oxidativo. La 8-oxoG asume una configuración mutagénica dado que imita funcionalmente a la timina, pudiendo insertarse en la molécula de ADN durante la replicación, generando roturas de doble cadena.

Diversos estudios han mostrado como en parásitos con una mayor actividad de la 8-oxo-dGTPasa se multiplican mejor los amastigotes, que los de los parásitos silvestres (123). Además Goes et al (2016)(124), demostraron que los parásitos que sobreexpresaron 8-oxo-dGTP mostraron un mejor crecimiento en los cultivos de macrófagos, confirmando que estos parásitos se multiplican mejor *in vivo*, por lo tanto, la protección del ADN contra el estrés oxidativo es beneficiosa para el rendimiento del parásito tanto *in vivo* como *in vitro*. Los parásitos que sobreexpresaron la enzima evitaron la incorporación de 8-oxo-dGTP en el ADN cuando se expusieron a H₂O₂ (125,126).

Beneficios de ROS en *T. cruzi*

Además de los efectos perjudiciales producidos por las ROS, también se ha encontrado que una cantidad limitada de ROS podría ser beneficiosa para el parásito en estudio. El balance entre la producción y degradación es importante, describiéndose que las señales producidas por ROS pueden estimular el crecimiento del parásito (127), una concentración de 100 μM de H_2O_2 puede aumentar la proliferación de amastigotes en células infectadas (127,128) e inclusive favorecer la infección (127), en cambio una incubación con 300 μM de H_2O_2 reduce la carga de parasitaria (118,129), demostrando que *T. cruzi* solo puede hacer frente a una cantidad limitada de ROS. Por otra parte, se ha descrito que un ambiente oxidativo aumenta la disponibilidad de hierro dentro de los macrófagos, dado que el estrés oxidativo moviliza el hierro de los almacenamientos intracelulares del hospedador, siendo el hierro un cofactor esencial que es necesario para la división de los amastigotes (93,130,131)

1.5. Superfamilia SPFH

La superfamilia de proteínas SPFH (*Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C*), es una superfamilia que presenta un motivo común denominado SPFH, también conocido como dominio PHB o Band-7. Dentro de la superfamilia SPFH los representantes más destacados son:

Las **erlinas**, es un grupo representado por la erlina 1 y la erlina 2, que son los miembros más recientes de la creciente superfamilia de las SPFH. Su distribución subcelular incluye la membrana plasmática, los fagosomas, balsas lipídicas, vesículas del aparato de Golgi, mitocondrias, el núcleo y retículo endoplasmático (RE). Dichas proteínas pueden poseer regiones especializadas en el retículo endoplasmático para facilitar diversas actividades tales como la biosíntesis y el anclaje de GPI, el control de calidad y la degradación de

proteínas, el procesamiento del péptido señal proteolítico, funciones de chaperona y/o el procesamiento y presentación de antígenos en las células linfoides (132).

Las **estomatinas**, en general, suelen adherirse al lado citosólico de la membrana plasmática y de las membranas de las vesículas intracelulares. Se las ha asociado con un papel de percepción de señales, tales como fuerzas mecánicas y osmóticas en microdominios definidos estructural y funcionalmente. Son unas de las principales proteínas integrales de membrana de los eritrocitos humanos (133), y se las ha implicado en la regulación de los canales iónicos y en las defensas de las plantas, desempeñando un papel en la resistencia al ataque de patógenos a través de reacciones de hipersensibilidad que culminan en la muerte celular. En *Caenorhabditis elegans*, miembros de esta familia están involucrados en la coordinación y en los receptores sensoriales que reaccionan ante la presión mecánica (134).

Las **flotilinas**, se encuentran representadas por las flotilina 1 y flotilina 2, las cuales se expresan en una amplia variedad de organismos tanto procariotas como eucariotas, encontrándose ambos fundamentalmente en la membrana plasmática y en el aparato de Golgi, aunque también están presentes en otras localizaciones como endosomas, fagosomas, y núcleo, siempre asociadas a lípidos (134). Estas proteínas han sido implicadas en la transducción de señales, el tráfico de vesículas y el reordenamiento del citoesqueleto (135).

Las **podocinas** son proteínas integrales de membrana que muestran una identidad del 47% con la estomatina humana. Se localizan en la membrana plasmática de células epiteliales renales altamente especializadas llamadas podocitos, que participan en la ultrafiltración de plasma durante la formación primaria de la orina (134).

Las **HflK** y **HflC** son dos proteínas bacterianas las cuales residen hacia el lado del periplasma de la membrana plasmática (136) y regulan la actividad lisogénica durante la infección por bacteriófagos (136). Ambas proteínas contienen un dominio transmembrana corto y dos dominios superpuestos más grandes, el dominio SPFH, que cubre aproximadamente el 50% de la proteína, y un dominio HflC, asociada con la actividad de proteasa de membrana en bacterias (135).

Las **prohibitinas**, es una familia representada por la prohibitina 1 (PHB1) y prohibitina 2 (PHB2), las cuales en un principio se las asoció con una localización mitocondrial. Dichas proteínas pueden proteger a las proteínas no ensambladas en la membrana mitocondrial contra la proteólisis mediada por una proteasa m- AAA, estabilizar el genoma mitocondrial y la morfogénesis mitocondrial, entre otros (137,138). Posteriormente, en el apartado 1.6 de este capítulo describiremos esta familia con mayor detalle.

El motivo SPFH/ Band7/PHB es distintivo de la familia prohibitina (PHB), a pesar que los otros miembros de la superfamilia lo contienen (**Figura 1.15**), estos a parte del motivo PHB poseen otros motivos que lo distinguen de la familia de la PHB. Dicho motivo se encuentra en especies divergentes tanto de procariotas como en eucariotas, incluido el ser humano. Las proteínas de la superfamilia SPFH tienen una propensión a formar oligómeros (139), se ha encontrado que las prohibitinas, estomatina y podocina pueden formar grandes complejos multiméricos de 12 o más monómeros. Además la PHB1 y PHB2 pueden formar hetero-oligómeros, mientras que la estomatina y la podocina forman homo-oligómeros (139–141).

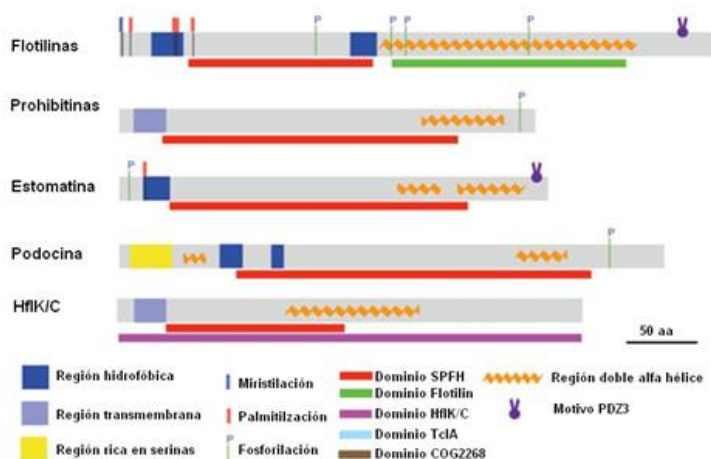


Figura 1.15. Predicciones *in silico* de la estructura secundaria, de las modificaciones postraduccionales y motivos de los miembros de la superfamilia SPFH. Tomado de Rivera-Milla, E., et al. (2006) (135).

Las proteínas de esta superfamilia comparten varias características comunes, entre las que se incluyen la tendencia a oligomerizar como se ha mencionado anteriormente, la de presentar modificaciones postraduccionales y el hecho de que tengan un direccionamiento celular por mecanismos desconocidos (142). Miembros de esta superfamilia se han encontrado formando parte de balsas lipídicas (*lipid rafts*) o interactuando directamente con lípidos (138,143). Estas proteínas se encuentran ancladas en las membranas celulares, hallándose incluidas en la membrana plasmática, en endosomas tempranos, en el aparato de Golgi, balsas lipídicas, en la mitocondria y en el retículo endoplasmático (RE) (132,134,135,142). La localización intracelular más común de los miembros de esta superfamilia en mamíferos se muestra en la **Figura 1.16**.

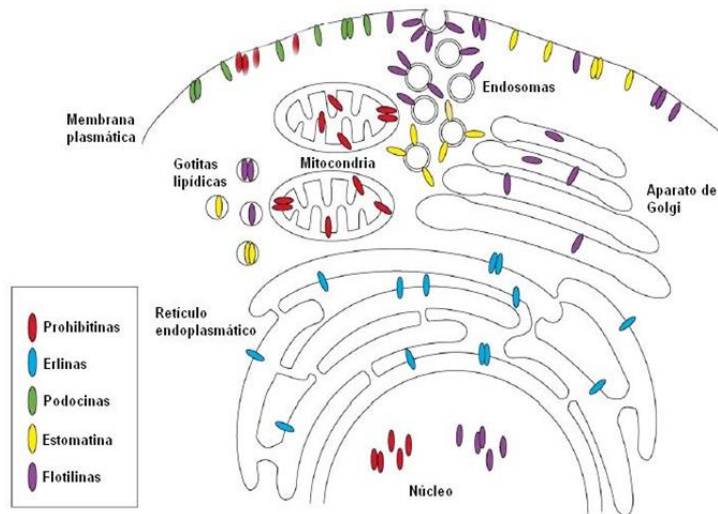


Figura 1.16. Distribución subcelular de las proteínas que contienen el dominio SPFH en mamíferos (células epiteliales o fibroblastos). Las PHBs (rojo) generalmente se encuentran en la membrana mitocondrial interna, en el núcleo o membrana plasmática. Erlinas 1 y 2 (azul) se localizan en el RE, que incluye la membrana nuclear externa. Podocina (verde) se encuentra solo en la Membrana plasmática. Estomatina 1 (amarillo) se localiza en la membrana plasmática, endosomas y gotitas de lípidos. Las localizaciones subcelulares de las flotilinas 1 y 2 (morado) incluyen la membrana plasmática, endosomas, gotitas de lípidos y el núcleo. Adaptado de Browman, D. T. et al. (2007) (142).

Una distribución celular tan variada sugiere un papel fundamental para el dominio SPFH y los procesos en los cuales están involucrados son diversos, como pueden ser la regulación de canales iónicos, el formar parte de estructura de membranas, el tráfico de vesículas y proteínas, el acoplamiento de las membranas al citoesqueleto, la formación de microdominios y de estructuras especializadas en la membrana, así como el reclutamiento de complejos multiproteicos para la señalización y tráfico de proteínas (134,135,142,144,145).

La orientación subcelular de los miembros de la superfamilia SPFH no son identificables por los algoritmos actuales (132,146). Los extremos N-terminal (incluidas las regiones hidrofóbicas) de las PHB1 y PHB2, la erlina y la estomatina son suficientes para dirigir una proteína heteróloga a las

mitocondrias, al retículo endoplasmático o la membrana plasmática respectivamente, posiblemente mediante modificaciones postranscripcionales (141,142).

1.6 La familia de las prohibitinas

La primera prohibitina descubierta en mamíferos (PHB1) se describió como una proteína inhibidora de la proliferación de tumores (147,148) y de ahí el nombre de prohibitina. Sin embargo dicha actividad hoy en día se le atribuye al extremo 3' UTR del ARNm del gen *phb1*, es decir que no está relacionada con la función de la proteína en sí (149–151). Posteriormente se descubrió otra prohibitina, la PHB2 (152). La PHB1 también es conocida como Bap-32 (*B cell receptor complex associated proteins*) y la PHB2 como prohibitona o Bap-37 (138,142).

La familia de las prohibitinas (PHBs) está constituida por proteínas de membranas evolutivamente conservadas que se expresan tanto en procariotas como en eucariotas, incluyendo a los hongos, plantas, animales y humanos (134,135,142,143,153). El dominio conservado SPFH/PHB se encuentra próximo al segmento transmembrana en el extremo N-terminal de la proteína (135,143). Las prohibitinas de los procariotas se han agrupado en una subfamilia denominada SPFH4. Es la subfamilia más diversa con respecto a su estructura primaria (154).

Las PHBs se encuentran en general formando un complejo mitocondrial, comprendido por dos subunidades altamente homólogas PHB1 y PHB2 (alrededor del 50% de identidad de secuencia aminoacídica y 60% de similitud) (137,138), aunque se han descrito otros miembros en otras localizaciones como el núcleo y la membrana plasmática (138,145,155). En las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans* y seres humanos, las PHBs se ensamblan en un complejo en forma de anillo en la membrana interna, teniendo una existencia que es mutuamente dependiente. Ambas

proteínas co-inmunoprecipitan, y la eliminación de una PHB conduce a la desaparición de la otra en *Trypanosoma brucei* (156).

Estas proteínas pueden estar implicadas en diferentes procesos biológicos tales como apoptosis, control transcripcional, señalización celular, senescencia y biogénesis mitocondrial (156). Se ha propuesto que el complejo PHB es crítico para el correcto plegamiento y estabilización de las subunidades del complejo respiratorio mitocondrial (157). Además, este complejo ha sido relacionado con la regulación de la degradación de proteínas de membrana por la proteasa mitocondrial m-AAA (137) y se ha propuesto que actúa como una chaperona *holdase/unfoldase* que estabiliza a proteínas de membranas no ensambladas. También se ha atribuido un papel en la estabilización del genoma mitocondrial (138).

En levaduras, las PHBs se las ha relacionado con la longevidad y el mantenimiento de la morfología mitocondrial. La falta de una de las PHBs conlleva a que no se forme el complejo PHB (demostrando así su interdependencia en levaduras también), los mutantes nulos presentan un envejecimiento prematuro, probablemente debido a una leve pero acumulativa disminución de la capacidad metabólica celular (158). En las líneas celulares humanas, se han descrito a las PHBs asociadas al complejo respiratorio I en la membrana mitocondrial interna; contribuyendo a su estabilidad y ensamblaje. El efecto protector del complejo PHB en humanos se le ha asociado con la supresión de la producción de ROS mitocondrial y la preservación de la función del complejo I (159).

1.7 Las PHBs en tripanosomátidos

Dentro de los tripanosomátidos, se ha descrito a la PHB1 en *Leishmania donovani* (160) y en *T. brucei* (156). En *T. brucei* la PHB1 tiene localización mitocondrial y se la encuentra formando un complejo de aproximadamente

1.5 MDa de tamaño, observándose que la pérdida de la es letal para el parásito mientras que la represión de la PHB1 no conduce a una pérdida detectable de la actividad ATPasa ni una alteración de las subunidades de los complejos respiratorios III y IV, las proteínas de ensamblaje del conjunto Fe-S IscU y frataxina y la proteína mitocondrial de unión a ARN 1 (MRP1, *mitochondrial RNA-binding protein 1*). Sin embargo, la represión de la PHB1 si provoca una disminución drástica del potencial de la membrana interna de la mitocondria así como cambios significativos en la morfología del orgánulo y en la traducción mitocondrial. Debido a este último hecho se ha propuesto que la PHB podría tener un rol en la estabilización de la síntesis de novo de proteínas mitocondriales (156).

En promastigotas de *L. donovani*, la PHB1 se ha localizado tanto en el polo flagelar como en el aflagelar, más específicamente en el bolsillo flagelar y en la superficie del polo aflagelar. Se ha demostrado que existe una mayor cantidad de PHB1 en promastigotas metacíclicos que en las formas procíclicas. Además, se ha comprobado que la PHB1 se une a la HSP70 del macrófago, correlacionándose el aumento de la proteína en la superficie con una mayor infección lo que ha llevado a formular la hipótesis de que esta proteína de superficie, podría utilizarse como marcador de diagnóstico para la leishmania visceral (LV) (160).

En nuestro grupo de investigación se identificaron por primera vez tanto la PHB1 como la PHB2 de *L. major*. Los estudios de inmunolocalización, pusieron de manifiesto que la PHB1 se encontraba en el bolsillo flagelar, en la mitocondria, y en la membrana plasmática; mientras que la PHB2, aparece localizada en las proximidades de la mitocondria y en el flagelo. Aparte de ser reconocida por los sueros de animales y humanos infectados naturalmente con *Leishmania*, se propuso que las PHBs de *L. major* podrían formar parte de un sistema de eliminación de radicales superóxido, ya que al aumentar la concentración de H₂O₂ en el medio aumentaba la presencia de dichas

proteínas en la membrana plasmática o el núcleo. Asimismo, se demostró que ambas proheparinas poseen dominios y capacidad de ligar iones hierro, permitiendo la protección del ADN frente a ROS. La expresión de las PHBs aumentó en presencia de los iones Fe y sufren una movilización hacia la membrana plasmática (PHB1) o la membrana nuclear (PHB2) al someterse a los parásitos sometidos a estrés oxidativo (161).

En la presente Tesis Doctoral, se presenta la caracterización de las PHB1 y PHB2 de *T. cruzi*, así como la capacidad que poseen dichas proteínas al unirse a Fe^{3+} y el efecto protector que poseen sobre ADN en presencia de H_2O_2 . Asimismo, se describe la localización subcelular de las PHBs en diferentes estadios del parásito, la sobreexpresión y la disminución o eliminación de dichas proteínas a fin de determinar su papel en la biología de *T. cruzi*.

2.OBJETIVOS

La Enfermedad de Chagas es una de las 13 enfermedades tropicales más importantes a nivel mundial, siendo un problema socioeconómico de primer orden en muchos países de América. El problema inicialmente restringido a Latinoamérica, donde la enfermedad es endémica, ha pasado a considerarse una enfermedad de interés global debido a la migración.

Hasta el momento no se dispone de una vacuna o un tratamiento efectivo contra esta enfermedad, causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, por lo que es de suma importancia buscar nuevos blancos terapéuticos o de diagnóstico para el control de la misma.

Con esta premisa, el objetivo general del trabajo fue la caracterización de las prohibitinas 1 y 2 de *T. cruzi*. Y para lograrlo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Clonar y expresar las PHBs de *T. cruzi* en *E. coli*, a fin de obtener anticuerpos policlonales frente las proteínas recombinantes.
2. Analizar los niveles de expresión de las PHBs en los diferentes estadios de *T. cruzi*, y comparar su expresión con las PHBs de *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*.
3. Establecer la localización subcelular de PHB1 y PHB2 en diferentes estadios de *T. cruzi*.
5. Sobreexpresar PHB1 y PHB2 en *T. cruzi*, a fin determinar el papel que dichas proteínas juegan en la biología de estos protozoos.

Objetivos

6. Silenciar la expresión de estas proteínas mediante el sistema CRISPR/Cas9 a fin de determinar su papel en la biología de *T. cruzi*.

7. Determinar la antigenicidad de las proteínas de estudio y su potencial utilización como antígenos en el diagnóstico de pacientes chagásicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares y manejo de tripanosomátidos

3.1.1 Células Vero

3.1.1.1 Línea celular

Cultivos de células Vero procedentes del riñón de mono Verde Africano adulto, fueron usados en los experimentos de infección y obtención de los distintos estadios del parásito. Esta línea celular fue proporcionada por en el Servicio de Cultivos Celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC). Dicha línea celular posee el código internacional: ECACC 84113001.

3.1.1.2 Cultivo celular y mantenimiento

Las células Vero se cultivaron en medio MEM (la composición de todos los medios y soluciones se encuentran detallados en el apartado 3.21 de este capítulo) suplementado con 10% SBFi (Suero bovino fetal previamente inactivado a 56°C durante 30 min) a 37°C y en una atmósfera húmeda enriquecida con el 5% de CO₂ como ha sido descrito previamente en los trabajos de nuestro grupo (162). Las células crecieron adheridas formando monocapa en la superficie de frascos de cultivo (Nunc) dispuestos en posición horizontal. Una vez que las células alcanzaron un estado de total confluencia tras su crecimiento, y al objeto de desprenderlas y realizar los subcultivos se procedió a su tripsinización. Para ello, se realizó un primer lavado con la solución EDTA-Tripsina cubriendo la monocapa. Tras eliminar el medio de cultivo se le añadieron 5 ml de la solución EDTA-Tripsina que se incubó a 37°C durante 5 a 10 min, hasta el desprendimiento de la monocapa, tras lo cual se añadieron 5 ml de medio MEN con suero para inactivar la tripsina, centrifugándose a 1.500 x g a 4°C durante 5 min. Tras dos lavados con MEN se resuspendió el botón celular en medio MEN 10% SBF, procediéndose a

realizar un nuevo cultivo utilizando 1×10^4 células/ml en frascos Roux de 75 cm² de superficie con 5 ml de medio MEM 10% SBF.

3.1.1.3 Criopreservación

Los botones de células Vero tripsinizadas y lavadas como se ha descrito anteriormente, se resuspendieron en medio de congelación y la suspensión celular se alicuotó en crioviales (Nunc) para una congelación progresiva de enfriamiento a 1°C por minuto hasta llegar a -80°C. Los viales con las células fueron mantenidos en tanques de nitrógeno líquido a -170°C.

3.1.2 Medio y condiciones de cultivos de los diferentes estadios de *T. cruzi*

En el presente trabajo se utilizaron las cepas PAN4, DM28c, Y, 3663, 4167, 92.80 cl2 y CL Brener de *T. cruzi* (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Cepas de *T. cruzi* utilizadas.

Cepa	DTUs	Origen	Aislado de:
PAN4	Tc I	Panamá	<i>Homo sapiens</i>
DM28c	Tc I	Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>
Y	Tc II	Brasil	<i>Homo sapiens</i>
3663	Tc III	Brasil	<i>Pastrongylus geniculatus</i>
4167	Tc IV	Brasil	<i>Rhodnius brethesi</i>
92.80 cl2	Tc V	Bolivia	<i>Homo sapiens</i>
CL Brener	Tc VI	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>

3.1.2.1 Cultivo de las formas epimastigotas

El medio utilizado para el crecimiento de formas epimastigotas de *T. cruzi* fue LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (163) suplementado con 10% de SBFi. El

medio se esterilizó por filtración bajo presión positiva a través de filtros estériles Millex-GP de 0.22 μM (Millipore). Los epimastigotes fueron cultivados a 28°C en frascos Roux (Cellstar), manteniéndolas en fase logarítmica de crecimiento.

3.1.2.2 Obtención de las formas tripomastigotas metacíclicas

La metacicloogénesis es el proceso correspondiente a la diferenciación de epimastigotas de *T. cruzi* a tripomastigotas metacíclicas. Este proceso de diferenciación se llevó a cabo a partir de cultivos de epimastigotes tras cultivarlos durante 5 días en medio LIT suplementado con 10% SBFi. Los epimastigotes en la fase logarítmica de crecimiento, fueron lavados dos veces con LIT, y centrifugados a 2.000 x g durante 5 min. El número de parásitos se ajustó a 5.10^8 cel/ml y se cultivaron en medio TAU (*Triatomine Artificial Urine*) (164) durante 2 h a 28°C. Posteriormente, los parásitos fueron diluidos a 5.10^6 cel/ml con el medio TAU suplementado con aminoácidos (TAU3AAG) y se incubaron durante 72 h a 28°C.

3.1.2.3 Obtención de amastigotes intracelulares y tripomastigotes sanguíneos

Dado que *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado, para la obtención de **amastigotes** y **tripomastigotes sanguíneos** fue necesario infectar células Vero con las formas metacíclicas del parásito, siguiendo el procedimiento descrito por Osuna, A. et al. (1984) (165). Para lo cual se sembraron 5×10^6 células Vero (mantenidas en MEM con 10% SBFi a 37°C con 5% CO_2) en frascos de cultivo estériles de 150 cm^2 con 20 ml de MEM sin suero suplementado con Timidina, a fin de sincronizar las células en fase S del ciclo celular y así facilitar la infección celular. Al día siguiente, con una confluencia de aproximadamente el 80% de las células, los cultivos se infectaron en una proporción de 10 tripomastigotes metacíclicos por célula,

manteniéndose la infección durante 12 h. Tras eliminar los parásitos no adheridos y los que no habían penetrado, se mantuvo el cultivo en medio MEM 10% SBFi durante 5 días a 37°C.

Para la obtención de los **amastigotes intracelulares** se siguió el protocolo descrito por Marques et al. (2014) (166) para ello, se lavaron las células con PBS y se rasparon suavemente con raspadores estériles para desprender las células. La suspensión celular se hizo pasar a través de una aguja de calibre 27 gauges conectada a una jeringa de 30 ml, a fin de romper las células y que los **amastigotes intracelulares** pudieran ser liberados. La suspensión resultante se centrifugó a 800 x g durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares de las células hospedadoras, centrifugándose el sobrenadante posteriormente a 4.000 x g durante 5 min a 4°C a fin de concentrar en el botón o *pellet* los amastigotas. El botón se congeló a -20°C hasta su uso.

Para la obtención de las formas **tripomastigotas sanguíneas** derivadas de cultivos celulares, después de infectar las células como se describió en el párrafo anterior, se las incubó aproximadamente una semana, hasta que los **tripomastigotas sanguíneos derivados de cultivos celulares** fueron liberados desde las células hospedadoras. Con las formas tripomastigotas resultantes se volvió a obtener una monocapa de células a fin de mantener la producción continua de estas formas del parásito.

3.1.3 Aislamiento de exovesículas

Los aislados de exovesículas fueron cedidos por la investigadora Lissette Retana de nuestro grupo de investigación. Para su obtención se siguió el protocolo descrito por Díaz Lozano, I. et al. (2017) (167), a partir de cultivos de epimastigotas o tripomastigotas de *T. cruzi* de las cepas DM28c, PAN4 y CL Brener con aproximadamente $1 \cdot 10^7$ cel/ml. Para su obtención se siguió un método basado en una centrifugación diferencial del medio de cultivo de las

formas del parásito, seguido de filtración a través de filtros de 0.45 μm para los ectosomas y 0.22 μm para los exosomas. Tras su purificación, se cuantificaron tanto los ectosomas como los exosomas con el kit microBCA (Thermo), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.4 Medio y condiciones de cultivos de *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*

Los promastigotes de *L. major* cepa Friedlin se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma), suplementado con suero fetal bovino al 10% con SBFi a 26°C de acuerdo con la metodología descrita por Cruz-Bustos, T. et al. (2018) (161). Se realizaron subcultivos semanalmente manteniéndolos en fase exponencial de crecimiento.

Las formas procíclicas de *T. brucei* cepa TREU927 fueron generosamente proporcionados por el Dr. Luis Miguel De Pablos de nuestro grupo de investigación.

3.1.5 Criopreservación de las diferentes formas de los tripanosomátidos

Para la criopreservación de las diferentes cepas se partió de 10 ml del cultivo de parásitos en fase exponencial de crecimiento, los cuales se centrifugaron a 1.500 x g durante 10 min a 4°C. El botón obtenido se resuspendió en 2 ml de medio de congelación y se los alicuotó en viales de congelación (Nalgene Cryoware). Estos crioviales fueron introducidos en un contenedor Nalgene Cryo1 conteniendo alcohol isopropílico para una congelación progresiva hasta -80°C, a razón de -1°C por minuto para su posterior almacenamiento en un tanque de nitrógeno líquido a -170°C.

3.2 *Escherichia coli*

3.2.1 Cepas bacterianas utilizadas

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se muestran en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Cepas bacterianas utilizadas.

Estirpe	Genotipo/características	Referencia
Cepa JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15].	(168)
Cepa DH5α	F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	(169)
M15 [pREP4]	Na ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ (Kan ^R)	Qiagen
DB3.1	F- gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1	(170)

3.2.2 Condiciones de cultivo

Las bacterias fueron cultivadas en medio LB líquido, mantenidas en agitación a 240 rpm y 37°C. Los medios de cultivos se suplementaron con los antibióticos de selección; dependiendo de la cepa bacteriana (**Tabla 3.2**) y el vector utilizado. Igualmente se mantuvieron las colonias seleccionadas en placas de Petri con medio LB Agar suplementado con el/los antibióticos necesarios y se incubaron a 37°C durante la noche.

3.2.3 Criopreservación

Las bacterias seleccionadas, se cultivaron en 3-5 ml de LB (suplementado con los antibióticos de selección correspondientes) a 37°C y en agitación (240 rpm) durante toda la noche. A continuación, se realizaron las alícuotas de 850 µl del cultivo bacteriano más 150 µl de Glicerol puro. Se congelaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.3 Plásmidos utilizados

Se describen en el siguiente apartado los plásmidos utilizados y sus características más relevantes. En el texto se detallan algunas propiedades que han sido relevantes para su utilización o en el diseño de los experimentos.

3.3.1 Plásmido pGEM-T

El vector pGEM-T forma parte del kit pGEM-T Easy (Promega), que es un sistema útil para la amplificación y clonación de productos de PCR. Este sistema utiliza polimerasas termoestables capaces de agregar una desoxiadenosina única en los extremos 3' de los fragmentos amplificados, compatible con los extremos 3' del vector prelinearizado pGEM-T. La presencia de un nucleótido de timina en los extremos 3' del vector impide la recircularización de éste, incrementando así la eficiencia en el proceso de ligación.

Este vector contiene promotores de la ARN polimerasa, T7 y SP6 que flanquean a un sitio múltiple de clonación (MSC) dentro de una región codificante para el péptido α de la enzima β -galactosidasa (**Figura 3.1**). Esta enzima cataliza la hidrólisis del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucósido (X-gal), generando un precipitado de color azul. Con este sistema, únicamente añadiendo este sustrato al medio de cultivo se puede identificar

qué colonias poseen plásmidos con inserto (colonias blancas) y cuales contienen el vector vacío (colonias azules).

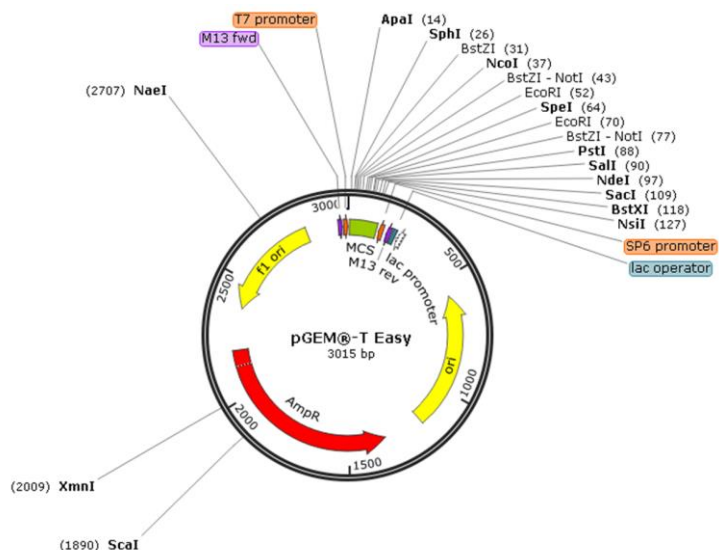


Figura 3.1. Mapa circular del vector pGEM-T Easy: MCS corresponde al sitio de clonación múltiple conteniendo las correspondientes enzimas de restricción con sitio único, flanqueado por los promotores T7 y SP6. En rojo se muestra el gen de resistencia ampicilina y en amarillo los orígenes de replicación.

3.3.2 Plásmido pQE30-Xa

El vector pQE30 (Qiagen) está diseñado para producir un alto nivel de expresión de proteínas recombinantes con un *tag* de seis histidinas en tándem (6xHis), lo cual posibilita la purificación de la proteína recombinante por cromatografía por afinidad en columnas de Ni^{2+} . El vector posee un sistema de transcripción basado en el promotor T5 (perteneciente al fago T5) y dos secuencias del operador *lac*, las cuales incrementan la unión de la proteína LAC para reprimir eficientemente al promotor T5, consiguiendo de esta manera evitar la expresión basal de la proteína de estudio (**Figura 3.2**).

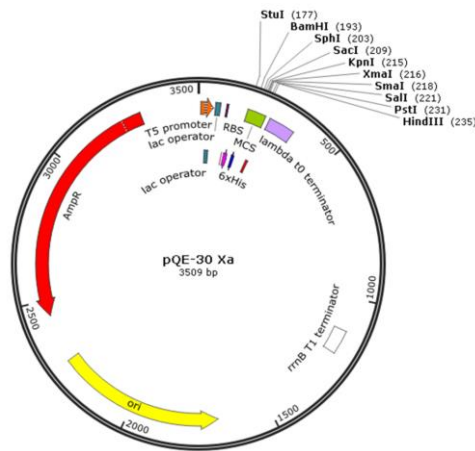


Figura 3.2. Mapa circular del vector pQE30 Xa: en naranja se encuentra el promotor T5, en gris el operador lac, en morado se encuentra el RBS, en verde el MCS (con las secuencias de restricción únicas) y en rojo la etiqueta de histidina (6xHis). Asimismo, en rojo y con forma de flecha se muestra el gen de resistencia a ampicilina.

3.3.3 Plásmido pET-41c

El vector pET-41 (Novagen) (**Figura 3.3**) se caracteriza por tener como *tag* a la enzima glutatión-S-transferasa (GST), la que facilita la expresión de la proteína recombinante en forma soluble y plegada, así como la purificación utilizando columnas con glutatión inmovilizado. El plásmido posee el promotor del bacteriófago T7, siendo la T7 RNA polimerasa muy activa y selectiva. El constructo se obtiene gracias a la presencia de los sitios de clonación LIC, los cuales se detallaran en el apartado 3.7.7. Una vez expresada la proteína de interés, se puede remover el *tag* debido a que previo a la enzima GST se encuentra una secuencia la cual puede ser reconocida por la enteroquinasa (Ek) y escindirla.

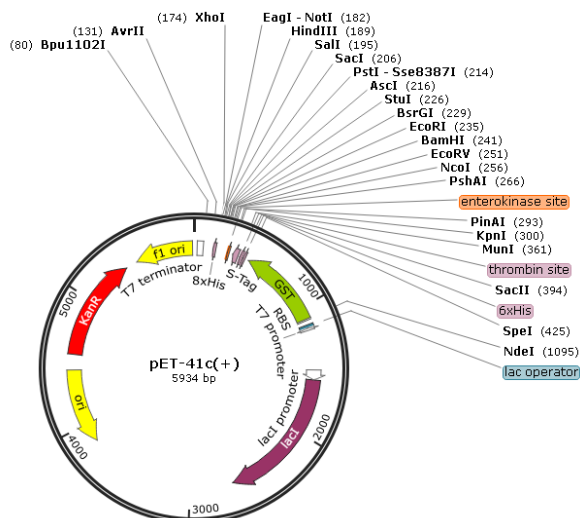


Figura 3.3. Mapa circular del vector pET-41c: la GST se muestra en verde y el sitio de clonación en naranja, el cual contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima enteroquinasa (Ek). En rojo se muestra el gen de resistencia kanamicina.

3.3.4 Plásmido pTREXn-GW TAP-tag

El plásmido pTREX-TAPtag (171) (**Figura 3.4**), derivado del plásmido pTREX (172), posee la habilidad de integrarse en al genoma de *T. cruzi* gracias a la presencia del promotor ribosomal, además, contiene la región HXI y GAPDH, las cuales aumentan la expresión de la de la proteína de interés. Asimismo dicho plásmido, contiene el cassette GATEWAY, el cual contiene un sitio de recombinación que facilita la inserción del gen de interés (para más detalle ver apartado 3.7.8) y un tag denominado TAPtag (~21kDa) (171), formado por un péptido de unión a calmodulina (CBP) y la proteína A (PA) de *Staphylococcus aureus*, y en medio de dichos polipéptidos se encuentra la secuencia para el reconocimiento de la proteasa del virus Etch del tabaco (TEV). El TAPtag permite por un lado el reconocimiento de la proteína de fusión, así como su purificación por afinidad, proceso que se detallará posteriormente. Este plásmido fue cedido a nuestro grupo de investigación por

el Doctor Esteban Serra del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Argentina.

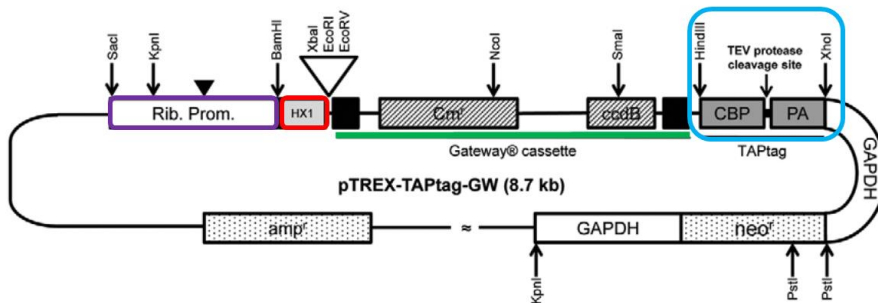


Figura 3.4. Mapa circular del vector pTREX-TAPtag-GW: En verde se muestra el *cassette* GATEWAY (GW) y en celeste se muestra al TAPtag el cual consta del CBP (péptido de unión a calmodulina), PA (proteína A) y el sitio de escisión para la proteasa TEV. En lila se observa al promotor ribosomal y aguas abajo en rojo a la región HX1. Este plásmido posee los genes de resistencia *amp* (ampicilina) y *neo* (neomicina). Flanqueando al gen *neo* se encuentran las regiones intergénicas *gapdh*.

3.3.5 Plásmido pUCsgRNA

El vector pUCsgRNA (173) contiene una secuencia de 82 pb de un ARN guía (ARNg) (ARN capaz de reconocer una secuencia de ~20 pb de un gen diana) parte del sistema CRISPR/Cas9. Esta secuencia se utiliza como plantilla para amplificar los ARNg específicos utilizando un cebador que contiene la secuencia del protoespaciador. Este plásmido fue cedido a nuestro grupo de investigación por el Dr. José Luis Ramírez, perteneciente al Instituto de Estudios Avanzados de Caracas, Venezuela.

3.3.6 Plásmido pTREXn/cas9

Al plásmido pTREXn descrito en el apartado 3.3.4, se le incorporó un *cassette* conteniendo la secuencia correspondiente a la enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes* asociada tanto a una etiqueta de hemaglutinina (HA) como a una secuencia repetida de localización nuclear perteneciente al virus del simio

SV40 (2xNLS), plásmido denominado pTREXn/cas9 (174) (**Figura 3.5**). Aguas arriba de la región HX1 se encuentra el sitio de restricción para la enzima *Bam*HI, que permite la clonación del ARN guía (ARNg). Este plásmido fue cedido gentilmente a nuestro grupo de investigación por el Dr. José Luis Ramírez perteneciente al Instituto de Estudios Avanzados de Caracas, Venezuela.

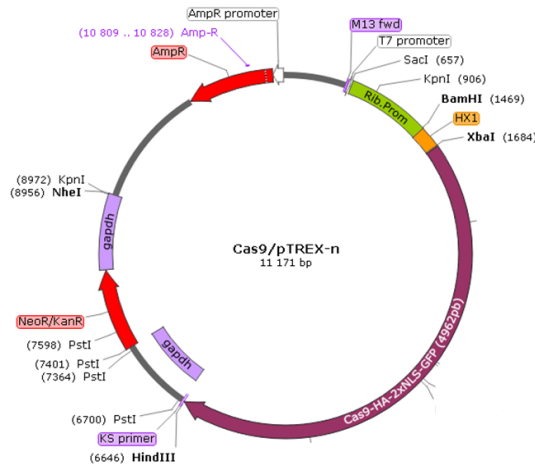


Figura 3.5 Mapa circular del vector Cas9/pTREXn: El *cassette* Cas9-HA-2xNLS-GFP se muestra en morado, en naranja se observa a la región HX1 y en lila a las regiones intergénicas *gapdh*. Este plásmido posee los genes de resistencia *amp* (ampicilina) y *neo* (neomicina), los cuales se observan en rojo.

3.4 Aislamiento y concentración de ADN

3.4.1 Extracción de ADN plasmídico.

Para aislar el ADN plasmídico (ADNp) contenido en las bacterias transformadas, se partió de 3 ml de cultivo de bacterias, previamente inoculadas en medio LB con el antibiótico de resistencia que dependió de la cepa bacteriana utilizada y el vector. Se incubó durante toda la noche a 37°C en agitación a 240 rpm. Una vez cultivadas las bacterias, estas se concentraron centrifugando a 14.000 x g durante 30 s y siguiendo las instrucciones

proporcionadas por el fabricante de *Pure Yield Plasmid Miniprep System Kit* (Promega) para el aislamiento del ADNp.

En caso de requerirse una mayor cantidad de ADN (hasta 200 µg) se utilizó el kit de extracción y purificación *Pure Yield Plasmid Midiprep System Kit* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.2 Extracción de ADN genómico

Para extraer ADN genómico (ADNg), se partió de un cultivo de parásitos en fase logarítmica de crecimiento. Después, se siguieron las instrucciones proporcionadas en *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen). Este kit está diseñado para una purificación rápida de ADN total, obteniendo un producto libre de contaminantes y enzimas inhibitoras, lo cual es altamente adecuado para PCR y otras aplicaciones.

3.4.3 Concentración de ADN

Con objeto de concentrar el ADN obtenido en el apartado 3.4.1, para su posterior transfección en *T. cruzi* se añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M a pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a la muestra de ADNp, se lo incubó durante 20 min a -20°C, centrifugándose a 14.000 × g durante 10 min. Posteriormente el botón se lavó con 2.5 volúmenes de etanol al 70%, volviéndose a centrifugar a 14.000 × g durante 10 min, el sobrenadante fue descartado y se colocó en una termoplaca durante aproximadamente 10 min a 50°C a fin de evaporar los restos del etanol. Finalmente el botón se resuspendió en 20 a 30 µl de agua miliQ.

3.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo la reacción de amplificación de ADN molde (genómico, plasmídico o copia) se usaron concentraciones comprendidas entre 10 y 200 ng de ADN, 10 pmol de cada cebador, 2.5 mM de MgCl₂ (Canvax), 0.2 mM para cada uno de los dNTPs (Canvax) y 2 µl de Buffer 10X (25mM Tris-HCl pH 9, 50mM KCl) con 1 U del enzima Taq Polimerasa (Canvax), para un volumen final de 20 µl. Los cebadores utilizados, con sus respectivas secuencias, se observan en la **Tabla 3.3** y las condiciones de la PCR utilizadas se detallan en la **Tabla 3.4**. La reacción de PCR se realizó en un equipo Termociclador Cfx 96 Real time systems (Bio-Rad). Posteriormente, las muestras amplificadas fueron visualizadas mediante gel de agarosa entre el 0.8 y 2%, dependiendo del tamaño del amplicón esperado.

Tabla 3.3. Cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa.

Nombre	Secuencia	Uso
PHB1pQE30 F	5` AAAAAAGGATCCATGAGTTTAAAATTTCTTCGACATC TTATGACTGG 3`	bacterias
PHB1pQE30 R	5` AAAAAAGGATCCATGAGTTTAAAATTTCTTCGACATC TTATGACTGG 3`	bacterias
PHB2pQE30 F	5` AAAAAAGGATCCATGGCGAAGGCACCACCCGACC 3`	bacterias
PHB2pQE30 R	5` AAAAAAGTCGACTTACAGGCGCCTGCCATGAACG 3`	bacterias
PHB1pET41F	5` GAGACGACAAGATGCTTTATAATAAGATTACTGGTCT TAAAGATTCGG 3`	bacterias
PHB1pET41R	5` GAGGAGAAGCCCGGTCTGCCACTCAAGTTCTTCATGT TAAGCAGCAAATTGC`	bacterias
T7	5` TAATACGACTCACTATAGGG 3`	bacterias
SP6	5` TATTTAGGTGACACTATAG 3`	bacterias
STag	5` GAACGCCAGCACATGGAC 3`	bacterias
pQE30F	5` CCCGAAAAGTGCCACCTG 3`	bacterias

pQE30R	5' GTTCTGAGGTCATTACTGG 3'	bacterias
PHB1RealtimeF	5' GGCAGTTGTGGCAGAGTACA 3'	RT-qPCR
PHB1RealtimeR	5' CTTGCCAAACTGAATGTCCA 3'	RT-qPCR
PHB2RealtimeF	5' ATCACCCAGATGAGCTTTGG 3'	RT-qPCR
PHB2RealtimeR	5' TCACCTTCCGCAAGAAGAAT 3'	RT-qPCR
GAPDHF	5' AGCGCGCGTCTAAGACTTACA 3'	RT-qPCR
GAPDHR	5' AATGACAACCGCAGCTCCA 3'	RT-qPCR
PHB1TAPtagF	5' AAAAAA GGATCCATGAGTTTAAAATTCTTCGACATC 3'	Sobreexp. en <i>T. cruzi</i>
PHB1TAPtagR	5' AAAAAACTCGAGCCGCCACTCAAGTTCTTCATGTT AAGC 3'	Sobreexp. en <i>T. cruzi</i>
PHB2TAPtagF	5' AAAAAAGGATCCATGGCGAAGGCACCACCCGACC 3'	Sobreexp. en <i>T. cruzi</i>
PHB2TAPtagR	5' AAAAAACTCGAGCCCAGGCGCCTGCCATGAACGTC TGC 3'	Sobreexp. en <i>T. cruzi</i>
pTREX-TAPtag F	5' TTCTTCAAAAATATGCAGCGG 3'	Sobreexp. en <i>T. cruzi</i>
pTREX-TAPtag R	5' ACGCTGTGTCAATTGGATCG 3'	Sobreexp. en <i>T. cruzi</i>
TAP-tag R	5' AATATCATAATCAAGTGCCC 3'	Sobreexp. en <i>T. cruzi</i>
pTREX-TAPtag- GW F	5' ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC 3'	Sobreexp. en <i>T. cruzi</i>
pTREX-TAPtag- GW R	5' CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT 3'	Sobreexp. en <i>T. cruzi</i>
BsdEcoRI F	5' AAAAAAGAATTCATGGCCAAGCCTTGTCTCAAG 3'	CRISPR
BsdBamHI R	5' AAAAAAGGATCCTTAGCCCTCCCACACATAACC 3'	CRISPR
PHB1Bsd5' UTR F	5' ATCCGTGCACGTACACTTAAAGC 3'	CRISPR
PHB1BsdEcoRI5' R	5' AAAAAAGAATTCCTGTGCCCCCTCAACTGAGTTAC 3'	CRISPR
PHB1Bsd3' BamH I F	5' AAAAAAGGATCCGTGTGGGCAAGGTGGCAACTCGC 3'	CRISPR
PHB1Bsd3'UTR R	5' CACGCAGCCTCCATTCTTTTGAC 3'	CRISPR

PHB1.2 1R	5'GCGAGTTGCCACCTTGCCACAC 3'	CRISPR
PHB1.2 2R	5'AGACACGACTGCATCCATGC 3'	CRISPR
PHB2Bsd5' UTR F	5'TTGACCTGGGGTTCTCTGTACTTC 3'	CRISPR
PHB2BsdEcoRI5' R	5'AAAAAAGAATTCGTGCTCTTGCCGTAAGACAAGA G 3'	CRISPR
PHB2Bsd3' BamH I F	5'AAAAAAGGATCCGAAGGAGTGGAATGGAATGAAA AG 3'	CRISPR
PHB2Bsd3' UTR R	5'TCAAAGTGCAGGGTACCCAAGACG 3'	CRISPR
1sgPHB1	5'GTTTTCCAGTCACGACGGATCCGAAAAGCGGGCG GCTATTGTG GTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGCT AGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTTTTTTGGATCCAAAAA 3'	CRISPR
2sgPHB1	5'GTTTTCCAGTCACGACGGATCCGGTGGACATTCA GTTTGGCA GTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGCT AGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTTTTTT GGATCCAAAAA 3'	CRISPR
1sgPHB2	5'GTTTTCCAGTCACGACGGATCCGGCGCAACAGAT GGCAGAGC GTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGCT AGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTTTTTTGGATCCAAAAA 3'	CRISPR
2sgPHB2	5'GTTTTCCAGTCACGACGGATCCGTCTTCTTGC AGGTGAGG GTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGCT AGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTTTTTT GGATCCAAAAA 3'	CRISPR
PUCcrisperR	5'CACCGAGTCGGTGCTTTTTTGGATCCACTG 3'	CRISPR
PHB1Bsd5' UTR F	5'ATCCGTGCACGTACACTTAAAGC 3'	CRISPR

Tabla 3.4. Condiciones de la reacción de PCR.

Fases	Condiciones
C ₀) Desnaturalización inicial	95°C 5 min
C ₁) Desnaturalización	95°C 1 min
C ₂) Hibridación	50 a 68°C 1 min
C ₃) Extensión	72°C entre 0.5 y 1.5 min
Número de ciclos (de C ₁ a C ₃)	30 ciclos
C ₄) Elongación final	72°C 5 min
C ₅) Conservación	12°C

3.6 Cuantificación de la expresión de genes

3.6.1 Aislamiento del ARN y retrotranscripción.

Para realizar el aislamiento del ARN total de los epimastigotes y los tripomastigotes sanguíneos, se utilizó un mínimo de 1×10^8 células de cada fase del parásito. Para la extracción del ARN total, se utilizó el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Una vez aislado el ARN total, para eliminar el ADN genómico se utilizó ADNasa siguiendo el protocolo de la casa comercial (Qiagen), procediéndose posteriormente a la purificación del ARNm poliadenilado con el *Oligotex mRNA mini Kit* (Qiagen).

Tras la obtención del ARNm se procedió a la retrotranscripción, utilizando el *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad), que emplea una mezcla de oligo-dT y exanucleótidos aleatorios que permiten la amplificación de todo el ARN, incluyendo al que carece del extremo poli-A.

Para esta reacción se mezclaron los siguientes componentes para un volumen final de reacción de 20 μ l:

- 4 μ l de 5 x iScript Reaction Mix
- 1 μ l de iScript Reversotranscriptasa
- 2 μ l de oligo-dT
- 13 μ l de ARN molde (de 100 fg a 1 μ g de ARN Total)

Las condiciones de incubación para llevar a cabo la retrotranscripción consistieron en una incubación de 5 min a 25°C, de 30 min a 42°C y 5 min a 85°C.

3.6.2 Amplificación y cuantificación de los niveles de expresión de las PHBs por RT-qPCR

La determinación de los niveles de expresión de las PHBs se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR) usando ADNc. Los cebadores utilizados fueron diseñados mediante el programa Eprimer3, y las secuencias se detallan en la **Tabla 3.3**. Las condiciones de amplificación se pusieron a punto usando concentraciones variables de ADNg.

En los ensayos para estudiar los niveles de expresión se utilizó ADNc obtenido de la reacción de retrotranscripción con el Evagreen *Supermix de SsoFast kit* (Bio-Rad). El mismo utiliza la tecnología de la proteína de fusión Sso7d la cual se une a la doble cadena de ADN y estabiliza el complejo de polimerasa-ADN molde, aumentando la eficiencia del proceso de replicación y reduciendo los tiempos de reacción en comparación con las ADN polimerasas convencionales y sin afectar la sensibilidad, eficiencia o reproducibilidad de la PCR. La presencia en el kit del colorante EvaGreen proporciona una mayor fluorescencia en comparación con SYBR Green usado habitualmente.

Para la normalización de la cuantificación se usó como gen de referencia el *gapdh* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Las condiciones utilizadas para la qPCR se detallan en la **Tabla 3.5**. La reacción de la qPCR se realizó en un volumen total de 10 μ l:

- 5 μ l de Ssofast 1X
- 0.5 μ l de PHB-qPCRF 500 nM
- 0.5 μ l de PHB-qPCRR 500 nM
- 3 μ l de Agua MiliQ
- 1 μ l de ADNc 50 ng/ μ l

Tabla 3.5. Condiciones del termociclador para la qPCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Activación de la enzima	98°C	30 s	1
Desnaturalización	98°C	5 s	40
<i>Anneling</i> /Extensión	60°C	5 s	40
Curva de <i>melting</i>	64 a 95°C (0.5 °C cada paso)	5 s cada paso	1

3.7 Técnicas de manipulación del ADN y transferencia de plásmidos

3.7.1 Determinación de la concentración de ADN

Una vez extraído el ADN, se midió espectrofotométricamente concentración y su pureza mediante la relación de las mediadas de absorbancia a 280/260 y 230/260, utilizando un equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

3.7.2 Digestión del ADN

Las digestiones del ADN se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima de restricción, tal y como venían especificadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 1 µg de ADN, en 1 x de tampón de restricción, 1-2 unidades de enzima, en volúmenes finales de 50 µl completados con H₂O miliQ estéril. Las digestiones de ADN se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 a 4 h a 37°C.

3.7.3 Desfosforilación de ADN con fosfatasa alcalina

Con objeto de aumentar la eficiencia de la clonación y evitar la recircularización de los vectores utilizados, se desfosforilaron los extremos por el tratamiento con fosfatasa alcalina de la mucosa intestinal bovina (Sigma), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

3.7.4 Electroforesis del ADN y ARN en geles de agarosa

Mediante esta técnica, se analizó la migración diferencial de moléculas de ADN en función del tamaño, al ser sometidas a un campo eléctrico a través de una matriz de agarosa. La concentración del gel de agarosa usada fue de 0.5 a 2%, en tampón TAE 1x. Dicha solución se calentó en microondas hasta su fusión, después dejándolo enfriar hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 50°C, a la cual se le añadió 5 µl de SYBR safe (1.000 x) (Thermo). Como marcadores de peso molecular se utilizaron el HyperLadder I (Bioline) o 50-1.000 pb ADN Ladder (Canvax). Las muestras se separaron electroforéticamente a 100 V durante aproximadamente 60 min, en un sistema electroforético MAXI-VG (VWR) acoplado a una fuente de alimentación Power Pac HV (Bio-Rad). El resultado se visualizó mediante un equipo fotodocumentador de Geles ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

3.7.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y kit de purificación de productos de PCR

Tras la realización de la PCR y previo a la ligación de los productos de PCR, se purificaron las muestras con el *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen).

En aquellos casos en que se amplificaron más de una banda se procedió a la purificación del ADN a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (USBiological) con el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Una vez realizada la electroforesis, se recortó la banda de interés y se extrajo el ADN contenido en ella siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

En ambos casos, una vez extraído el ADN, se midió su pureza y concentración como se ha descrito en el apartado 3.7.1 de este capítulo.

3.7.6 Reacción de Ligación con la T4 ADN ligasa

Los fragmentos generados tras la reacción de PCR, se ligaron al vector deseado utilizando una relación molar 1:1 a 1:20 (vector-inserto). Las reacciones contenían habitualmente 50 ng de ADN, 1x de tampón de ligación suministrado por la casa comercial, 1 unidad de enzima (Promega) y la cantidad de productos de PCR deseada en volúmenes finales de 10 μ l completados con H₂O miliQ estéril. Para una mayor eficiencia, las ligaciones se llevaron a cabo incubando las mezclas de las reacciones toda la noche a 4°C.

3.7.7 Estrategia Ek/LIC

El **método Ek/LIC** es un sistema de clonación muy eficiente el cual permite la inserción de un gen de interés sin la necesidad de utilizar enzimas de restricción. Dicho método utiliza la actividad de exonucleasa 3'→ 5' de la ADN polimerasa T4, para crear extremos libres monocatenarios de 13 o 14 bases muy específicos en el vector Ek/LIC (Novagen). Los productos de PCR con los extremos libres complementarios se crearon al construir extensiones 5' LIC con los cebadores (**Figura 3.6**). El producto de PCR purificado con los extremos LIC se trató con la ADN polimerasa T4 en presencia de ATPd para generar los extremos específicos compatibles con el vector. La clonación es muy eficiente debido a que solo se debe formar el producto deseado durante el proceso de ligación.

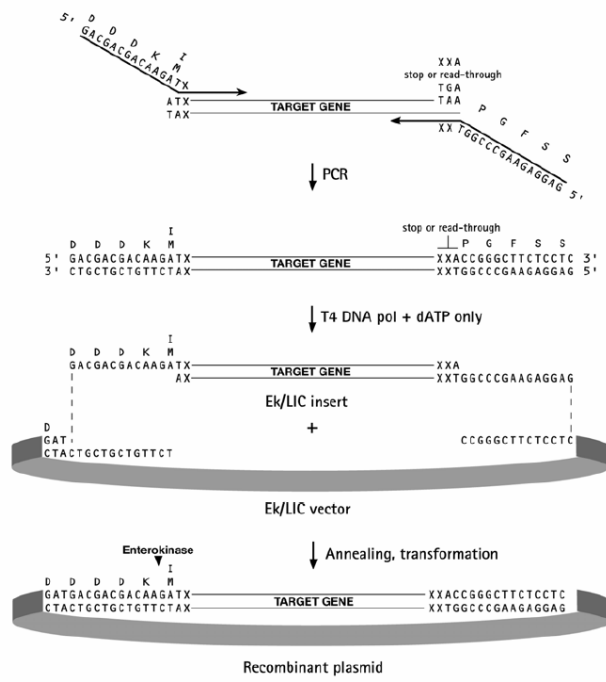


Figura 3.6. Diagrama de la estrategia de clonación Ek/LIC. Después de la amplificación con cebadores que poseen las extensiones 5' LIC indicadas, el inserto de PCR se trató con la ADN polimerasa T4 LIC (+ ATPd), ligándose al vector Ek/LIC.

Para generar los extremos cohesivos en el inserto diana compatibles con el vector pET-41c Ek/LIC se realizó la reacción que se observa en la **Tabla 3.6**.

Las muestras se incubaron durante 30 min a 22°C para permitir la reacción y posteriormente, para la inactivación de la enzima, se incubaron a 75°C durante 20 min.

Tabla 3.6. Componentes y cantidades necesarias para el tratamiento del inserto diana con la T4 ADN Polimerasa.

Componentes	Muestra	Control negativo	Control positivo
0.2 pmol de inserto purificado	1-14.6 µl	--	--
10X Tampón T4 ADN polimerasa	2 µl	2 µl	2 µl
100 ng/µl Ek / LIC GUS	--	--	2.4 µl
25 mM ATPd	2 µl	2 µl	2 µl
100 mM DTT	1 µl	1 µl	1 µl
100 mM de TDT	1 µl	1 µl	1 µl
2.5 U/µl T4 ADN Polimerasa	0.4 µl	0.4 µl	0.4 µl
H ₂ O libre de nucleasa	hasta completar 20 µl	hasta completar 20 µl	hasta completar 20 µl

3.7.8 Reacción de recombinación mediante la LR Clonasa

Otro método de clonación utilizado fue el sistema GATEWAY (Invitrogen). Este sistema llamado Gateway LR Clonasa II utiliza una mezcla de enzimas tanto del bacteriófago lambda (Integrasas (Int) y Excisionasas (Xis)) como una proteína codificada por *E. coli* (*Integration Host Factor* (IHF)). Dichas enzimas catalizan la recombinación *in vitro* entre un plásmido de entrada (que contiene el gen de interés flanqueado por sitios attL) y un vector de destino (que contiene sitios attR) para generar un vector de expresión (attL + attR = attB).

Tras obtener el plásmido de entrada que contiene el gen de interés (*phb1* + pENTR 3C y *phb2* + pENTR 3C) se realizó una reacción de recombinación

LR entre el plásmido de entrada y el vector de destino pTREX TAPtag-GW **Figura 3.7.** La reacción se realizó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml a temperatura ambiente, donde se añadieron los componentes que se observan en la **Tabla 3.7.**

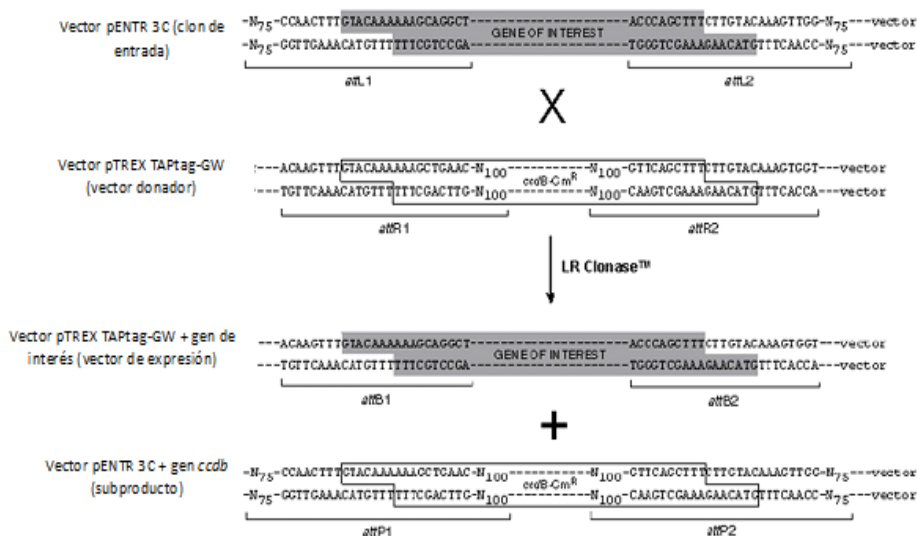


Figura 3.7. Estrategia de clonación de la LR Clonasa.

Tabla 3.7. Reactivos necesarios para la reacción de la recombinación con la LR Clonasa.

Componentes	Muestra	Control negativo	Control positivo
300 ng/ reacción del plásmido de entrada	1-10 µl	--	--
300 ng/ reacción Vector donador	2 µl	2 µl	2 µl
50 ng/µl pENTR-gus	--	--	2 µl
5X LR Clonasa	4 µl	4 µl	4 µl
Tampón TE, pH 8	hasta completar 16 µl	hasta completar 16 µl	hasta completar 16 µl

Las reacciones se incubaron toda la noche a 25°C. Seguidamente se agregó 2 µl de la solución de proteinasa K, que se incubó durante 10 min a 37°C y

posteriormente se transformaron células competentes de la cepa DH5 de *E. coli* con los resultados de la recombinación.

3.7.9 Transformación bacteriana mediante choque térmico

Con objeto de introducir los plásmidos deseados en *E. coli* se utilizó el método de transformación bacteriana por choque térmico. Para la preparación de las células competentes 5 ml de medio LB líquido se inocularon con una colonia de la bacteria deseada y se incubaron a 37°C durante toda la noche en agitación a 240 rpm. A la mañana siguiente, se agregaron 4 ml del precultivo a 100 ml de Medio LB y se incubó durante 1 a 2 h a 37°C en agitación, hasta alcanzar una densidad de bacterias por ml correspondiente a una D.O₆₀₀ entre 0.4 a 0.6. Una vez alcanzada dicha densidad, el cultivo bacteriano se mantuvo durante 5 min en hielo, tras lo que se centrifugó a 4.000 x g durante 10 min a 4°C. El botón de bacterias resultante se resuspendió en 15 ml de la solución TFB1, el cual se incubó en hielo nuevamente durante 15 min. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 4.000 x g durante 10 min a 4°C. El nuevo botón se resuspendió en 2 ml de solución TFB2 frío y se distribuyeron las bacterias competentes en alícuotas de 100 µl, congelándolas rápidamente a -80°C.

Tras la obtención de las bacterias competentes, una alícuota de 100 µl de células competentes de *E. coli* se transformaron con 1 a 5 µl de la reacción de ligación. Tras un período de 30 min en hielo, las células se incubaron durante 90 s en baño María a 42°C, a fin de realizar un choque térmico. Tras ello, las bacterias fueron incubadas rápidamente durante 2 min en hielo, a fin de permitir la oclusión de los poros formados. A continuación se añadieron 900 µl de medio SOC (Novagen) incubándose a 37°C en agitación a 240 rpm durante 60 min. Para finalizar, se sembraron 100 µl de la suspensión bacteriana sobre placas de LB agar, conteniendo el antibiótico de selección y en el caso que el vector contuviese el gen β -Galactosidasa se les añadió

0.5mM de IPTG para inducir el gen, junto a X-gal (100 µg/ml) como sustrato de la enzima. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

3.7.10 Rastreo de clones

La presencia del gen de interés en los clones obtenidos tras la transformación se confirmó mediante la técnica de PCR de colonia. Para el rastreo, se realizaron resiembras de colonias al azar en placas LB Agar con su antibiótico de selección, que se incubaron toda la noche a 37°C.

Tras cultivar las bacterias toda la noche, las colonias fueron picadas con la ayuda de un palillo de dientes estéril, resuspendiéndolas en 25 µl de agua MiliQ estéril y posteriormente calentándolas durante 2 min a 98°C para lisar las paredes. Dicha suspensión fue centrifugada a 14.000 x g durante 2 min. Dos microlitros del sobrenadante obtenido, conteniendo los ácidos nucleicos de las bacterias, fueron incluidos en una reacción de PCR como ADN molde. Tras un análisis mediante electroforesis en geles de agarosa y la selección de los clones positivos, se realizó una extracción de ADNp (apartado 3.4.1) para confirmar mediante secuenciación la inserción del gen deseado.

3.8 Secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN se realizó en el servicio de secuenciación de ácidos nucleicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC). Las reacciones de secuenciación contenían habitualmente entre 400 a 800 ng de ADN plasmídico (o 20 a 80 ng para aquellos derivados de los productos de PCR) y 6.4 pmol de cebador. La secuenciación de ADN se realizó mediante el procedimiento de secuenciación cíclica utilizando la química BigDyeTerminator v3.1 y electroforesis en sistema multicapilar automático. Tras obtener la secuencia, se analizó el marco de lectura del gen

con el programa Finch TV y la base de datos TritypDB para corroborar que fuese como se había diseñado.

3.9 Técnicas para el estudio de proteínas

3.9.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (175). Para ello, se mezclaron 200 μ l del reactivo de Bradford (Sigma) con 10 μ l de la muestra diluida en PBS y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, comparándose con los resultados obtenidos tras la realización de una curva patrón con concentraciones entre 0 a 10 μ g de albúmina bovina (BSA) (Sigma). La reacción se midió por absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Milton RoyTM (Spectronic 3000).

3.9.2 Preparación de las muestras de proteínas para electroforesis

Las muestras proteicas se diluyeron 1:1 con tampón de carga o tampón de la muestra (la composición de todos los medios y soluciones se encuentran detallados en el apartado 3.21 de este capítulo) preparado al 2x y se calentaron durante 5 a 10 min a 98°C a fin de romper la estructura cuaternaria de las proteínas, neutralizar las cargas eléctricas mediante el dodecil sulfato sódico (SDS) y romper los enlaces disulfuros con el β -mercaptoetanol, procediéndose posteriormente a su carga en el gel.

3.9.3 Electroforesis en SDS-PAGE

El análisis de proteínas se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de Dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (176), utilizando el equipo *Mini-protean system* (Bio-Rad). Se utilizaron geles

de poliacrilamida formados por una parte concentradora con un 6% de poliacrilamida polimerizada y otra separadora con un 12% de la poliacrilamida.

En cada pocillo se cargaron como máximo 15 μ l de la muestra con una cantidad de proteínas que osciló entre 20-50 μ g dependiendo del experimento. La electroforesis se realizó a 120 V, durante 90 min en el tampón de electroforesis. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron el *Precision Plus Protein All Blue* (Bio-Rad) y el *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo).

3.9.4 Western blot

Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 12% como se describe en el apartado 3.9.3, las mismas fueron transferidas a membranas de PVDF (*Trans-Blot Turbo Midi PVDF Transfer Packs*, Bio-Rad). La transferencia se realizó en el sistema de transferencia *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad) durante 40 min a 120 V. Como marcadores de peso molecular se usaron los mencionados en el apartado anterior. Ambos marcadores presentan proteínas coloreadas que ayudan a reconocer tanto los pesos moleculares como el éxito de la transferencia.

Una vez terminada la transferencia, la membrana de PVDF se dejó bloqueando con tampón de bloqueo toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con tampón de lavado de 10 min cada uno en agitación. Sobre la membrana se agregó el Ac primario a la dilución correspondiente, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Las PHBs se detectaron con los antisueros obtenidos en rata anti-PHB1 y anti-PHB2 a unas diluciones de 1/6.500 y 1/17.000 respectivamente. El antisuero obtenido en ratón se usó a una dilución 1/6.500. Las colas de histidina de las proteínas recombinantes se detectaron con el *Poly-histidine Tag* (6-His)

(MyBioSource) a una dilución 1/1.000; la proteína GST con el anticuerpo *GST-Tag Monoclonal Antibody* a una dilución 1/1.000 y el TAPtag con el *CBP Tag Antibody mAb Mouse* (GenScript) a una dilución 1/1.000. La detección de GAPDH se realizó con el anti-GAPDH producido en conejo (Sigma) a una dilución 1/5.000 y la tubulina con el *anti-Tubuline Sheep polyclonal* (Cytoskeleton) a una dilución 1/1.000.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios las membranas se lavaron 4 veces con buffer de lavado (composición detallada en el apartado 3.21) durante 10 min y se incubaron 2 h a temperatura ambiente y en agitación con los anticuerpos secundarios correspondientes marcados con HRP. Tras otros 4 lavados las membranas se revelaron con el sustrato de Revelado *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad). El resultado de los inmunoblots se visualizó en el equipo *ChemiDoc MP Imaging System* (Bio-Rad).

En caso de reutilizar la membrana para su incubación con otro anticuerpo diferente al previamente utilizado, la misma se lavó durante 10 min con PBST, y posteriormente se incubó con solución ácida durante 10 min, lavándose después 3 veces con PBST durante 10 min.

3.9.5 Tinción de los geles con azul de Coomassie

Tras la separación electroforética de las proteínas mediante SDS-PAGE se procedió a la visualización de las mismas mediante la tinción con azul de Coomassie. El colorante azul de Coomassie se une a las proteínas, principalmente a través de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), estabilizándose la forma aniónica del colorante produciendo el color azul. La tinción se realizó sumergiendo el gel en una solución de azul de Coomassie durante aproximadamente 40 min. Para desteñir el gel, se retiró la solución anterior y se sumergió en una solución de desteñido. El gel una vez desteñido, se conservó en agua destilada.

3.6.6 Tinción de los geles con nitrato de plata

En aquellos geles SDS-PAGE en los que la cantidad de proteína era menor se tiñeron con nitrato de plata (177). Esta tinción posee una alta reproductividad y es ~50 veces más sensible que la tinción con azul Coomassie. El desarrollo de la tinción se detalla en la **Tabla 3.8**.

Tabla 3.8. Pasos y componentes para la Tinción de Plata.

Pasos	Tipo de Solución	Composición	Tiempo
1	Fijadora	100 ml de etanol, 25 ml ácido acético glacial, completar hasta 250 ml de agua.	30 min
2	Sensibilizadora	75 ml etanol, 1.25 ml glutaraldehído (37%), 10 ml tiosulfato de sodio (0.5 g), 17 g acetato de sodio, completar hasta 250 ml de agua destilada.	30 min
3	De lavado	Agua destilada	2 x 1 min
4	De teñir	2.5% solución de nitrato de plata, 0.1 ml formaldehído (37%), completar hasta 250 ml de agua destilada.	20 min
5	De lavado	Agua destilada	2 x 1 min
6	Reveladora	6.25g carbonato de sodio 0.05 ml formaldehído (37%) completar hasta 250 ml de agua destilada.	2–10 min
7	De parada	3.65 g EDTA-Na ₂ H ₂ O completar hasta 250 ml de agua destilada.	10 min
8	De lavado	Agua destilada	3 x 5 min

9	Preservadora	75 ml etanol 11.5 ml glicerol puro completar hasta 250 ml de agua destilada.	Para almacenar
---	--------------	---	-------------------

3.9.7 Diálisis

Esta técnica se llevó a cabo en aquellos casos donde fue necesario cambiar el tampón donde se encontraban las proteínas o para eliminar las sales acompañantes. Para ello se utilizaron membranas de acetato de celulosa *Dialysis tubing Cellulose Membrane Size 33 mm x 21 mm* (Sigma) con un tamaño de exclusión de 10 kDa. Las membranas fueron activadas mediante dos hervidos en una solución al 0.0016% EDTA durante 15 min y lavadas con agua bidestilada con el objeto de arrastrar el exceso de quelante. Las muestras proteicas fueron introducidas en las membranas y una vez selladas se sumergieron en una solución de 0.1 M de acetato de amonio en agitación, manteniéndose a 4°C durante 24 h. La solución se cambió cada 5 h. Pasado el periodo de diálisis la muestra se retiró de la membrana, se alicuotó y congeló a -80°C para su posterior liofilización durante 24 h en un equipo Liofilizador Cryodos (Telstar).

3.10 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

3.10.1 Expresión de las prohibitinas 1 y 2 de *T. cruzi* en *E. coli*

Una vez comprobado que los clones seleccionados contenían los genes con los marcos de lectura abierto correctos, se indujo la expresión de los mismos y se analizó la producción de proteína durante un periodo de 12 h. Para ello, se recogieron muestras de 1 ml de un cultivo bacteriano cada 2 h, se centrifugaron durante 2 min a 14.000 x g y los botones se congelaron a -20°C. Posteriormente las muestras se separaron mediante electroforesis en geles de

SDS-PAGE a fin de determinar el tiempo óptimo de expresión de las proteínas de estudio. Determinando dicho tiempo, se procedió a la preparación de un gran volumen de cultivo para la obtención de la proteína.

Los cultivos se prepararon en 100 ml de LB líquido conteniendo el antibiótico de selección y 4 ml de precultivo, incubándolos a 37°C y 240 rpm hasta obtener la densidad óptica (D.O.) entre 0.5 a 0.7. Alcanzada dicha densidad, se dividieron los cultivos en dos, a unos de ellos se le añadió 1 mM de IPTG como inductor de expresión, mientras que al otro no. Los cultivos se incubaron durante 4 h bajo las condiciones mencionadas previamente. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos a 4.500 x g durante 20 min, se descartaron los sobrenadantes, almacenándose los botones a -20°C.

Los botones así obtenidos se resuspendieron en solución de acoplamiento nativo (S1) (cada gramo de botón en 7.5ml). Para la lisis bacteriana se añadieron 0.2 mg/ml de lisozima (Sigma) dejándose incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 10 µg/ml de ARNasa, 40 µg/ml ADNasa, y 2 mM MgCl₂ junto con inhibidores de proteasas *Protease Inhibitor cocktail EDTA free* (Roche) a la concentración recomendada por el fabricante. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Tras la incubación, se sonicaron las muestras en ciclos de 10 s durante 2 min en hielo y se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo las fracciones de las proteínas solubles se congeló a -20°C.

Los botones que quedaron tras la solubilización con la solución S1 se volvieron a resuspender con 7.5 ml de la solución de acoplamiento desnaturizante (S2), a los cuales se les añadió β-mercaptoetanol a una concentración final de 1 mM, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Tras ello se separaron los sobrenadantes por centrifugación durante 20 min a 10.000 x g a 4°C. Las fracciones obtenidas con las soluciones S1 y

S2 se prepararon como se describió en el apartado 3.9.2 y se separaron en un gel de poliacrilamida para su posterior tinción con azul de Coomassie.

3.10.2 Aislamiento y purificación de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión son agregados de proteínas insolubles, formando cristales o precipitados amorfos e insolubles que frecuentemente se producen durante la expresión de proteínas recombinantes. Para su purificación, se descongelaron los botones bacterianos obtenidos como se describió en el apartado 3.10.1, se resuspendieron en tampón de lisis (7.5 ml de tampón por gramo de bacterias centrifugadas), se añadió 0.35 mg/ml de lisozima y se incubaron durante 30 min a 20°C. Posteriormente se agregó 10 µg/ml ARNasa, 5 µg/ml ADNasa y 6 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas, se incubaron durante 20 min y posteriormente se le añadió una solución de tritón X-100 a una concentración final del 5%, se sonicaron en hielo durante 2 min en ciclos de 10 s. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12.000 x g durante 20 min a 4°C y los botones fueron resuspendidos en solución de lisis con una concentración final del 2% de tritón X-100. Repitiendo nuevamente los pasos de sonicación y centrifugación, añadiéndose nuevamente solución de lisis a las concentraciones finales de 1 y 0.5% de tritón X-100. Tras realizar 3 lavados con PBS, se preservó el botón congelándolo a -20°C hasta su utilización.

3.10.3 Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad separa las proteínas sobre la base de una interacción reversible entre la proteína y un ligando específico acoplado a una matriz de cromatografía. Esta técnica ofrece una selectividad y alta capacidad para obtener la proteína de interés. En el caso de las proteínas

recombinantes se utilizó una columna de cromatografía por afinidad HiTrap (GE Healthcare), la cual tiene la capacidad de unir hasta 40 mg de proteínas fusionadas a una cola de histidina. Dicho *tag* se une a iones del cual se encuentra a su vez unido a la sefarsa la columna.

Previa a la cromatografía la columna se equilibró con 25 ml de solución de acoplamiento nativo. Las muestras se añadieron a las columnas, para posteriormente lavarlas con una solución de acoplamiento desnaturizante conteniendo concentraciones crecientes de imidazol (de 10 mM hasta 100 mM) para por último eluir las proteínas recombinantes retenidas en la columna con 10 ml de solución de elución desnaturizante con 500 mM de imidazol (sustancia análoga a la histidina). Tras la cromatografía, la columna fue equilibrada con 25 ml de solución de acoplamiento nativo y se conservaron en etanol al 20% a 4°C, hasta su nuevo uso.

3.10.4 Purificación de proteínas recombinantes a través de geles de SDS-PAGE

Con objeto de purificar las proteínas recombinantes y separarlas de componentes no deseados (proteínas propias de la bacteria, LPS entre otros) se procedió a purificar las proteínas recombinantes mediante electroforesis en SDS-PAGE, a fin de poder utilizarlas posteriormente para la inmunización de animales y la obtención de anticuerpos específicos frente a ellas. Para ello y a fin de cargar la máxima cantidad posible de muestra se usó un peine formador del gel de almacenamiento que poseía únicamente dos moldes de pocillos, uno que formaría un primer carril para añadir el marcador de peso molecular y otro continuo para las muestras conteniendo las proteínas recombinantes solubilizadas tras la purificación de cuerpos de inclusión. Después de llevar a cabo la electroforesis, con un bisturí se recortó en vertical el marcador de peso molecular junto con una pequeña parte de la muestra de proteína, fragmento que se tiñó con azul de Coomassie tal y como se mencionó en el apartado

3.9.5. El resto del gel se colocó en una placa de Petri con H₂O miliQ para evitar la desecación. Tras alinear la parte teñida y no teñida del gel, y tomando como patrón la parte del gel teñido se cortó horizontalmente, justo por encima y debajo de la región que contienen la proteína de interés del gel no teñido. Dicha banda fue triturada con escalpelo en pequeñas piezas que se colocaron en un tubo Eppendorf de 2 ml con aproximadamente 0.5 ml de tampón de elución. Los tubos conteniendo los fragmentos con la proteína recombinante, se incubaron en agitación (240 rpm) a 30 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de elución y difusión la muestra se centrifugó a 10.000 × g durante 10 min guardando el sobrenadante a -20°C. Una alícuota de dicho sobrenadante se analizó mediante SDS-PAGE para corroborar la presencia y pureza de la proteína deseada.

3.11 Obtención de anticuerpos policlonales

Una vez purificada las proteínas de estudios y medida su concentración mediante el método de Bradford descrito en el apartado 3.9.1, se procedió a la obtención de anticuerpos policlonales. Para ello, se inmunizaron 2 ratas Wistars macho de cuatro semanas de edad con cada proteína recombinante por separado y también se inmunizaron 2 ratones BALB/c macho de cuatro a cinco semanas de edad con la PHB2 recombinante. La concentración de antígeno a inmunizar dependió del tamaño del animal a inmunizar, por ello los ratones se inmunizaron con 10 µg de proteína recombinante y las ratas con 20 µg de las proteínas de estudio. La administración de cada antígeno se realizó por vía intraperitoneal usando una solución compuesta por el antígeno diluido en PBS junto al adyuvante de Freund's (Sigma) en una proporción 1:1. En la primera inoculación se utilizó el adyuvante de Freund's completo y en las inmunizaciones posteriores se utilizó adyuvante de Freund's incompleto. Se realizaron 5 inoculaciones con intervalos de 1 semana. Previo a la primera inoculación, se realizó una extracción de sangre por punción en la vena submandibular para la obtención de suero pre-inmune que se utilizó como

control de la inmunización y como suero negativo en los diferentes experimentos a realizar. La sensibilidad y especificidad final de los anticuerpos se evaluaron mediante ensayos de Western blot (apartado 4.9.4) y ELISA, este último se describirá en el siguiente apartado.

3.12 Determinación de la capacidad antigénica de las PHBs mediante la técnica ELISA

Tras la inmunización con las proteínas recombinantes PHB1 y PHB2 y con objeto de determinar la titulación de los anticuerpos producidos se utilizó la técnica ELISA. Además dicha técnica se utilizó para la determinación de la antigenicidad de las proteínas de estudio y su potencial utilización como antígenos en el diagnóstico de pacientes chagásicos. El tipo de ELISA usado en estos experimentos fue una **ELISA indirecta** donde el antígeno se absorbe directamente sobre la placa que es reconocido por un anticuerpo primario, dirigido frente al antígeno, y a su vez por un anticuerpo secundario, marcado enzimáticamente, dirigido frente al anticuerpo primario.

La ELISA se realizó en placas de 96 pocillos (Thermo). Las proteínas se diluyeron en tampón carbonato pH 9.2 a una concentración final de 5 µg/pocillo. La solución con la proteína fue absorbida sobre la placa durante toda la noche a 4°C en agitación, transcurrido el tiempo de absorción, fue retirado la solución antigénica lavándose la placa al menos 3 veces con 250 µl de tampón de lavado. Después se procedió al bloqueo de los lugares que no se ocuparon por la solución antigénica mediante la incubación con 250 µl del tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda y agitación orbicular. Posteriormente, se volvió a lavar 3 veces con tampón de lavado y se añadió 100 µl por pocillo del anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo, se incubó por 1 h a temperatura ambiente, tras lo que se sometió a nuevos lavados a fin de eliminar todo en anticuerpo primario no

ligado al antígeno. La determinación de los anticuerpos ligados al antígeno se realizó mediante la incubación con un anticuerpo secundario, dirigido frente al anticuerpo primario, marcado con el enzima HRP, siguiendo las diluciones recomendadas por la casa comercial. La nueva incubación se realizó durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Nuevamente los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se añadió 100 µl de la solución sustrato de la peroxidasa. A fin de llevar a cabo la reacción enzimática, la placa se incubó 15 min en oscuridad y se añadió 50 µl de una solución de parada a cada pocillo. Para finalizar, los valores de D.O. se registraron a 492 nm en un equipo espectrofotométrico multicanal Multiscan (Thermo Scientific).

3.13 Ensayos con hierro

3.13.1 Cromatografía de afinidad mediante matriz cromatográfica ligada a iones Fe³⁺

Las proteínas PHBs endógenas y recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad con columnas donde la matriz se encontraba ligada a iones Fe³⁺. Las columnas utilizadas fueron fabricadas en el laboratorio, debido a que no se encontró ninguna comercial disponible. Utilizando como base una columna *HiTrap Ni Sepharose 6 Fast Flow* (GE Healthcare) ligada con Ni²⁺ y en donde se sustituyó el Ni²⁺ por Fe³⁺, siguiendo el protocolo descrito por Zhou, W. et al. (2000) (178). Para ello, la matriz con el ion Ni²⁺ fue lavada inicialmente con tres volúmenes (volumen total de la columna) de acetonitrilo (MeCN), seguido de un lavado de 3 volúmenes de una solución con 100 mM EDTA en agua destilada con objeto de eliminar el Ni²⁺. Tras ello, la columna se lavó al menos 2 veces con 2 volúmenes de agua para la eliminación tanto del EDTA así como el Ni²⁺ ligado al quelante.

Una vez asegurada la eliminación tanto del metal quelado como del exceso de EDTA, la matriz fue lavada con una solución ácida. Tras ello se hizo interaccionar lentamente la matriz con un exceso de la solución de Fe^{3+} , manteniendo una velocidad de elución a través de la matriz de 0.5 ml/min con un tiempo aproximado de 30 min. El exceso de solución de FeCl_3 fue eliminado por sucesivos lavados con agua, para posteriormente volver a lavar al menos con 5 volúmenes de solución ácida para eluir los iones Fe^{3+} no ligados. Finalmente la columna fue equilibrada con tampón fosfato. Una vez construida la columna con Fe^{3+} , se procedió a cromatografiar a través de ella los extractos proteicos de las formas epimastigotas del parásito a fin de purificar aquellas proteínas con afinidad por este catión. Para ello se aplicó de forma continuada durante 5 h el lisado de las formas epimastigotas del parásito (cepa DM28c) en tampón de acoplamiento y conteniendo inhibidores de proteasas. Seguidamente la columna fue lavada con al menos 5 volúmenes de tampón de acoplamiento y se eluyó lentamente con tampón de elución.

Posteriormente, la columna se dejó toda la noche con el medio de elución antes de su regeneración, lavándose posteriormente con 0.5 M de NaCl para eliminar los restos de EDTA. Finalmente, la columna se almacenó con 20% de etanol. La reutilización de las columnas implicó volver a equilibrarlas y pasar nueva solución de hierro.

Las proteínas con capacidad de unión al Fe^{3+} eluidas de la columna se precipitaron con acetona y se prepararon para electroforesis tal y como se describió en el apartado 3.9.2 de este capítulo. Tras electroforesis en SDS-PAGE se procedió a la realización de Western blots con los anticuerpos anti-PHB1 y anti-PHB2 a fin de identificar si las PHBs de *T. cruzi* estuvieron entre ese conjunto de proteínas con afinidad por el Fe^{3+} .

3.13.2 Cultivos suplementados con citrato de amonio férrico

Epimastigotes de la cepa DM28c fueron cultivados a 28°C en medio LIT suplementado con 10% SBF. Una vez alcanzado la fase exponencial, se lavaron las células con PBS y se realizó el conteo en la cámara de Neubauer. Partiendo de 1×10^6 parásitos/ml se le añadió diversas concentraciones (0 a 500 μ M) de citrato de amonio férrico (FAC) (Sigma) durante 24 h (161). Los lisados celulares obtenidos tras el tratamiento se prepararon y procesaron para inmunotransferencia y detección mediante Western blot, empleando los anticuerpos obtenidos de las inmunizaciones con las proteínas recombinantes. Como control de carga en la determinación en el Western blot se utilizó la tubulina.

3.14 Microscopia confocal y electrónica de transmisión

La localización de las PHBs se realizó mediante microscopia laser confocal así como microscopia electrónica de transmisión en los diferentes estadios del parásito.

3.14.1 Microscopia confocal

Para la microscopia laser confocal se trabajó con parásitos en los estadios de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes derivados de cultivos celulares. Las diferentes formas de los parásitos fueron recolectados del medio de cultivo mediante centrifugación, lavados con PBS e incubados durante 30 min con 25 nM del marcador mitocondrial Mitotracker (Sigma) diluido en PBS. Los cultivos con epimastigotes se incubaron a 28°C mientras que los tripomastigotes y amastigotes a 37°C. Tras el marcaje mitocondrial las células se lavaron por centrifugación y resuspensión en PBS, determinándose su número en la cámara hemocitométrica de Neubauer. Las formas del parásito

así marcadas fueron depositados a razón de 6×10^4 sobre portaobjetos tratados previamente con Poly L-Lisina (0.1 mg/ml) (Sigma), a fin de favorecer la adherencia de los parásitos al vidrio.

Una vez adheridos los parásitos, las muestras fueron fijadas con una solución de 3.7% de paraformaldehído durante 20 min, tras lo cual fueron lavadas y permeabilizadas con una solución de Tritón X 100 al 0.1% durante 5 min. Tras someterlas a 3 lavados con PBS se sumergieron en tampón de bloqueo durante 1 h. Después de lavar las preparaciones con PBS fueron incubadas con el anticuerpo primario (anti-PHB1 rata 1/100; anti-PHB2 rata 1/250; anti-PHB2 ratón 1/100) en cámara húmeda durante 1h a temperatura ambiente. Tras ello fueron lavadas nuevamente cuatro veces en PBS a fin de eliminar los restos de anticuerpo primario e incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-rata 1/350 marcado con FITC (Sigma); anti-ratón marcado con FITC (Sigma)), a fin de reconocer los lugares de unión de los anticuerpos primarios. La incubación con los secundarios se realizó en iguales condiciones a las llevadas a cabo con los anticuerpos primarios previamente descritas. Finalmente las preparaciones fueron nuevamente lavadas con PBS y posteriormente con agua bidestilada a fin de eliminar las sales del PBS que pueden interferir en la observación. A las preparaciones se le añadió medio de montaje con DAPI (Vectashield), sellando los bordes del cubreobjetos con esmalte de uñas a fin de evitar la desecación.

En aquellos experimentos donde se estudió la interacción parásito-célula o la localización de las proteínas de estudio en las formas intracelulares, la infección de las células se llevó a cabo con las formas tripomastigotas a razón de 4:1 parásitos/célula, manteniéndose los parásitos por 4 h. Transcurrido el tiempo de infección, se eliminaron los parásitos que no habían penetrado en las células mediante lavados con MEM. Posteriormente se les agregó medio fresco y se incubó en condiciones normales de cultivo durante 72 h (179,180). Transcurrido el tiempo de cultivo, los portaobjetos conteniendo la monocapa

con células infectadas fueron lavados con PBS a fin de arrastrar los componentes del medio y las células que hubieran muerto, tras lo cual se fijaron y prepararon para microscopía como se ha descrito anteriormente.

Los campos de observación por microscopía fueron seleccionados al azar. En aquellas preparaciones donde se emplearon cultivos celulares infectados con los parásitos que sobreexpresaban a las PHBs se anotó el número total de células y de ellas, cuantas se encontraban infectadas y la cantidad de amastigotes intracelulares por célula, a fin de determinar tanto el porcentaje de infección como la carga parasitaria. El número de células analizadas fue de al menos 150 células por pocillo y para cada una de las réplicas de los experimentos. Las preparaciones fueron observadas en el microscopio confocal Leica DMI6000B del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

3.14.2 Microscopía electrónica de transmisión

A fin de comprobar la localización de las PHBs en los diferentes estadios de diferenciación, los parásitos fueron obtenidos y concentrados por centrifugación como se ha descrito anteriormente. Tras ser lavados con medio de cultivo sin SBF, fueron fijados en el fijador compuesto por 0.5% de glutaraldehído y 2% de paraformaldehído en tampón fosfato (PB), a pH 7.2 durante 2 h a 4°C. Tras lo cual fueron centrifugados y embebidos en la resina LR-White, los bloques fueron cortados y montados sobre rejillas de níquel de acuerdo con la metodología seguida por el CIC para inmunocitoquímica para microscopía de transmisión.

Una vez obtenidas las rejillas, los cortes fueron bloqueados mediante inmersión en una gota de una solución de gelatina de teleosteo al 1% en PBS durante 10 min y a temperatura ambiente, a fin de eliminar uniones inespecíficas de los anticuerpos a la muestra a estudiar. Tras esto se

transfirieron a una solución de glicina 0.02 M en PBS durante 10 min a temperatura ambiente, con objeto de bloquear los grupos aldehídos de las muestras que pudieran haber quedado libres tras el bloqueo. Posteriormente, las rejillas fueron nuevamente bloqueadas 3 veces en una solución de ovoalbúmina al 1% disuelta en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Tras dicho bloqueo, las rejillas fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo a las diluciones indicadas (anti-PHB1 rata 1/100; anti-PHB2 rata 1/250; anti-PHB2 ratón 1/100) incubándose durante 1 h a temperatura ambiente.

Tras la incubación con el anticuerpo las muestras fueron lavadas al menos 4 veces durante 5 min en PBS, para posteriormente incubarlas con los anticuerpos secundarios (anti-ratón 1/200 marcado con oro coloidal de 10 nm (Sigma) y/o anti-rata 1/50 marcado con oro coloidal de 18 nm (Sigma)) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación se lavaron 5 veces con PBS y posteriormente con 5 veces más con agua bidestilada a fin de eliminar las sales de la solución salina. Las preparaciones fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo de Reynolds (181).

Los parásitos que fueron transfectados con el plásmido PHB2 + pTRExCas9, se recogieron por centrifugación y tras lavarlos como se describió previamente, se fijaron durante 2 h a 4°C, incluyéndose posteriormente en una resina Epon.

Los cortes tratados tanto para inmunocitoquímica como para ultraestructura fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión SMT LIBRA 120 PLUS (Carl Zeiss).

3.14 Sobreexpresión de las proteínas PHB1 y PHB2 en *T. cruzi*

3.15.1 Clonación y transfección

Para realizar el clonaje de PHB1 y PHB2 se partió de ADNc de *T. cruzi* de la cepa DM28c, que se amplificó con los cebadores PHB1TAPtagF y PHB1TAPtagR (ver **Tabla 3.3** para las secuencias) en el caso del gen *phb1* y con los cebadores PHB2TAPtagF y PHB2TAPtagR en el caso del gen *phb2*. Tras confirmar por electroforesis de agarosa que la amplificación de los genes fue correcta, los productos de PCR se purificaron con el kit *Qiaquick PCR Purification Kit* y se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI (New England Biolabs) y *Xho*I (New England Biolabs) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.7.2 de este capítulo. Posteriormente, los fragmentos de ADN se volvieron a purificar con el *Qiaquick PCR Purification Kit* previo a su ligación en el vector de entrada pENTR 3C (digerido también con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I). Este vector confirió a los insertos los sitios attL1 aguas arriba del inserto y attL2 aguas abajo del inserto, como se describió en el apartado 3.8.8. Combinando el plásmido de entrada (inserto + vector pENTR 3C) con el vector donador (pTREX TAPtag-GW), que contiene los sitios attR1 y attR2 y el gen *ccdb*, se forman los sitios attB1 y attB2 que dará origen al plásmido de expresión.

El rastreo de los clones positivos se realizó utilizando los cebadores del inserto, tal y como se describió en el apartado 3.7.10. Tras la selección de 2 clones elegidos al azar se cultivaron en LB líquido (suplementado con ampicilina) toda la noche, para su posterior extracción y secuenciación de ADNp a fin de corroborar que contenían lo diseñado.

Tras obtener suficiente cantidad de ADNp, se procedió a la transfección del parásito con 20 µg de cada una de las construcciones conteniendo los genes *phb1* y *phb2*. Para ello se partió de un cultivo de epimastigotes en fase logarítmica de crecimiento y tras realizar una serie de lavados (con PBS) mediante centrifugación y conocer el número de flagelados por mililitro, se resuspendieron a razón de $3 \cdot 10^7$ células/ml en 350 µl tampón hipoosmolar (Eppendorf). Los parásitos resuspendidos fueron introducidos en cubetas de electroporación (Eppendorf) de 2 mm, a las cuales se les añadieron 20 µg de ADN plasmídico (pTREX TAPtag-GW + *phb1*, pTREX TAPtag-GW + *phb2*). Para la transfección se utilizó un equipo Eppendorf multiporator 4308 y con unas condiciones de 100 µs, 500 V y 2p (pulsos). Como control se realizó una electroporación con el plásmido vacío. Los flagelados se colocaron en frascos de 25 cm² (Nunc) tras la electroporación, se les añadió 5 ml de medio de cultivo LIT suplementado con 10% SBF inactivado. Tras 24 h de incubación a 28°C se añadió el antibiótico de selección G418 (Sigma) a una concentración de 200 µg/ml. El medio de cultivo de los parásitos fue sustituido por medio fresco con el antibiótico cada semana hasta conseguir poblaciones con crecimiento estable (~6 semanas).

Una vez obtenidas las poblaciones estables de las líneas de epimastigotas transfectadas, se llevó a cabo el proceso de clonación de los flagelados, siguiéndose el sistema de dilución límite. Para ello, se determinó el número de flagelados por mililitro de una suspensión de parásitos y se ajustó el volumen del medio, para que al menos de forma teórica, hubiese 1 flagelado en 10 µl de medio. La suspensión de epimastigotes fue sometida a agitación vorticial y desde ella se fueron tomando volúmenes de 10 µl, los cuales se en cada uno de los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) de fondo plano. Tras dejarse reposar 2 h se seleccionaron bajo el microscopio aquellos pocillos en los que solo se observó un parásito. A ellos, a se les añadió el mismo volumen de medio LIT modificado (compuesto por 50% de medio que han soportado previamente el crecimiento de los parásitos y 50% de medio

fresco). Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 28°C. Cuando fue necesario se agregó periódicamente medio de cultivo hasta generar una población de epimastigotes a partir de una única célula (~12 semanas).

La sobreexpresión de las PHBs se corroboró mediante Western blots, utilizando como anticuerpo primario el anti-CBP (Abcam) que reconoce al TAPtag y los anticuerpos anti-PHB1 y anti-PHB2 tal y como se describe en el apartado 3.9.4.

3.15.2 Purificación de las PHBs mediante cromatografía de afinidad en tándem

A fin de determinar si las proteínas de estudio se unen a otras proteínas, se utilizó el método TAPtag (del inglés *Tandem Affinity Purification Tag*). Dicho método fue desarrollado para permitir la purificación de complejos proteicos en condiciones nativas con un alto grado de pureza. Consiste en fusionar el TAPtag a una proteína deseada, expresar dicha construcción en el organismo transfectado y purificar la proteína de interés desde lisados celulares del organismo, obteniendo la proteína de fusión unida a otras proteínas con las cuales interacciona. La purificación se lleva a cabo mediante dos cromatografías de afinidad sucesivas con las que se obtiene el producto de fusión con un elevado nivel de pureza (**Figura 3.8**).

El TAPtag posee dominios comunes a la proteína A de *Staphylococcus aureus*, el dominio de unión al Fc de las Inmunoglobulinas G (IgG) y un péptido de unión a calmodulina (CBP), separados ambos por un sitio de corte para la proteasa TEV del Virus del mosaico del Tabaco (182). Esta estrategia, diseñada originalmente para ser utilizada en levaduras, se adaptó a *T. cruzi* mediante la construcción del vector pTREX-GW TAPtag (171).

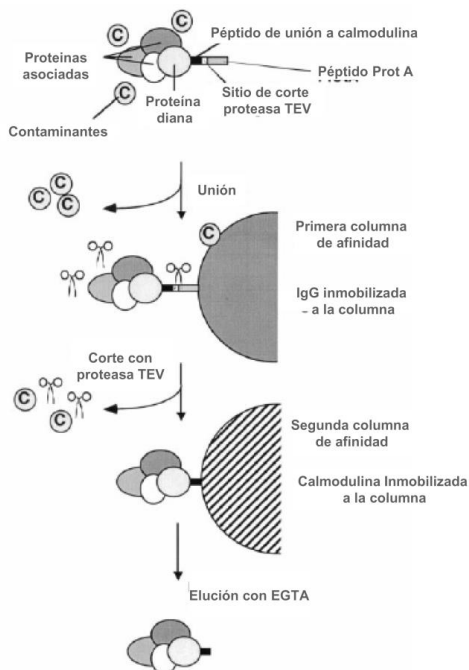


Figura 3.8. Esquema de la purificación mediante el método TAPtag. El complejo formado alrededor de la proteína diana se une a la columna de IgG mediante la cola de proteína A del TAPtag. Después de lavar, el complejo es liberado mediante digestión con la proteasa TEV en condiciones nativas. El eluido de esta primera cromatografía de afinidad es incubado con sefarosa unida a calmodulina, que tras varios lavados se eluye con EGTA, liberando el complejo proteico de interés.

Tras la transfección con el vector pTREX-GW TAPtag y comprobación de la expresión de las PHBs en epimastigotes de *T. cruzi* como se ha descrito anteriormente, se prepararon extractos proteicos totales a partir de las formas epimastigotas en fase exponencial. Las formas obtenidas de dicho cultivo fueron centrifugadas durante 20 min a 3.000 x g a 4°C, lavándose el botón 2 veces con PBS con objeto de arrastrar los restos del medio y resuspenderlos en tampón de lisis. La suspensión de flagelados se mantuvo 1 h en hielo en solución de lisis, sometiéndola posteriormente a tres ciclos de congelación (-80°C) y descongelación lenta a 0°C. El lisado resultante fue centrifugado a 10.000 x g recuperándose así el sobrenadante con las proteínas solubles, el

cual se llevó a un volumen final de 12 ml con el buffer de lisis con 17% de glicerol.

A cada uno de los extractos se agregaron 400 µl de una matriz de sefarosa ligada covalentemente a IgG humanas (Sigma), previamente lavada con el tampón IPP150. La matriz, una vez preparada y lavada según las especificaciones del fabricante, se incubó durante 2 h a 4°C con el extracto total procedente de los epimastigotes. Transcurrida la incubación, se dejó precipitar la sefarosa, lavándose con 30 ml del tampón IPP150 que posteriormente se trató con 10 ml del buffer de corte conteniendo 100 U de proteasa del virus TEV (Invitrogen). La proteasa se dejó actuar durante 2 h a 16°C en agitación para proceder a la elución del complejo.

Al eluido anterior (~1 ml) se le agregaron tres volúmenes de buffer de acoplamiento a calmodulina y 3 µl de CaCl₂ 1 M por ml de eluido, a fin de quelar el EDTA proveniente del buffer de corte TEV. Una vez eliminado el quelante, se le añadió sefarosa ligada a calmodulina (Sigma) (lavada previamente con buffer IPP150 de unión a Calmodulina), manteniéndose en agitación durante 1 h a 4°C. Tras ello, la fase móvil se eliminó, se lavó con 30 ml de buffer IPP150 de acoplamiento a calmodulina, y se recogieron 5 fracciones de 200 µl con buffer IPP150 de elución de calmodulina.

A fin de recuperar las proteínas separadas por la doble cromatografía, las eluciones resultantes de la segunda cromatografía se precipitaron con acetona durante 12 h a 4°C. Las proteínas precipitadas se diluyeron en el tampón de la muestra para electroforesis SDS-PAGE, llevándose a cabo en geles al 12% para su posterior tinción con plata y detección mediante Western blots utilizando como anticuerpos primarios anti-PHB1 y anti-PHB2.

3.16 Disrupción genética por CRISPR/cas9

Para llevar a cabo la disrupción de los genes *phb1* y *phb2* mediante la tecnología CRISPR/Cas9 se diseñaron dos ARNg diferentes utilizando la herramienta bioinformática “Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool” (183). Las secuencias llamadas protoespaciadores contienen entre 19-22 nucleótidos, son complementarias al gen diana y en ellas se encuentra la secuencia motivo adyacente al protoespaciador (PAM), la cual contiene la secuencia NGG requerida para el reconocimiento y digestión con la enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Posteriormente al diseño de los ARNg y siguiendo el protocolo de Lander, N. et al (184), se amplificaron dos ARNg diferentes para cada gen de estudio utilizando como ADN molde el plásmido pUC19sgRNA. Este plásmido contiene la secuencia común de los ARNg, lo que permitió ser utilizado como molde para la amplificación de cualquier ARNg usando un cebador específico que contenía la secuencia del protoespaciador. Los dos ARNg para el gen *phb1* se amplificaron con los cebadores directos específicos 1sgPHB1 y 2sgPHB1 y para el reverso se utilizó el cebador común PUCcrisperR (para las secuencias de todos los cebadores ver **Tabla 3.3**), el cual permitió la amplificación del complejo ribonucleico común en todos los guías. Ambos cebadores presentaron un sitio de restricción *Bam*HI en su extremo 5'. Asimismo, para el gen *phb2* se utilizaron los cebadores directos específicos 1sgPHB2 y 2sgPHB2 y el cebador reverso común PUCcrisperR. Tras la amplificación el ADN se purificó desde gel de agarosa con el *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), y se digirieron los distintos ARNg y el plásmido pTREX/cas9 (**Figura 3.5**) con la enzima de restricción *Bam*HI como se describió en el apartado 3.7.2.

Tras la digestión, el plásmido fue tratado con la fosfatasa alcalina como se describió en el apartado 3.7.3 a fin de eliminar de los extremos los grupos fosfato y se ligó a cada ARNg con la enzima T4 ADN ligasa en una proporción 20:1 (inserto: vector), como se describió en el apartado 3.7.6. Con

el producto de esta ligación se transformaron células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* y tras el rastreo de los clones, se realizó una extracción de ADNp de los clones positivos seleccionados para su posterior secuenciación y comprobación de las secuencias.

Tras la obtención de los distintos ARNg, se diseñaron y construyeron segmentos lineales con los cebadores que contenía las regiones 5' y 3' UTR del gen *phb1* (PHB1Bsd5`UTRF, PHB1BsdEcoRI5`R, PHB1Bsd3`BamHIF y PHB1Bsd3`UTRR) y del gen *phb2* (PHB2Bsd5`UTRF, PHB2BsdEcoRI5`R, PHB2Bsd3`BamHIF y PHB2Bsd3`UTRR). En medio del constructo se encontró el gen de resistencia a la blasticidina, para una doble selección de los parásitos transfectados, dado que el vector pTREX/cas9 ya les ofrece a los parásitos resistencia a neomicina.

La transfección de los epimastigotes de la cepa DM28c se realizó como se describió previamente en el apartado 3.15.1 de Materiales y Métodos. Transcurridas 24 h post-transfección, se le añadieron los antibióticos de selección (200 μ g/ml de y 20 μ g/ml de blasticidina). Cada semana se realizó una resiembra de todos los cultivos transfectados, añadiéndolos medio fresco con sus correspondientes antibióticos de selección hasta la obtención de poblaciones estables de epimastigotes.

3.17 Ensayos de cuantificación del estrés oxidativo mediante citometría de flujo

Los estudios de estrés oxidativo se realizaron el marcador DCFDA. Después de la difusión en la célula, el DCFDA/H₂DCFDA se desacetila por las esterasas celulares a un compuesto no fluorescente, que posteriormente se oxida por acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) dando el compuesto 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), el cual es detectado por

fluorescencia, pudiendo determinarse su intensidad mediante citometría de flujo.

Para realizar estos estudios en primer lugar se determinaron las condiciones óptimas para hacer el ensayo. Para ello se estudió la viabilidad de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* con 1.10^5 , 5.10^5 , 1.10^6 , 5.10^6 y 1.10^7 parásitos, tras el tratamiento con distintas concentraciones de H_2O_2 (de 0 a 800 μ M). Tras añadir el H_2O_2 a distinta concentración a los parásitos e incubarlos durante 50 min, se añadió la sonda DCF que se incubó durante 40 min. Posteriormente los parásitos se centrifugaron, se lavaron 3 veces con PBS y el botón conteniendo los epimastigotes marcados se resuspendió en 100 μ l de PBS. Justo antes de obtener las mediciones en el citómetro de flujo (equipo FACScalibur de Becton Dickinson) se le añadió yoduro de propidio (IP) para evaluar la viabilidad de los protozoos. La intensidad de fluorescencia media (MIF) se determinó en los clones de los protozoos capaces de sobreexpresar las PHBs y en el clon con la expresión de la PHB1 disminuida. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad comparando las diferentes líneas celulares utilizando la prueba LSD Fisher, $p < 0.05$.

3.18 Ensayos de protección del ADN frente al daño inducido por H_2O_2

El papel protector de las prohebitinas frente al daño oxidativo fue ensayado mediante un ensayo de la acción de las ROS sobre el ADN superenrollado, diseñado para determinar si estas proteínas disminuían el daño del ADN en un medio oxidativo en presencia de iones Fe^{3+} .

Para ello, a un volumen final de 25 μ l de reacción, se añadieron 10 nM de ADN superenrollado del plásmido pUC19, 50 μ M $FeCl_3$, junto a 10 mM H_2O_2 y las proteínas (PHB1, PHB2 y albumina bovina (BSA), como control

negativo). Las proteínas (PHBs y BSA) se ensayaron a concentraciones de 500, 250 y 125 $\mu\text{g/ml}$. Al ADN disuelto en 10 mM de Tris y 100 mM KCl, pH 7.4 se le añadieron las proteínas y la mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Tras lo que se añadió 50 μM de FeCl_3 , incubándose la mezcla durante 15 min. Posteriormente se agregó 10 mM H_2O_2 , incubándose nuevamente durante 1 h a 37 °C. Posteriormente las muestras de ADN se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Las PHB1 y PHB2 de *L. major* proporcionadas por Teresa Cruz Bustos de nuestro grupo de investigación, se realizó un ensayo similar, pero en el cual en vez de H_2O_2 se utilizó DTT como donador de electrones (161).

3.19 Bases de datos y herramientas bioinformáticas utilizadas.

3.19.1 NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*).

Base de datos general creada por la biblioteca nacional de Medicina del gobierno de Estados Unidos, en la que se incluyen numerosos recursos sobre biomedicina y biotecnología. Dicha base de datos se utilizó tanto para búsquedas bibliográficas, como para el análisis de genes y proteínas. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.19.2 TriTrypDB

Base de datos que integra genómica y genómica funcional de patógenos de la familia Trypanosomatidae. Esta base de datos es una colaboración entre EuPathDB, GeneDB y el Seattle Biomedical Research Institute (SBRI). Disponible en <http://TriTrypDB.org>.

3.18.3 EuPaGDT

EuPaGDT (183) se utilizó como herramienta para diseñar el ARN guía para el sistema CRISPR.

3.19.4 Servidor de herramientas proteómicas ExPASy (*Expert Protein Analysis System*).

Servidor ExPASy del Instituto Suizo de Bioinformática en el cual se engloba un software para el análisis de secuencias de aminoácidos y estructura de proteínas. Disponible en <https://www.expasy.org/proteomics>.

Dentro este servidor se utilizó los siguientes programas:

- **Scanprosite:** este programa realiza una búsqueda de patrones o motivos estructurales en las bases de datos de proteínas de PROSITE y Uniprot.
- **Tcoffee:** programa de alineamientos múltiples de secuencias de proteínas, ADN o ARN.

3.19.5 EMBOSS (*The European Molecular Biology Open Software Suite*).

EMBOSS es un paquete de software de todo tipo de herramientas para biología molecular. Disponible en <http://emboss.bioinformatics.nl/>. Dentro de este paquete usamos los siguientes programas:

- **Eprimer3:** programa que permite el diseño de cebadores.
- **Garnier:** programa que predice la estructura secundaria de una proteína, utilizando el método de GOR.
- **Revseq:** programa para realizar la reversa complementaria de una secuencia nucleotídica.

- **Seqretsplit:** programa para cambiar los formatos de las secuencias.
- **Sixpack:** programa que traduce una secuencia de ADN en los 6 marcos de lecturas posibles.
- **Tmap:** programa que predice segmentos de transmembrana en la secuencia de una proteína.
- **Transeq:** programa para traducir secuencias de nucleótidos en aminoácidos en los diferentes marcos de lectura generados a partir de una secuencia dada

3.19.6 CLUSTAL Omega.

Para el alineamiento de secuencias proteicas y nucleotídicas se utilizó Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Las secuencias usadas en los alineamientos tuvieron los siguientes números de acceso:

- PHB1 ID: *T. cruzi* (TCDM_03905), *T. brucei* (Tb927.8.4810), *L. major* (LmjF.16.1610), *L. donovani* (LdBPK_161710.1) y *H. sapiens* (GI: 528281407, NP_001268425).
- PHB2 ID: *T. cruzi* (TCDM_03718), *T. brucei* (Tb927.10.4310), *L. major* (LmjF.35.0070), *L. donovani* (LdBPK_350070.1) y *H. sapiens* (GI: 119609105, EAW88699).

3.19.7 Otros programas utilizados.

- **SignalP 4.1 Server:** programa para predecir el péptido señal de una secuencia dada, así como los potenciales sitios de corte para dichos péptidos. Disponible en www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/.
- **GPI-SOM:** programa que predice si la proteína posee el motivo de anclaje a membrana GPI. Disponible en <http://gpi.unibe.ch/>.

- **InterPro:** permite el análisis de secuencias de proteínas. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>.
- **IonCom:** permite el estudio y predicción de unión al Fe^{3+} y otros ligandos a las proteínas de interés. Disponible en: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/IonCom/>.
- **Galaxy 39:** permite la predicción de unión al Fe^{3+} y otros ligandos a las proteínas de estudio. Disponible en: <https://usegalaxy.org/>.
- **Phobius:** predice la topología transmembrana y el péptido señal de proteínas. Disponible en: <http://phobius.sbc.su.se/>.
- **CSS-Palm:** predice el sitio de la palmitoilación de proteínas. Disponible en: <http://csspalm.biocuckoo.org/>.
- **Myristolator:** predice los sitios de N-Miristilación de proteínas. Disponible en: <http://web.expasy.org/myristoylator/myristoylator-ref.html>.
- **NetPhos 2.0:** predice los residuos de tirosina, serina y treonina que pueden fosforilarse. Disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>.
- **SulfoSite:** predice los sitios de sulfatación de proteínas. Disponible en: <http://sulfosite.mbc.nctu.edu.tw/>.
- **Myhits:** permite el estudio de las secuencias de proteínas y los motivos descritos en ellos. Disponible en: <https://myhits.isb-sib.ch/>.
- **CCTOP:** predice la secuencia de aminoácidos de una proteína transmembrana, su topología y la orientación de los segmentos entre ellas. Disponible en: http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/?_=/jobs/submit.
- **TOPO2:** predice la ubicación de los segmentos transmembrana de las proteínas en función de su hidrofobicidad. Disponible en: <http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>.

3.19.8 Programas para la edición de secuencias, imágenes y gráficos.

- **GeneDoc:** programa de edición, ensamblaje de secuencias múltiples.
- **Imagej:** programa de procesamiento de las imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal de fluorescencia.
- **Adobe Illustrator CC 2018:** programa utilizado para realizar los montajes de las imágenes de microscopía.
- **Finch TV:** programa para visualizar y analizar los cromatogramas obtenidos en este trabajo.

3.20 Análisis estadísticos.

Todos los experimentos se hicieron al menos por triplicado. Los análisis o las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA unidireccional no pareado y a posteriori las pruebas de LSD o Tukey, mediante el uso del software Prism 7 (GraphPad). Para todas las pruebas, las diferencias de $P < 0,05$ se consideraron significativas.

3.21 Soluciones y medios

A. Cultivos celulares:

- **Medio MEM (1L):** 7.5 g *Minimum Essential Medium* (MEM) (Sigma), 2.2 g carbonato sódico, 4.4 g HEPES, 0.056 g penicilina, 0.1 g estreptomycin, 0.048 g kanamicina, 100 ml SBFi (suero bovino fetal inactivado), pH 7.2. Se esterilizó por filtración.
- **Tampón fosfato salino (PBS):** 10 mM KH_2PO_4 y 10 mM Na HPO_4 , pH 7.2. Se esterilizó por calor húmedo a 121°C durante 20 min.

- **Solución EDTA-Tripsina:** 0.1 g EDTA, 0.5 g tripsina, completar hasta 200 ml de PBS; pH 7.2.
- **Medio de congelación células Vero:** 80% de medio de cultivo MEM con 10% de SBFi y 10% de DMSO.

B. Cultivos y manejo de tripanosomátidos

- **Medio LIT:** 9 g/l de infusión de hígado (Sigma), 5 g/l triptona, 1 g/l NaCl, 0.4 g/l KCl, 8 g/l Na₂HPO₄, 0.4 KCl g/l, 1 g/l glucosa, 100 mg/mL de penicilina y estreptomycin a. Se esterilizó por filtración.
- **Medio TAU:** 190 mM NaCl, 8 mM de buffer fosfato, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 6. Se esterilizó por filtración.
- **Medio TAU3AAG:** TAU suplementado con 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato de sodio, 2 mM L-aspartamo de sodio y 10 mM D-glucosa, pH 6. Se esterilizó por filtración.
- **RPMI:** 16.4 g RPMI-1640 *Medium* (Sigma), 2.2 g carbonato Sódico, 0.134 g penicilina, 0.060 g estreptomycin a, 0.134 g kanamicina, 100 ml suero bovino fetal inactivado (SBFi) (Gibco) (previamente inactivado mediante incubación a 56°C durante 30 min), agua bidestilada hasta 1 litro, pH 7.7-7.4. Se esterilizó por filtración.
- **Medio de congelación de tripanosomátidos:** 85% de SBFi y 15% de Glicerol estéril.

C. Medios de cultivos y soluciones utilizados en *Escherichia coli*

- **Medio LB líquido:** 1 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1g de NaCl en 100 ml de agua destilada. Se esterilizó por calor húmedo a 121°C durante 20 min.
- **Medio LB-Agar:** 2 g de agar en 100 ml de Medio LB líquido. Se esterilizó por calor húmedo a 121°C durante 20 min.

- **Medio de congelación bacteriana:** 15% Glicerol en LB líquido.

Soluciones, concentración final de antibióticos y otras sustancias relevantes

- **Ampicilina:** 100 µg/ml
- **Kanamicina:** 25 µg/ml
- **IPTG:** 1 mM
- **X-Gal:** 100 µg/ml

Soluciones para la preparación de células de E. coli competentes

- **Solución TFB1:** 100 mM RbCl o KCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM de acetato de potasio, 10 mM CaCl₂, 15% Glicerol, pH 5.8. Esterilizar por filtración.
- **Solución TFB2:** 10 mM MOPS, 10 mM RbCl o KCl, 75 mM CaCl₂, 15% glicerol, pH 6.8. Esterilizar por filtración.

D. Soluciones para electroforesis en gel de agarosa:

- **Tampón TAE (10X):** 48.4 g/l Tris, 3.72 g/l EDTA, 11.14 ml ácido acético, completar hasta 1 l de H₂O, pH 8.2.
- **Tampón de electroforesis:** TAE 1X, agua destilada.
- **Agarosa 2%:** 1 g de agarosa en 50 ml de tampón TAE 1X.

E. Soluciones para la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida:

- **Tampón de carga:** Tris 0.1 M pH 6.8, SDS 2%, EDTA 4 mM pH 8, glicerol 20%, azul bromofenol 0.01%, 2% de β-mercaptoetanol.

- **Tampón de electroforesis:** 3.02 g/l de Tris, 14.4 g/l de glicina y 1 g/l de SDS.

Los geles de poliacrilamida utilizados al 12% estaban constituidos por un gel concentrador, que contiene los pocillos para depositar las muestras y un gel separador. La composición de cada gel se detalla en la **Tabla 3.9** y **3.10** respectivamente.

Tabla 3.9. Composición del gel concentrador.

Soluciones	Volumen
Agua destilada	1.8 ml
Acrilamida al 30%	0.43ml
1.5 M Tris-HCL pH 8.8	0.313 ml
10% SDS	0.025 ml
10% APS	0.025 ml
TEMED	0.01 ml
Volumen final	2.5 ml

Tabla 3.10. Composición del gel separador.

Soluciones	Gel al 12%
Agua destilada	3.45 ml
Acrilamida al 30%	3.9 ml
1 M Tris-HCL pH 6.8	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% APS	0.2 ml
TEMED	0.01 ml
Volumen final	10 ml

F. Soluciones de tinción de geles de poliacrilamida:

Tinción con azul de Coomassie:

- **Solución para teñir:** 40% de metanol, 10% de ácido acético, 0.05% de azul de Coomassie (Brillant Blue-250, Sigma).
- **Solución para desteñir:** 10% de propanol, 10% de ácido acético.

Tinción con nitrato de plata:

En la **Tabla 3.11** se detalla la composición de las soluciones necesarias para llevar a cabo la tinción con nitrato de plata y los tiempos de incubación.

Tabla 3.11. Composición de las soluciones para la tinción de plata

Pasos	Tipo de Solución	Composición	Tiempo
1	Fijadora	100 ml de etanol, 25 ml ácido acético glacial, completar hasta 250 ml de agua.	30 min
2	Sensibilizadora	75 ml etanol, 1.25 ml glutaraldehído (37%), 10 ml tiosulfato de sodio (0.5 g), 17g acetato de sodio, completar hasta 250 ml de agua destilada.	30 min
3	De lavado	Agua destilada	2 x 1 min
4	De teñir	2.5% solución de nitrato de plata, 0.1 ml formaldehído (37%), completar hasta 250 ml de agua destilada.	20 min
5	De lavado	Agua destilada	2 x 1 min

6	Reveladora	6.25g carbonato de sodio 0.05 ml formaldehído (37%) completar hasta 250 ml de agua destilada.	2–10 min
7	De parada	3.65 g EDTA-Na ₂ H ₂ O completar hasta 250 ml de agua destilada.	10 min
8	De lavado	Agua destilada	3 x 5 min
9	Preservadora	75 ml etanol 11.5 ml glicerol puro completar hasta 250 ml de agua destilada.	Para almacenar

G. Soluciones utilizadas en los Western blots

- **Tampón de bloqueo:** Tween 0.1% en PBS, leche en polvo 2%.
- **Tampón de lavado:** Tween 1% en PBS.
- **Sustrato de revelado:** *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad).
- **Solución ácida:** 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 2.3.

H. Soluciones utilizadas en la solubilización y purificación de proteínas

Soluciones para la solubilización de proteínas:

- **Solución de acoplamiento nativo (S1):** 20 mM fosfato sódico, 0.5 M NaCl y 20 mM imidazol, pH 7.4
- **Solución de acoplamiento desnaturizante (S2):** 20 mM Tris-HCl, 8 M urea, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8.

Solución para diálisis:

- **Tampón de diálisis:** 0.1 M acetato de amonio.

Soluciones para la purificación de cuerpos de inclusión:

- **Tampón de lisis:** 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoetanol.

Cromatografía de afinidad columna HiTrap (GE Healthcare):

- **Solución de acoplamiento nativo:** 20 mM fosfato sódico, 0.5 M NaCl y 20 mM imidazol, pH 7.4.
- **Solución de acoplamiento desnaturante:** 20 mM Tris-HCl, 8M urea, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM de β - mercaptoetanol, pH 8.
- **Solución de elución desnaturante:** 20 mM Tris-HCl, 8 M urea, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, 1 mM de β - mercaptoetanol, pH 8.

Purificación de proteínas recombinantes a través de geles de SDS-PAGE:

- **Tampón de elución:** 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5.

Purificación mediante cromatografía de afinidad en tándem (TAPtag):

- **Buffer de lisis:** 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5% NP-40, 1 x inhibidores de proteasas, completar hasta 10 mL de H₂O.

- **IPP150:** 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP40, completar hasta 100 mL de H₂O.
- **Buffer de corte TEV:** 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP40, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT (añadir antes de utilizar), completar hasta 100 mL de H₂O.
- **IPP150 de acoplamiento a calmodulina:** 10 mM β-mercaptoetanol, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM acetato de magnesio, 1 mM imidazol, 2 mM CaCl₂, 0.1% NP40, completar hasta 100 mL de H₂O.
- **Buffer IPP150 de elución de calmodulina:** 10 mM β-mercaptoetanol, 10 mM Tris-Cl pH8, 150 mM NaCl, 1 mM acetato de magnesio, 1 mM imidazol, 2 mM EGTA, 0.1% NP40, completar hasta 100 mL de H₂O.

Cromatografía de afinidad mediante matriz cromatografica ligada a iones Fe³⁺

- **Tampón de unión:** 0.02 M fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, pH 6.8.
- **Solución ácida:** 0.02 M de acetato sódico, 0.5 M NaCl, pH 4.
- **Tampón de elución:** 0.05M de EDTA o EGTA, 0.5 M NaCl, pH 7.
- **Solución de hierro:** 100 mM FeCl₃, pH 3.

I. Soluciones utilizadas para la realización de los ELISA

- **Tampón carbonato:** 0.1 M tampón carbonato, pH 9.6.
- **Tampón de bloqueo:** 5% de leche en polvo desnatada y 0.1% de Tween 20 disuelto en PBS.
- **Tampón de lavado:** 0.3% de Tween 20 en solución PBS.
- **Tampón citrato:** 0.46 g de ácido cítrico, 0.72 g de Na₂HPO₄, completar con 100 ml de agua destilada, pH5.

- **Solución sustrato de la peroxidasa:** para 25 ml añadir 12.5 ml de tampón citrato, pH 5 y 12.5 ml de agua destilada, una pastilla de OPD (Sigma) y 50 μ l H₂O₂ (Sigma) en el momento de utilizar.

Solución de parada: 3 M de HCl.

J. Soluciones para los estudios de microscopia

Microscopia confocal

- **Tampón de fijación parásitos:** 3.7% formaldehído en PBS (0.37 g paraformaldehído en 7 ml H₂O₂, calentar en baño a 60°C, añadir unas gotas de NaOH 1 M, dejar enfriar a temperatura ambiente y ajustar hasta 10 ml con PBS (0.2 M). Ajustar el pH a 7.4.
- **Tampón de fijación de Karnovsky (utilizado para fijar células Vero y parásitos):** 2% de paraformaldehído y 1% glutaraldehído en tampón PBS, pH 7.4.
- **Tampón de permeabilización:** ácido cítrico 10 mM, 10% NP40.
- **Tampón de lavado:** PBS filtrado en filtro de 0.22 μ m de tamaño de poro (Sartorius).
- **Tampón de bloqueo:** albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA) 1% en PBS.

Microscopia electrónica de transmisión (MET)

- **Fijador para inmunocitoquímica:** 0.5% de glutaraldehído y 2% de paraformaldehído en tampón PB, pH 7.2
- **Fijador para ultraestructura:** 2% de glutaraldehído y 4% de paraformaldehído en tampón cacodilato, pH 7.2.
- **Tampón glicina:** 0.02 M glicina en PBS
- **Tampón de bloqueo 1:** 1% de gelatina de teleósteo en PBS.

- **Tampón de bloqueo 2:** 1% de ovoalbúmina en PBS

4. RESULTADOS

4.1 Estudio y obtención de las PHBs recombinantes de *T. cruzi*

A fin de cumplir el primer objetivo de la tesis y obtener anticuerpos policlonales frente a las Prohibitinas 1 y 2 de *T. cruzi* fue necesaria la expresión de las proteínas de estudio en *E. coli*. La expresión heteróloga permite obtener grandes cantidades de proteínas, necesarias para la inmunización de animales.

Antes de llevar a cabo la clonación realizamos un análisis bioinformático de los genes y proteínas de estudio, con el propósito de conocer sus características y propiedades a fin de diseñar las mejores estrategias de clonación, expresión y purificación de las proteínas de interés.

4.1.1 Análisis bioinformático

La secuencia de los genes bajo estudio, *phb1* y *phb2* de *T. cruzi*, se extrajeron de la base de datos TriTrypDB usando como cepa de referencia la cepa DM28c de *T. cruzi* con DTU I. El número de identidad para la PHB1 es TCDM_03905 y para la PHB2 TCDM_03718.

Al ser las PHBs proteínas conservadas y encontrarse ampliamente distribuidas en eucariotas (150,185), fue necesario analizar la similitud de las secuencias aminoacídicas entre las PHBs de *T. cruzi* con otras especies donde dichas proteínas han sido descritas, para ello se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo ClustalW.

Para el alineamiento múltiple se utilizaron las secuencias de las PHB1 en las siguientes especies con sus correspondientes números de identidad: *T. cruzi* (TCDM_03905), *T. brucei* (Tb927.8.4810), *L. major* (LmjF.16.1610), *L. donovani* (LdBPK_161710.1) y *H. sapiens* (GI: 528281407, NP_001268425).

Para la PHB2 se utilizaron las secuencias de los siguientes organismos con sus correspondientes números de identidad: *T. cruzi* (TCDM_03718), *T. brucei* (Tb927.10.4310), *L. major* (LmjF.35.0070), *L. donovani* (LdBPK_350070.1) y *H. sapiens* (GI: 119609105, EAW88699).

Los resultados obtenidos de dicho análisis *in silico* aparecen reflejados en la **Figura 4.1** donde se muestran los alineamientos múltiples de las secuencias aminoacídicas de las PHBs de diferentes especies. El análisis de la **Figura 4.1 A** indica que PHB1 de *T. cruzi* posee un 84% de identidad con la PHB1 de *T. brucei*, 80 a 81% con el género *Leishmania* y 48% con la humana.

Por otro lado, los análisis de la **Figura 4.1 B**, indica que la PHB2 de *T. cruzi* comparte el 83% de la identidad con la PHB2 de *T. brucei*, el 74% con el género *Leishmania* y el 47% con *H. sapiens*.

Al estudiar las secuencias de dichas proteínas con la base de datos Interpro se determinó que tanto la PHB1 como la PHB2 de las diferentes especies comparten el dominio Band7/SPFH (IPR036013). Este motivo es también conocido como motivo PHB, que comprende a un amplio grupo de proteínas caracterizadas por la unión de las mismas a membranas. La función exacta de este dominio es desconocida, pero abarca desde proteínas bacterianas que tienen la capacidad de unirse a lípidos a proteínas de unión a la membrana eritrocitaria en humanos (134).

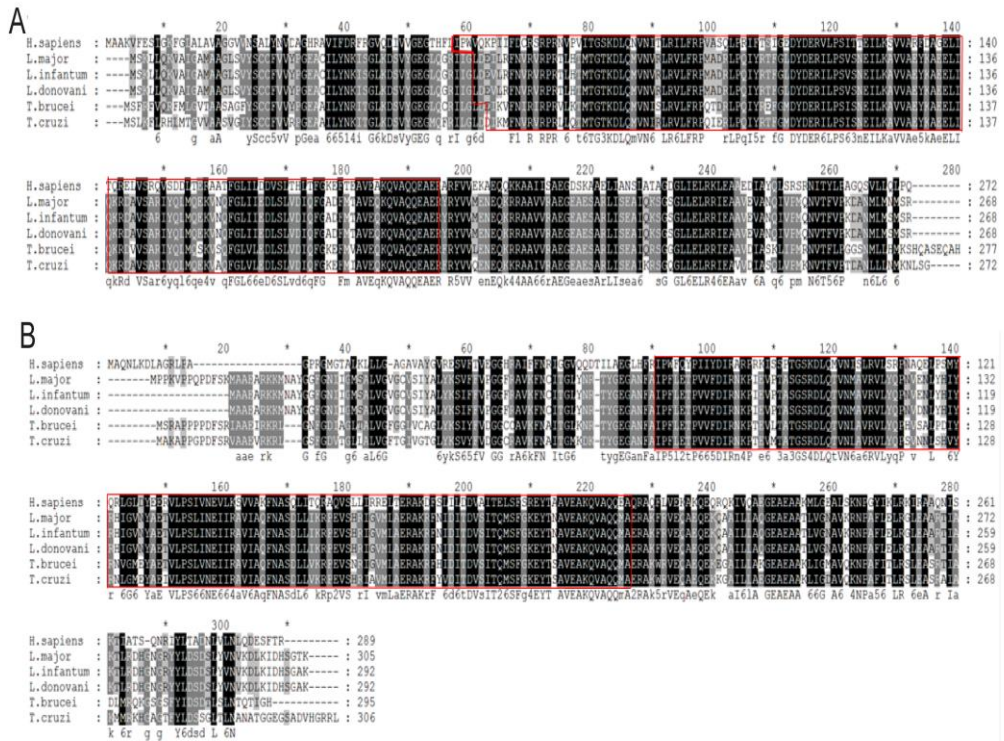


Figura 4.1. Alineamiento múltiple de PHBs de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, *L. donovani* y *H. sapiens* realizado con el algoritmo ClustalW. En rojo se muestra el motivo SPFH. **A.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las PHB1 de diferentes especies; **B.** Alineamiento de las secuencias proteicas de las PHB2 de diferentes especies.

El análisis de la secuencia del gen *phb1*, mostró que posee una ORF de 819 pb lo que se tradujo en un tamaño proteico de 30.9 kDa para la proteína PHB1. El estudio de la secuencia en la base de datos TriTrypDB mostró como la proteína PHB1 posee un péptido señal que comprende los aminoácidos 1 a 32. Sin embargo, utilizando programas especializados para la predicción de péptidos señal como SignalBlast y SignalIP 4.1 (que distinguen entre péptido señal y segmentos transmembrana) no detectaron la presencia de dicho péptido señal. El análisis de la secuencia aminoacídica de la PHB1 con el programa CCTOP predijo que la proteína presenta un segmento transmembrana entre los aminoácidos 9 al 27. La orientación del mismo se determinó con el programa TOPO2. El resultado del análisis se muestra en la

Figura 4.2. donde se observa como PHB1 es una proteína integral de membrana que atraviesa la bicapa lipídica de lado a lado, quedando el dominio N-terminal en el citosol y el C-terminal en el exterior de la célula. Lo que fue corroborado tras el análisis con la base de datos Interpro, en la cual se encuentra descrita la PHB1 como un componente de la membrana celular (GO: 0016020).

El análisis de la secuencia del gen *phb2*, muestra una ORF de 921 pb lo que se tradujo en un tamaño proteico de 33.2 kDa para la proteína PHB2. El análisis de la secuencia aminoacídica de la PHB2 con el programa CCTOP predijo que la proteína posee un segmento transmembrana entre los aminoácidos 27 al 44, similar al descrito en la PHB1, con el extremo N-terminal en el citoplasma y el C-terminal en el exterior (**Figura 4.2**). De la misma manera, la base de datos Interpro determinó que la PHB2 es un componente celular de la membrana (GO: 0016020).

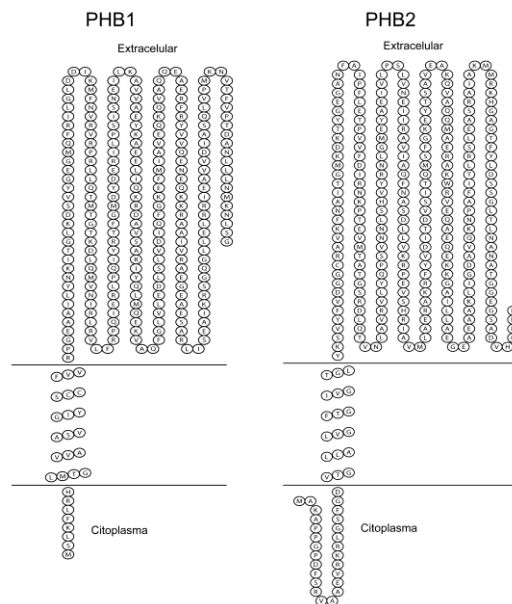


Figura 4.2. Modelo topológico de las PHBs de *T. cruzi* predicho con el programa CCTOP y diseñado con el programa TOPO2. Los modelos muestran que tanto la proteína PHB1 como PHB2 posee un segmento transmembrana. En ambas proteínas, se observa el extremo N-terminal en el citoplasma celular y el C-terminal en el espacio extracelular.

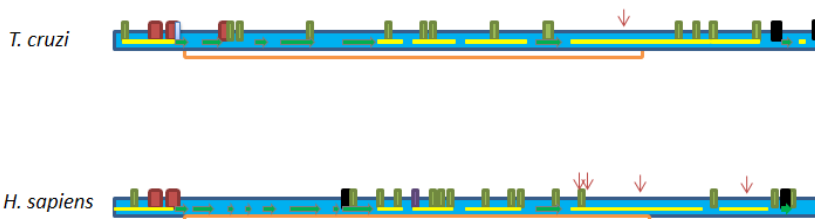
El análisis de las secuencias aminoacídicas de PHB1 y PHB2 con el programa I-TASSER predijo las estructuras secundarias de las proteínas, así como sitios específicos de modificación postraduccional mediante el estudio con los programas descritos en el apartado 3.19 (**Figura 4.3**). En la **Figura 4.3 A**, se observa la predicción de la unión a Fe^{3+} de la PHB1 en los residuos E199 y Q202; así como la estructura secundaria de la misma, las posibles modificaciones postraducionales (miristilación, fosforilación, glicosilación y palmitilización) y la comparación de la prohibitina del parásito con la humana. Para la PHB1 del parásito se observaron 2 sitios de miristilación, 14 de fosforilación, 2 de glicosilación y 1 de palmitilización; en contraste con la humana donde se observaron 2 sitios de miristilación, 15 de fosforilación, 2 de glicosilación y ningún sitio de palmitilización, pero 4 posibles sitios de unión a hierro.

Tal y como se observa en la **Figura 4.3 B**, la PHB2 posee dos posibles sitios de unión a Fe^{3+} con el motivo EXXE: E134-E137 y E222-E225; asimismo se muestra la estructura secundaria de las proteínas, las posibles modificaciones postraducionales y la comparación de la prohibitina 2 del parásito con la humana. Para la PHB2 del parásito se observaron 6 sitios de miristilación, 17 de fosforilación y 2 de glicosilación; en contraste con la humana donde se observaron 3 sitios de miristilación, 16 de fosforilación y 2 de glicosilación, pero solo un sitio de unión a hierro.

La comparación *in silico* de la PHB1 del parásito y la humana indica que poseen tamaños similares, con un 48% de identidad entre ellas. Por otra parte el análisis de la secuencia aminoacídica de las PHB2 de *T. cruzi* y la humana indica que poseen un 47% de identidad. No obstante, a pesar de tener tamaños similares las PHBs del parásito y las humanas, los sitios de las modificaciones postranscripcionales son en su mayoría distintos; cabe recordar que en los

tripanosomátidos la regulación de la expresión génica es básicamente postranscripcional.

A. PHB1



B. PHB2

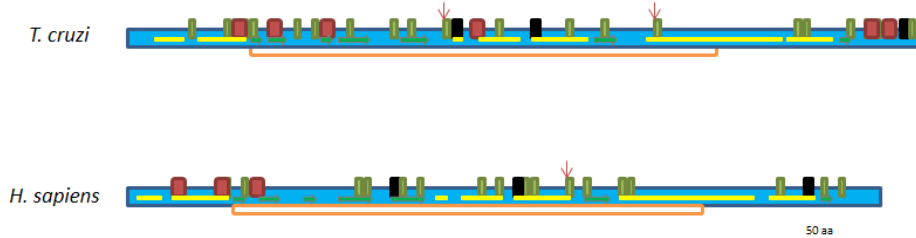


Figura 4.3. Predicciones *in silico* de la estructura secundaria, de las modificaciones postraduccionales, motivo SPFH y sitios de unión a Fe³⁺ de las PHBs de *T. cruzi* y de *H. sapiens* con los programas descritos en el apartado 3.19 de Materiales y Métodos. A. Predicciones para las PHB1; B. Predicciones para las PHB2.

4.1.2 Expresión heteróloga de los genes *phb1* y *phb2* en la cepa M15 de *E. coli*.

4.1.2.1 Clonación del gen *phb1* en *E. coli*

Para lograr la clonación del gen *phb1* en un sistema de expresión heteróloga se diseñaron dos estrategias de clonación diferentes. La primera consistió en

clonar el gen *phb1* de *T. cruzi* en el vector de expresión pQE30-Xa. Este vector proporcionó a la proteína de fusión resultante una cola con 6 histidinas que facilitó tanto la purificación de la proteína; como su localización y al ser un marcador de tamaño pequeño, disminuye la posible interferencia de la misma con la función biológica de la proteína.

La segunda estrategia, que se emprendió en caso de que la proteína fuera insoluble, consistió en la clonación del gen *phb1* en el vector de expresión pET-41c, lo que proporcionó a la proteína un *tag* de GST de 220 aa (26 kDa). Este marcador suele conferir a la proteína recombinante una mayor estabilidad y la posibilidad de aumentar considerablemente la solubilidad de la proteína de fusión.

4.1.2.2 Clonación de la *phb1* en el vector de expresión pQE30-Xa

Tras la obtención del ARN mensajero de la cepa DM28c a partir de un cultivo de epimastigotes cultivados como se describe en el apartado 3.1.2.1 de Materiales y Métodos, se procedió a la síntesis de ADN copia (ADNc) mediante una RT-PCR con los cebadores oligo-dT y exanucleótidos aleatorios. Esto permitió la amplificación de todo el ARN tal y como se indica en el apartado 3.6. Tras lo que se realizó una amplificación con los cebadores PHB1pQE30F y PHB1pQE30R (**Tabla 3.3** de Materiales y Métodos), que amplificaron el gen *phb1* completo, a excepción del codón de parada. Ambos cebadores muestran sitios de restricción en los extremos con objeto de facilitar la clonación del fragmento amplificado. El cebador PHB1pQE30F posee un sitio de restricción *Bam*HI y el cebador PHB1pQE30R contenía la secuencia para el reconocimiento de la enzima de restricción *Sal*I.

La **Figura 4.4** muestra la amplificación con los cebadores PHB1pQE30F y PHB1pQE30R a partir de ADN complementario (ADNc). El tamaño del amplicón obtenido fue de 836 pb lo que concuerda con el tamaño esperado.

Dado que no se visualizó ninguna banda en el control negativo (carril 3), confirmó la pureza del ARN mensajero (ARNm) usado y que no se encontraba contaminada con ADNg.

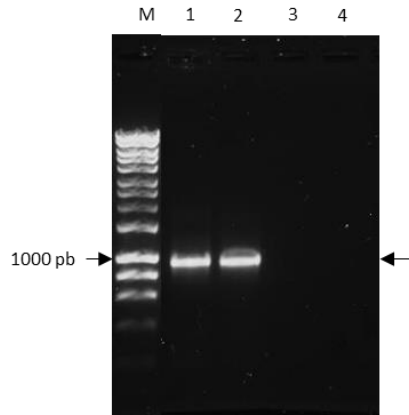


Figura 4.4. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los amplicones *phb1* a partir de ADNc de la cepa DM28c. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline), 1: control positivo de la amplificación de la *phb1* a partir de ADNg de la cepa DM28c; 2: amplificación a partir de la extracción de ADNc de epimastigotes; 3: amplificación a partir de la extracción de ARNm; 4: control negativo de la PCR.

Partiendo del ADNc obtenido y mediante la técnica de PCR se amplificó el gen *phb1* con los cebadores PHB1pQE30F y PHB1pQE30R, como se mencionó anteriormente. Dichos cebadores amplificaron el gen *phb1* completo, a excepción del codón de parada.

Tras la amplificación por PCR, el fragmento de ADN obtenido con los cebadores PHB1pQE30F y PHB1pQE30R se clonó primeramente en el vector pre-linearizado pGEM-T Easy (Promega), el cual contiene proyecciones 3'-T en los extremos de tal forma que fue compatible con los extremos del producto de PCR como se menciona en el apartado 3.3.1 de Materiales y Métodos. El resultado de esta ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa DH5 α como se describió en el apartado 3.7.9. Tras lo que se realizó el rastreo de los clones positivos mediante PCR, como se describió anteriormente en el apartado 3.7.10 con los cebadores T7 y SP6.

Una vez seleccionado un clon positivo al azar, se realizó una extracción de ADNp con el kit de Extracción de ADN plasmídico (Promega) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ADNp obtenido se utilizó como molde en una PCR con los cebadores PHB1pQE30F y PHB1pQE30R. El amplicón obtenido, que contenía los sitios de restricción mencionados anteriormente, fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I como se describió en el apartado 3.7.2 de Materiales y Métodos, siendo purificado con el kit de Purificación de productos de PCR para la eliminación de los extremos digeridos ligándose al vector pQE30-Xa (previamente digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I) usando para dicha ligación la enzima T4 ligasa como se describió en el apartado 3.7.6 de Materiales y Métodos. Esta ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa *E. coli* M15.

La cepa M15 de *E. coli* fue seleccionada dado que contiene otro plásmido denominado pREP4, el cual en el caso de que la proteína fuese tóxica, inhibe la expresión basal de la proteína recombinante. El sistema de represión consiste en la expresión de la proteína represora LAC por parte del plásmido pREP4. Esta proteína se une a las secuencias del operador y regula la expresión de la proteína recombinante. No obstante, al añadir IPTG a los cultivos se induce rápidamente la expresión de la proteína recombinante, la cual se une a la proteína represora LAC y la inactiva. Una vez que el represor LAC está inactivado, la ARN polimerasa de la célula huésped puede transcribir las secuencias aguas abajo del promotor, las cuales se traducen en la proteína recombinante.

Del rastreo de 24 clones, 17 de ellos fueron positivos tras la PCR como se muestra en la **Figura 4.5**. Como se puede observar, a modo de ejemplo, en los clones 1, 2, 3 y 4 que fueron positivos al amplificar un fragmento de 836 pb, que correspondió con el tamaño esperado.

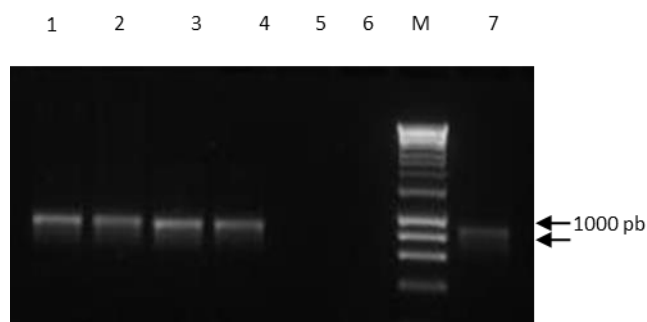


Figura 4.5. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de algunos amplicones obtenidos en el rastreo de los clones positivos de la transformación. El rastreo se realizó con los cebadores PHB1pQE30F y PHB1pQE30R. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline), 1 al 5: diferentes clones provenientes de la transformación; 6: control negativo de la PCR; 7: control positivo amplificación de la *phb1* a partir de ADNg.

Se seleccionó al azar el clon 2, a cuyo plásmido se denominó pQEHB1, correspondiente a la fusión del vector pQE30-Xa y el gen *phb1*. El plásmido fue extraído, secuenciado con los cebadores pQE30F y pQE30R. El análisis de su secuencia mostró que no existía ninguna mutación con respecto al gen de origen y que el marco de lectura del gen fusionado era como se había diseñado.

4.1.2.3 Clonación de la *phb1* en el vector de expresión pET-41c

En la segunda estrategia emprendida en este estudio se utilizó el sistema de clonación Ek/LIC (Novagen). Para ello, se diseñaron los cebadores PHB1pET41F y PHB1pET41R (**Tabla 3.3**), los cuales contenían los sitios de extensión 5' LIC además de la secuencias para poder amplificar al gen *phb1* completo, desde el codón de inicio de la traducción hasta el final, con la excepción del codón de parada. Tras la amplificación del gen *phb1* a partir de ADNc, el amplicón se purificó y se trató con la enzima T4 ADN polimerasa, la cual genera extremos protuberantes a través de su actividad exonucleasa 3'→5'. Posteriormente, el vector lineal conteniendo dichos extremos se ligó con el fragmento de ADN que posee los extremos protuberantes como se

describió en el apartado 3.7.7 de Materiales y Métodos. Esta ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa *E. coli* M15 las cuales se rastrearon mediante PCR desde la colonia tal y como se describió anteriormente. El resultado del rastreo de 24 clones todos fueron positivos.

En la **Figura 4.6** se muestra el resultado del rastreo de algunos de los clones positivos amplificados con los cebadores PHB1pET41F y PHB1pET41R. Como se observa, los clones (carriles 1 al 6) fueron positivos, obteniéndose un amplicón con un tamaño de 843 pb. Este sistema de clonación fue más eficiente y práctico que el anterior, debido a que en un número menor de pasos experimentales se obtuvo el resultado esperado y el total de los clones analizados resultaron positivos.

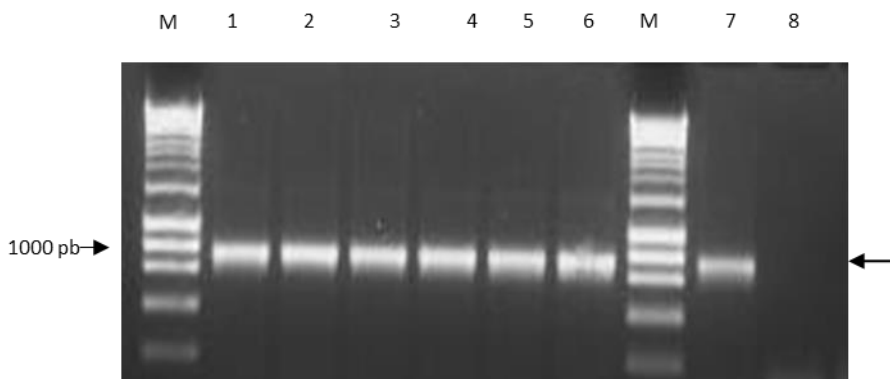


Figura 4.6. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los amplicones obtenidos en el rastreo de los clones positivos amplificados con los cebadores PHB1pET41F y PHB1pET41R. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); 1 al 6: diferentes clones de la transformación; 7: control positivo amplificación de la *phb1* a partir de ADNg; 8: control negativo de la PCR.

El clon 3 se seleccionó al azar y al plásmido que contenía se le denominó pETHB1, procedente de la fusión del vector pET41c y el gen *phb1*. Tras extraer y secuenciar el ADN con los cebadores T7, SP6 y STag se determinó que al igual que ocurrió anteriormente con el procedimiento del apartado 4.1.2.2 no existió ninguna mutación y que el marco de lectura del gen fusionado era también como se había diseñado.

4.1.2.4 Expresión de la PHB1 de *T. cruzi* en *E. coli*

Con objeto de comprobar que las proteínas recombinantes se expresaron correctamente, se cultivaron los distintos clones de *E. coli*, que portaron los plásmidos pQEHB1, pQE, pETHB1 y pET en medio LB hasta llegar a una D.O. 600_{nm} final de 0.5. Tras dividir cada cultivo en dos, y añadir a uno de ellos IPTG se tomaron muestras de 1 ml cada dos horas (0, 2, 4 h). Las muestras se centrifugaron y los botones se mantuvieron a -20°C hasta que fueron analizados mediante SDS-PAGE.

En la **Figura 4.7** se muestra la expresión de la proteína PHB1 de *T. cruzi* a lo largo del tiempo en la cepa de *E. coli* (pQEHB1). Comparando los perfiles proteicos de la cepa *E. coli* (pQEHB1) con la cepa *E. coli* (pQE), se observó que la expresión de la PHB1 solamente existió en aquellas muestras procedentes de los cultivos a los cuales se había añadido IPTG. Determinándose que el tiempo óptimo de expresión era de 4 h.

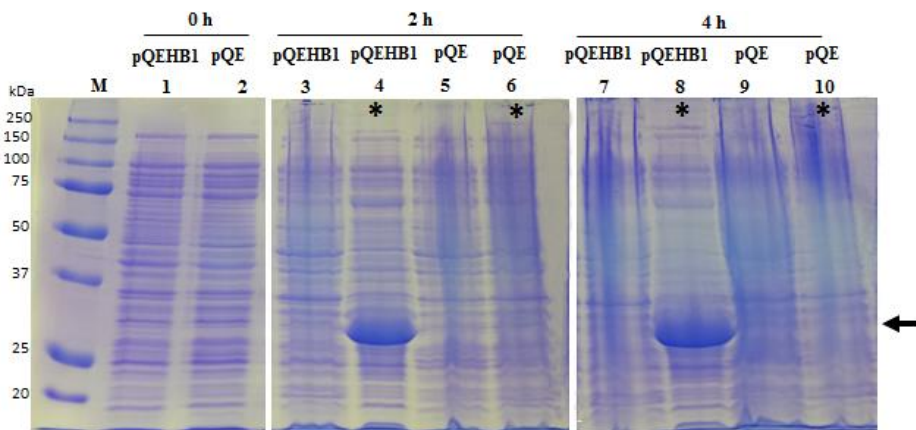


Figura 4.7. Expresión de la PHB1 de *T. cruzi* en las cepas *E. coli* (pQEHB1) a lo largo del tiempo. Marcado con un * se muestran los carriles a cuyos cultivos se les añadió IPTG y con una (←) el tamaño esperado de la PHB1 con el tag de seis histidinas en la proteína de fusión (33kDa).

En la **Figura 4.8** se muestra la expresión de la proteína PHB1 de *T. cruzi* a lo largo del tiempo en *E. coli* (pETHB1) comparada con la cepa *E. coli* (pET). De igual forma que se observó en la construcción anterior, la PHB1 solo se observó en muestras donde se había añadido IPTG. La proteína PHB1 mostró un tamaño de 62 kDa, tal como se esperaba, visualizándose la expresión de la proteína recombinante con la etiqueta GST expresada por la cepa *E. coli* (pET) con un tamaño de 31 kDa. Se determinó que el tiempo óptimo de expresión era de 4 h.

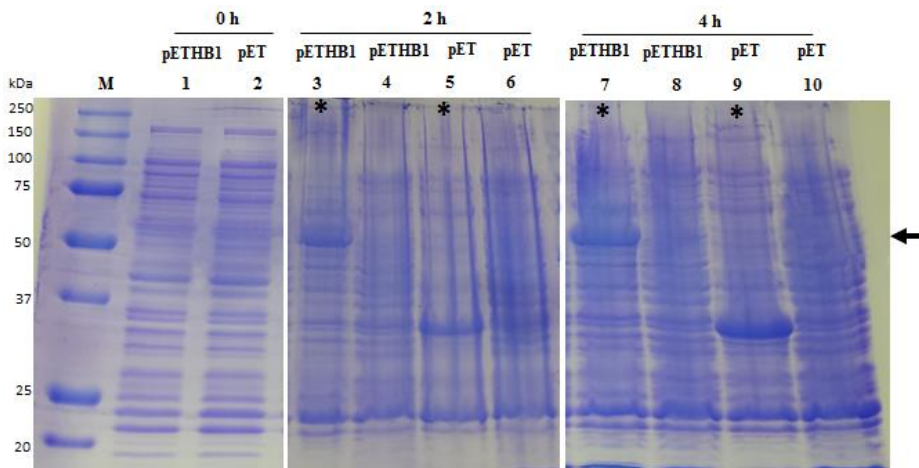


Figura 4.8. Expresión de la PHB1 de *T. cruzi* en la cepa de *E. coli* (pETHB1) a lo largo del tiempo. Marcado con un (*) se muestran los carriles a cuyos cultivos se les añadió IPTG y con una (←) el tamaño esperado de la PHB1 recombinante marcada con GST (62 kDa).

Las proteínas así expresadas se analizaron mediante Western blot con anticuerpos frente a las etiquetas de marcaje usadas con la PHB1 (HisTag y GST), utilizando un anticuerpos secundarios conjugados con HRP como se indicó en el apartado 3.9.4. En la **Figura 4.9** se muestra el resultado de la detección mediante Western blot de las proteínas de fusión de la PHB1 utilizando los anticuerpos primarios anti-Poly-His-Tag y anti-GST-Tag respectivamente. Como se observa en el **panel A**, la banda más intensa expresada por *E. coli* (pQEHB1) corresponde con el tamaño esperado para la

PHB1 recombinante (33 kDa). Mientras que en el **panel B**, se observa una banda muy intensa con un tamaño de 62 kDa, que corresponde a la PHB1 recombinante expresada por *E. coli* (pETHB1). Además se observó una banda intensa de ~31 kDa expresada por *E. coli* (pET) la cual correspondió a la PHB1 con el tag GST.

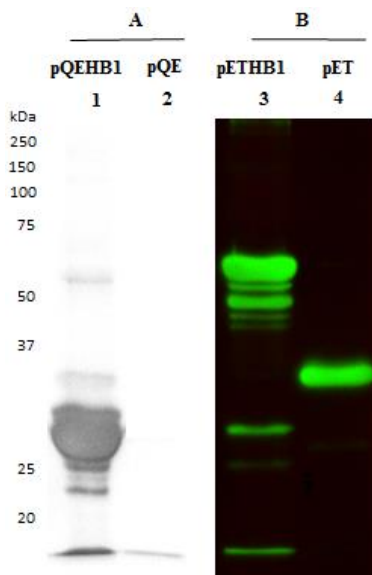


Figura 4.9. Detección mediante Western blot de la expresión de la PHB1 recombinante usando A. un anticuerpo primario anti-PolyHisTAG y B. un anti-GST-Tag revelados mediante quimioluminiscencia. En el gel fue analizado un extracto de proteínas totales de 1: *E. coli* (pQEHB1); 2: *E. coli* (pQE); 3: *E. coli* (pETHB1); 4: *E. coli* (pET).

Como se describió anteriormente, las proteínas recombinantes expresadas por la bacteria se encontraron de forma insoluble. Para solubilizar a las mismas, primeramente se utilizó una solución Nativa (S1), carente de Urea, (20 mM fosfato sódico, 500 mM NaCl, pH: 7.4) y posteriormente una solución Desnaturalizante (S2) con un 8M de Urea (500 mM NaCl, 8 M Urea, pH: 7.4). Tras la solubilización y posterior centrifugación fueron analizados los sobrenadantes mediante SDS-PAGE (**Figura 4.10**). Como se observa en la Figura la solución S1 no fue capaz de solubilizar ninguna de las proteínas de

fusión, mientras que con la solución desnaturante S2 se observaron dos bandas intensas correspondientes a las proteínas de fusión.

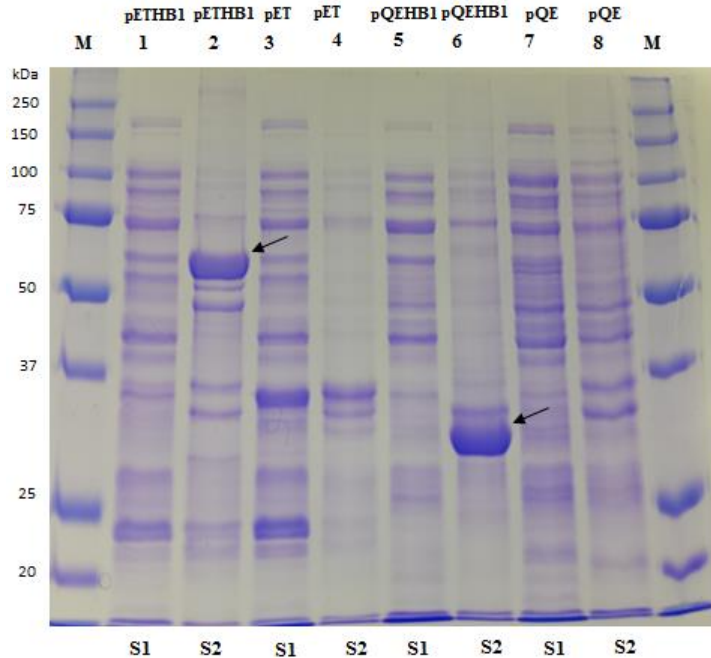


Figura 4.10. Análisis por SDS-PAGE 12% de los estudios de solubilización de las PHB1 recombinantes expresadas en *E. coli* (pQEHB1) y *E. coli* (pETHB1). Las muestras se solubilizaron con solución nativa (S1) y solución desnaturante (S2). Con una (←) se indican los tamaños esperados para las dos PHB1 recombinantes (33 kDa y 62 kDa respectivamente).

De estos resultados se desprende que el *tag* GST no aumentó la solubilidad de la proteína PHB1. Debido al gran tamaño de este marcador en comparación con el *tag* de histidina, y sobre todo a que la GST se encontraba desnaturada (lo que potencialmente podría interferir en el proceso de su purificación), no se consideró oportuno seguir con este sistema para la clonación del gen *phb2*.

4.1.2.5 Clonación del gen *phb2* en el vector de expresión pQE30-Xa

Una vez escogida la estrategia más conveniente, se procedió a la clonación del gen *phb2* siguiendo la misma metodología que la seguida para el gen *phb1*. En primer lugar el gen *phb2* se amplificó por completo, a excepción del codón de parada, con los cebadores PHB2pQE30F y PHB2pQE30R (**Tabla 3.3** de Materiales y Métodos). Estos cebadores contenían los sitios de restricción *Bam*HI y *Sal*I. Tras la digestión del vector y el fragmento de ADN con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I y su posterior ligación con la T4 ligasa, se clonó en el vector de expresión pQE30-Xa. El resultado de la ligación se transformó en células competentes de la cepa M15 de *E. coli*, para posteriormente realizar el rastreo de los clones positivos como se describió en el apartado 3.7.10. De ello se obtuvieron 15 clones positivos de los 22 clones totales. En la **Figura 4.11** se muestra el resultado del rastreo de algunos de los clones seleccionados. Los clones 1, 2, 4 y 5 fueron positivos ya que mostraron una amplificación de una banda de 933 pb.

El clon 2 se seleccionó al azar y al plásmido que contenía se le denominó pQEHB2, procedente de la fusión del vector pQE30 y el gen *phb2*. Tras extraer y secuenciar su ADN con los cebadores T7 y SP6 se determinó que no existía ninguna mutación y que el marco de lectura del gen fusionado era como el esperado.

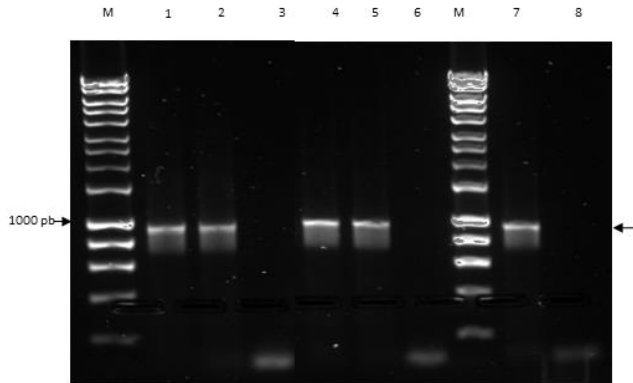


Figura 4.11. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de algunos de los amplicones obtenidos en el rastreo de los clones usando los cebadores PHB2pQE30F y PHB2pQE30R. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline), 1 al 6: diferentes clones provenientes de la transformación; 7: control positivo amplificación de la *phb2* a partir de ADNg. 8: control negativo de la PCR.

4.1.2.6 Expresión de la PHB2 de *T. cruzi* en *E. coli*

Siguiendo el mismo procedimiento realizado para la expresión de las proteínas recombinantes PHB1 de *T. cruzi*, se comprobó la correcta expresión de la proteína recombinante comparando la expresión de *E. coli* (pQEHB2) y *E. coli* (pQE). En la **Figura 4.12** se muestra la expresión de *E. coli* (pQEHB2) y *E. coli* (pQE) a lo largo del tiempo. La expresión de la PHB2, con un tamaño de 35 kDa, solamente se observó en las muestras a las cuales se añadió IPTG. Como se observa en la figura, el tiempo óptimo de expresión fue como en el caso anterior de 4 h.

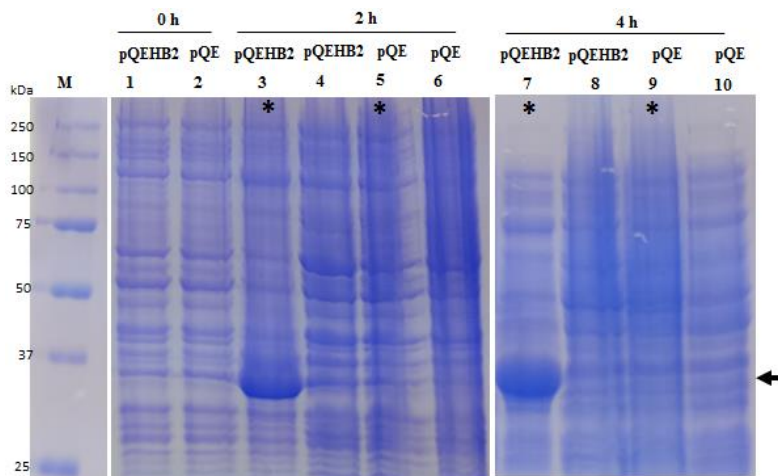


Figura 4.12. Expresión de la PHB2 de *T. cruzi* en las cepas *E. coli* (pQEHB2) a lo largo del tiempo. Con un * se muestran los carriles a cuyos cultivos se les añadió IPTG y con una (←) el tamaño esperado de la PHB2 fusionada a una etiqueta de histidina (35kDa).

Posteriormente las proteínas expresadas se analizaron mediante Western blot con anti-PolyHisTag y un anticuerpo secundario conjugado con HRP y revelado con quimioluminiscencia tal y como se indicó en el apartado 3.9.4. En la **Figura 4.13**, se muestra el resultado de la detección mediante Western blot de la proteína de fusión de la PHB2 que mostró el tamaño esperado de 35 kDa.

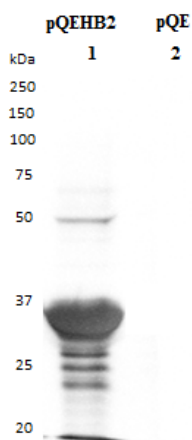


Figura 4.13. Detección mediante Western blot de la proteína de la PHB2 recombinante, utilizando como anticuerpo primario anti-PolyHisTag.

4.1.2.7 Aislamiento y purificación de las PHBs recombinantes

Como hemos visto anteriormente las proteínas recombinantes objeto de este de estudio, y producidas en *E. coli* se expresan como proteínas insolubles, aparecen acumuladas intracelularmente en la bacteria formando cuerpos de inclusión. Debido a esto, se procedió a su aislamiento y purificación, como se describió en el apartado 3.10.2 de Materiales y Métodos. En las **Figuras 4.14 y 4.15**, (carriles 1) se muestran los resultados del aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión a partir de *E. coli* (pQEHB1) y *E. coli* (pQEHB2).

Una vez aislados los cuerpos de inclusión, se solubilizaron con la solución desnaturante (S2) descrita anteriormente y se procedió a la purificación de las proteínas PHB1 y PHB2 mediante cromatografía de afinidad usando columnas de Níquel. Estas columnas retienen a las proteínas de interés gracias a su afinidad con las colas de histidina. Una vez realizados los lavados, se procedió a la elución con imidazol, sustancia análoga a la histidina, que desplaza la proteína ligada a la matriz de forma progresiva a medida que aumenta su concentración.

El resultado de la purificación por columna de Níquel se muestra en los carriles 3 de las **Figuras 4.14 y 4.15**. En ellas se observa que tanto PHB1 como PHB2 no se obtuvieron inicialmente en forma pura, debido a que se encontraban acompañadas con otras proteínas de la bacteria con afinidad al níquel, aun habiendo aumentando el número y volumen de los lavados, así como la concentración de imidazol en los mismos. Dado que el objetivo de la obtención de estas proteínas era la inmunización en animales de experimentación, para lo cual es necesario un nivel de purificación elevado, se decidió aislar las proteínas PHB1 y PHB2 a partir de los geles SDS-PAGE en los cuales fueron separados electroforéticamente tal y como se describió en la sección 3.4.12 de Materiales y Métodos. Las proteínas purificadas por este

método se muestran en los carriles 3 de las **Figuras 4.14 y 4.15**. Aunque la cantidad de proteína obtenida fue menor comparada con la proteína expresada, esta se encontraba muy pura.

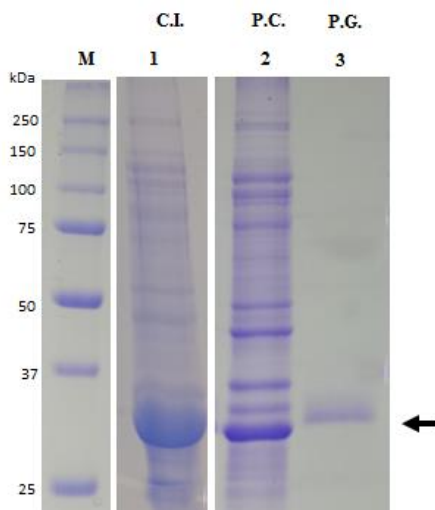


Figura 4.14. Purificación de la PHB1 de *T. cruzi* expresada en *E. coli*. M: marcador de peso molecular All blue (Bio-Rad); 1: C.I. cuerpos de inclusión; 2: P.C. producto de la elución en la purificación mediante columna de níquel; 3: P.G. producto de la elución de la purificación a partir de gel de poliacrilamida.

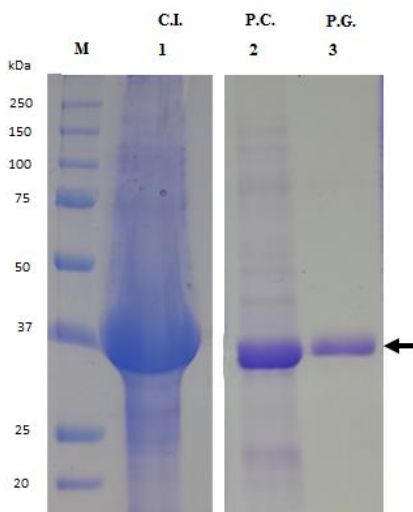


Figura 4.15. Purificación de la PHB2 de *T. cruzi* expresada en *E. coli*. M: marcador de peso molecular All blue (Bio-Rad); 1: C.I. cuerpos de inclusión; 2: P.C. producto de la elución en la purificación mediante columna de níquel; 3: P.G. producto de la elución de la purificación a partir de gel de poliacrilamida.

4.2 Inmunización, estudios de especificidad de los anticuerpos y estudios de expresión de las proteínas nativas

Tras la obtención de las proteínas recombinantes PHB1 y PHB2 de *T. cruzi*, se inmunizaron ratas y ratones para la obtención de anticuerpos policlonales frente a las proteínas de estudio. Dado el alto porcentaje de similitud de las PHBs entre los tripanosomátidos como se describió en el apartado 4.1.1 de este capítulo, se realizaron estudios de la especificidad con los inmunoseros obtenidos.

4.2.1 Inmunización de la PHBs en animales y titulación de los anticuerpos en los sueros obtenidos

Previo a la inmunización de los animales, las proteínas PHB1 y PHB2 fueron concentradas y solubilizadas en PBS mediante el uso de columnas concentradoras de Amicón (Merck). Después de cuantificar las proteínas PHB1 y PHB2 mediante el método de Bradford descrito en el apartado 3.9.1 de Materiales y Métodos, y para la obtención de anticuerpos policlonales se inmunizaron ratas con cada una de las proteínas recombinantes y ratones con la PHB2 siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.11 de Materiales y Métodos.

Mediante ELISA y utilizando como antígeno las proteínas recombinantes y como anticuerpo primario el suero de los animales inmunizados se procedió a la titulación de los anticuerpos. Se determinó un título de 1/6.500 para la anti-PHB1 obtenida en ratas, 1/17.000 para la anti-PHB2 obtenida en ratas y de 1/6.500 para la anti-PHB2 obtenida en ratones.

4.2.2 Estudio del patrón de reconocimiento antigénico de los anticuerpos policlonales obtenidos frente a PHB1 y PHB2

La especificidad de los anticuerpos obtenidos y la utilidad de los mismos para la detección de las PHBs nativas se comprobó mediante Western blot tras un SDS-PAGE. Para ello se enfrentaron extractos de proteínas totales de los estadios epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi* a los sueros obtenidos de las inmunizaciones.

En la **Figura 4.16** se muestra los resultados del patrón de reconocimiento antigénico de los diferentes inmunosueros obtenidos frente al proteinograma de los extractos de proteínas totales de las formas de epimastigotas. En el **panel A** se muestra el control de carga y en los **paneles B, C y D** los resultados de los Western blots. Los resultados mostraron que los sueros obtenidos a partir de las inmunizaciones en ratas (PHB1 y PHB2) y ratones (PHB2) reconocieron una única banda la cual corresponde a las PHBs nativas, lo cual indicó la alta especificidad de dichos sueros obtenidos. Esto nos permitió en ensayos posteriores la ubicación de las proteínas nativas en los experimentos de localización.

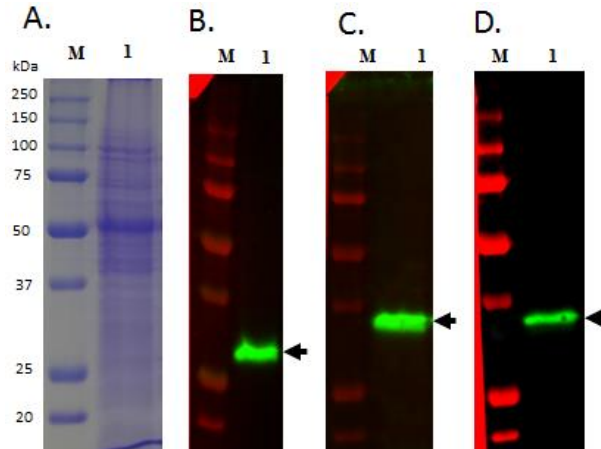


Figura 4.16. Estudio del patrón de reconocimiento antigénico con los anticuerpos obtenidos a partir de las PHBs recombinantes en los ensayos de inmunización. M: marcador de peso molecular All Blue (Bio-Rad); 1: proteínas totales de epimastigotes de la cepa DM28c. A. SDS-PAGE al 12% en el que se muestra los controles de carga; resultados de los Western blots utilizando como anticuerpo primario los sueros obtenidos a partir de las inmunizaciones con la PHB1 en ratas (panel B), a partir de las inmunizaciones con la PHB2 en ratones (panel C) y a partir de las inmunizaciones con la PHB2 en ratas (panel D).

4.2.3 Análisis de los niveles de expresión de las PHBs nativas en diferentes estadios del parásito

Seguidamente a la obtención de los inmunosueros y la comprobación del reconocimiento antigénico en las formas epimastigotas y tripomastigotas, se procedió a la detección de PHB1 y PHB2 en las diferentes formas del parásito. Para ello se obtuvieron extractos de proteínas totales de los estadios de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes, tras la cuantificación mediante el método de Bradford como se describió anteriormente en el apartado 3.9.1, 30 µg de proteína total se separaron mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12%. Tras la electroforesis se realizó la inmunotransferencia y detección de ambas proteínas con los inmunosueros obtenidos en las ratas inmunizadas.

En las **Figuras 4.17 y 4.18** se observan los resultados de los Western blots de la detección de la expresión de las PHBs nativas, como control de carga y expresión fue usada la tubulina para cada uno de los estadios del parásito. Como se observa, ambas proteínas mostraron una expresión diferente en cada estadio, siendo mayor la expresión en el estadio de epimastigotes que el resto de los estadios.

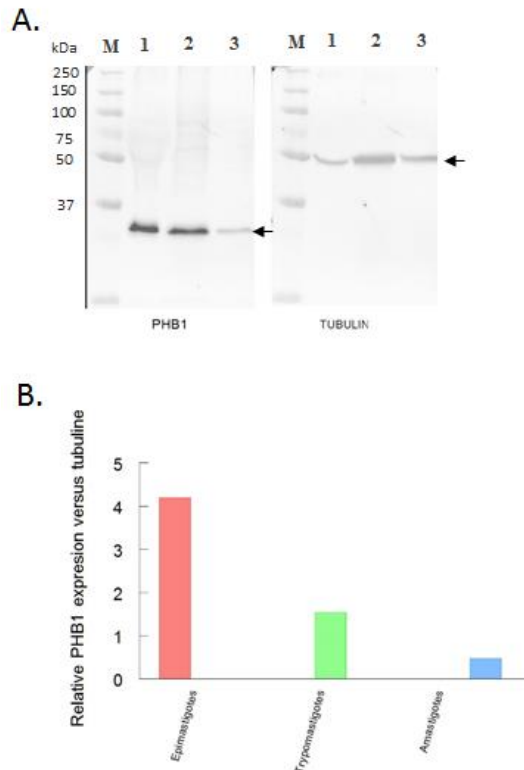


Figura 4.17. Expresión relativa de la PHB1 frente a la expresión de la tubulina en los tres estadios diferentes de *T. cruzi*. Valores de expresión se determinaron por densitometría del área de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blots del panel A. Los valores relativos versus la Tubulina se llevaron a cabo con las determinaciones densitométricas obtenidas (panel B). M: marcador de peso molecular All Blue (Bio-Rad); 1: proteínas totales de epimastigotes de la cepa DM28c 2: proteínas totales de tripomastigotes de la cepa DM28c. 3: proteínas totales de amastigotes de la cepa DM28c.

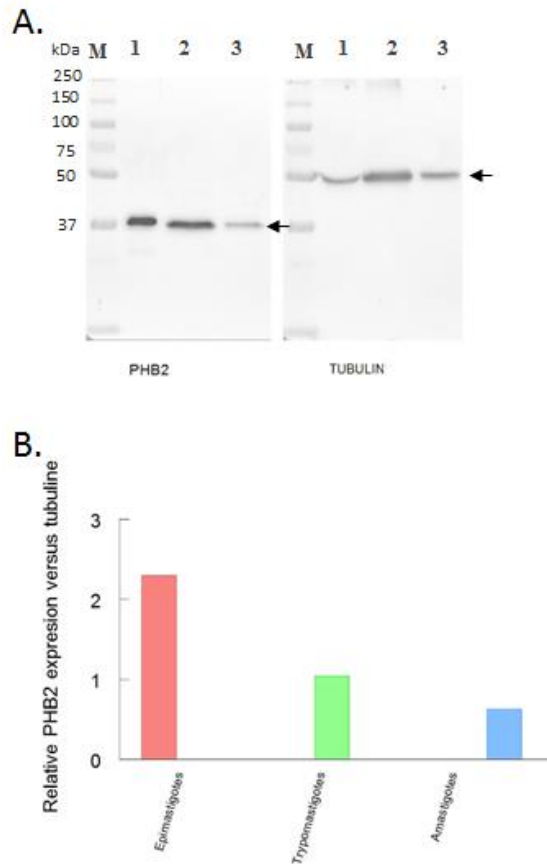


Figura 4.18. Expresión relativa de la PHB2 frente a la expresión de la tubulina en los tres estadios diferentes de *T. cruzi*. Los cálculos de expresión relativa (panel B) se realizaron a partir del área e intensidad de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blots del panel A. M: marcador de peso molecular All Blue (Bio-Rad); 1: proteínas totales de epimastigotes de la cepa DM28c 2: proteínas totales de tripomastigotes de la cepa DM28c. 3: proteínas totales de amastigotes de la cepa DM28c.

4.2.3 Estudio de la especificidad de los anticuerpos obtenidos, ensayo frente a diferentes especies

Como se ha indicado anteriormente las PHBs poseen porcentajes de identidad elevados entre los tripanosomátidos. Por este motivo, se determinó la especificidad de estos anticuerpos en comparación con otros tripanosomátidos. En este estudio se incluyó también como control un

extracto de proteína total procedente de células Vero para descartar una posible reacción cruzada con proteínas de mamíferos superiores, ya que como se ha visto en nuestros resultados comparten cerca del 50% de identidad.

Para ello se obtuvieron extractos de proteínas totales de los distintos organismos, que fueron procesadas como se ha ido describiendo en los apartados precedentes para la realización de la electroforesis y posterior transferencia e inmunodetección.

En las **Figuras 4.19 y 4.20** se muestran los patrones de reconocimiento antigénico de diferentes especies obtenidos en los Western blots frente a las PHB1 y PHB2, respectivamente. En la **Figura 4.19** se observa que el anticuerpo frente a la PHB1 no es específico de *T. cruzi*, ya que se observó reconocimiento de la proteína tanto en *T. brucei* y *L. major*, no obstante no se visualizó reacción cruzada con los extractos de proteínas totales en células Vero. En la **Figura 4.20** se observa que los sueros presentaron reacción cruzada con la PHB2 de *T. brucei*, pero no con la proteína de *L. major* o de células Vero.

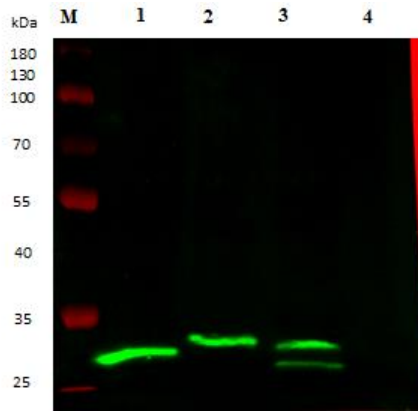


Figura 4.19. Especificidad de los sueros usados frente a la PHB1 de *T. cruzi*. Reconocimiento de la PHB1 en otros kinetoplastidos y células Vero con los sueros obtenidos frente a la PHB1 de *T. cruzi*. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); 1: proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi*; 2: proteínas totales de promastigotes de *L. major*; 3: proteínas totales de procíclicos de *T. brucei*; 4: proteínas totales de células Vero.

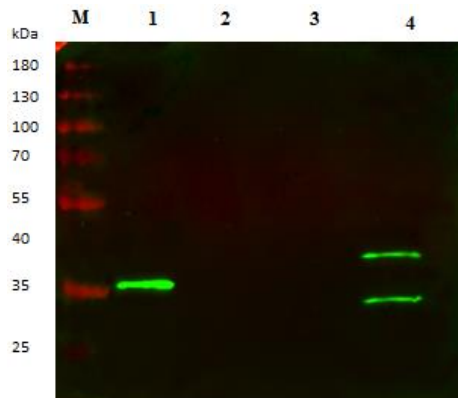


Figura 4.20. Especificidad de los sueros usados frente a la PHB2 de *T. cruzi*. Reconocimiento de la PHB2 en otros tripanosomátidos y en células Vero. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); 1: proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi*; 2: proteínas totales de promastigotes de *L. major*; 3: proteínas totales de células Vero; 4: proteínas totales de formas procíclicas de *T. brucei*.

4.2.3 Análisis de los niveles de expresión de las PHBs nativas en las diferentes unidades discretas de tipificación (DTUs) del parásito

Como se describió en Introducción, *T. cruzi* se divide en seis linajes o Unidades Discretas de Tipificación (DTUs), denominados TcI a TcVI. Con objeto de obtener información sobre la expresión de las PHB1 y PHB2 en los diferentes DTUs de *T. cruzi*, se partió del proteinograma generado tras la electroforesis en SDS-PAGE al 12% de 30 µg de proteína total de las formas epimastigotas de cada una de las DTUs. Tras la electroforesis, como en el caso anterior, se realizó la inmunotransferencia y detección de ambas proteínas con los inmunosueros obtenidos para cada una de las PHBs objeto de estudio.

En las **Figuras 4.21 y 4.22** se observan los resultados de los Western blots de la detección de la expresión de las PHBs y de la tubulina en los diferentes DTUs del parásito (**paneles A**), la expresión relativa respecto a la tubulina aparece representado en el **panel B**. Como se observa las PHB1 endógenas (**Figuras 4.21**), no muestran diferencias significativas en la expresión de esta proteína en los diferentes DTUs, si bien se obtuvo una mayor expresión en la cepa Y. Para la PHB2 se observa una diferencia significativa entre la expresión de la PHB2 nativa en la cepa Y (DTU II) con respecto al resto de DTUs. De igual manera se observó una diferencia significativa en la expresión de esta proteína en la cepa DM28c comparándola con la cepa la TcIV.

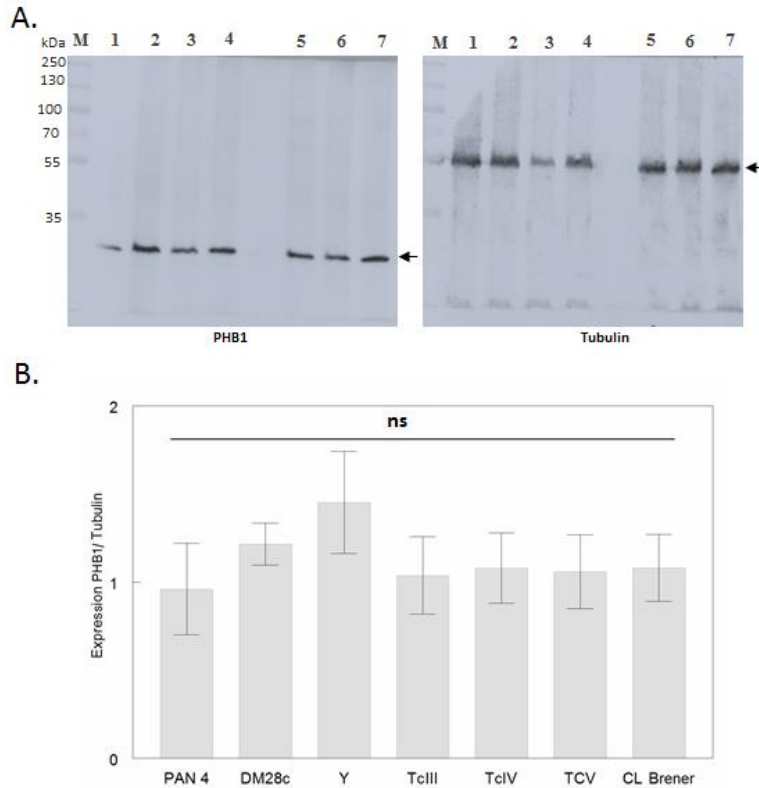


Figura 4.21. Expresión relativa de la PHB1 frente a la expresión de la tubulina en los diferentes DTUs de *T. cruzi*. Valores de expresión se determinaron por densitometría del área de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blots del panel A. Los valores relativos versus la Tubulina se llevaron a cabo con las determinaciones densitométricas obtenidas (panel B). M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); proteínas totales de: 1: epimastigotes de la cepa PAN4 (TcI); 2: epimastigotes de la cepa DM28c (TcI); 3: epimastigotes de la cepa Y (TcII); 4: epimastigotes de la cepa TcIII Clon A3663, 5: epimastigotes de la cepa TcIV Clon 4167; 6: epimastigotes de la cepa TcV; 7: epimastigotes de la cepa CL Brener. Al utilizar, el test de Tukey $p < 0.05$ no se observaron diferencias significativas entre las diferentes líneas celulares (ns).

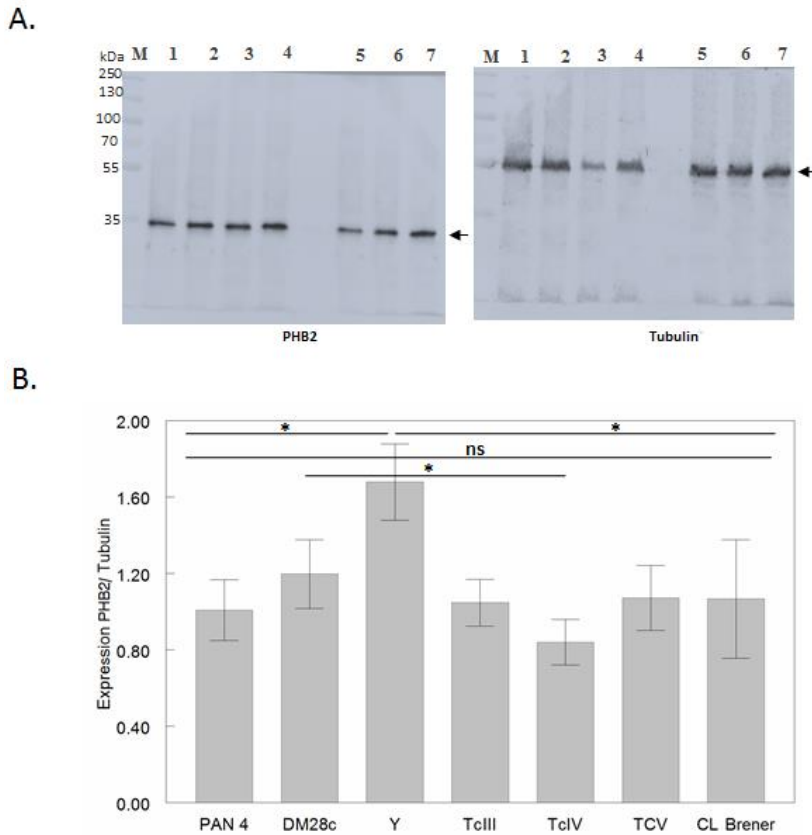


Figura 4.22. Expresión relativa de la PHB2 frente a la expresión de la tubulina en los diferentes DTUs de *T. cruzi*. Valores de expresión se determinaron por densitometría del área de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blots del panel A. Los valores relativos versus la Tubulina se llevaron a cabo con las determinaciones densitométricas obtenidas (panel B). M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); Proteínas totales de: 1: epimastigotes de la cepa PAN4 (TcI); 2: epimastigotes de la cepa DM28c (TcI); 3: epimastigotes de la cepa Y (TcII); 4: epimastigotes de la cepa TcIII Clon A3663, 5: epimastigotes de la cepa TcIV Clon 4167; 6: epimastigotes de la cepa TcV; 7: epimastigotes de la cepa CL Brener. Al utilizar, el test de Tukey $p < 0.05$ se observaron diferencias significativas solo entre algunas líneas celulares (*).

4.3 Estudios de la expresión génica mediante RT-qPCR

Con objeto de complementar la información obtenida sobre la expresión de las PHBs a nivel de proteína, se realizaron estudios de la expresión génica de

los genes *phb1* y *phb2* mediante la técnica RT-qPCR usando la amplificación del ADN complementario (ADNc).

4.3.1 Evaluación de la calidad del ARN

Tras la extracción de ARNm a partir de células en los estadios de epimastigotes y tripomastigotes y posterior síntesis de ADNc tal y como se describió en el apartado 3.6 se realizó una PCR con los cebadores PHB1pQE30F y PHB1pQE30R. El resultado de la amplificación se muestra en la **Figura 4.23**. Tal y como se observa en la figura el tamaño del amplicón fue de 836 pb que concordó con el tamaño esperado. No se visualizó ningún amplicón en los carriles 3 y 7, corroborando que las muestras que se utilizaron para obtener el ADNc no se encontraban contaminadas con ADNg.

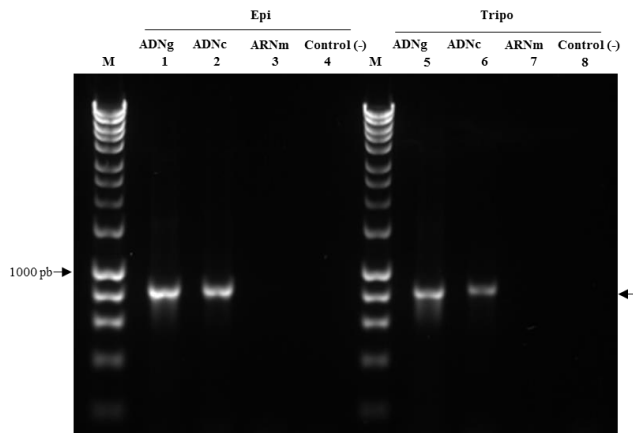


Figura 4.23 Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los amplicones *phb1* a partir de ADNc de los estadios de epimastigotes y amastigotes. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline), 1 y 5: amplificación de la *phb1* a partir de ADNg (control positivo); 2 y 6: amplificación a partir de ADNc; 3 y 7: amplificación a partir de la extracción de ARNm; 4 y 8: control negativo de la PCR.

4.3.2 Estudio de la expresión génica

Tras la obtención del ADNc, se realizó una RT-qPCR con los cebadores PHB1RealtimeF y PHB1RealtimeR para cuantificar la expresión del gen *phb1*, PHB2RealtimeF y PHB2RealtimeR para el gen *phb2* y GAPDHF y GAPDH para el gen *gapdh* (tabla 3.3). Los cebadores se diseñaron para la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 200 pb. Las RT-qPCRs se realizaron con el *Evagreen Supermix de SsoFast kit* (Bio-Rad) y usando las condiciones descritas en la **Tabla 3.5**.

En la **Figura 4.24** se muestra el resultado del análisis de la PCR en tiempo real (RT-qPCR) en los estadios de epimastigotes y tripomastigotes; la cuantificación relativa se obtuvo normalizando los niveles de expresión de los genes *phb1* y *phb2* de *T. cruzi* frente a la expresión del gen *gapdh* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) en cada estadio. Se observaron niveles similares de expresión de los genes *phb1* y *phb2* dentro de un mismo estadio, pero comparando los estadios se observó una expresión aproximadamente tres veces mayor en las formas epimastigotas que en las tripomastigotas.

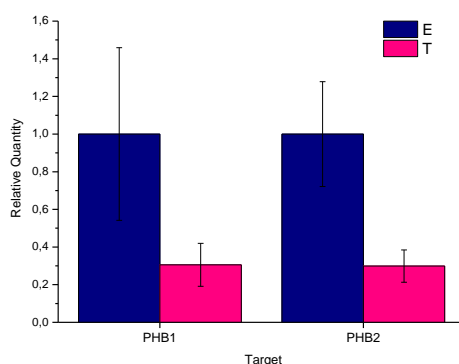


Figura 4.24. Cuantificación relativa de la expresión de los genes *phb1* y *phb2* de *T. cruzi* mediante RT-qPCR en los estadios de epimastigotes (E) y tripomastigotes (T). Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión del gen *gapdh* en cada estadio.

4.4 Inmunolocalización de las PHBs nativas

Debido a que dentro de la familia Trypanosomatidae la localización de las PHBs se las describió con diferentes localizaciones nos planteamos el estudio de dichas proteínas en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

4.4.1 Inmunolocalización mediante microscopía láser confocal

Con objeto de estudiar la localización de PHB1 y PHB2 nativas, realizamos estudios de inmunofluorescencia en los estadios de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes. Como se describió en el apartado 3.14.1 de Materiales y Métodos, se utilizó Mito Tracker Red como marcador mitocondrial y los anticuerpos frente a las PHB1 y PHB2 obtenidos tras las inmunizaciones en ratas a las diluciones 1/100 y 1/250 respectivamente, los cuales son capaces de reconocer a las proteínas en todas las formas del parásito (**Figuras 4.17 y 4.18**). En estos estudios se usaron dos controles, el primero donde se utilizó como anticuerpo primario el suero pre-inmune de los animales en los que se obtuvieron los inmunosueros y el segundo donde se usó sólo anticuerpo secundario a fin de que no hubiese reacciones inespecíficas del mismo.

En la **Figura 4.25**, se muestra la localización de las PHBs nativas en el estadio de epimastigotas. La PHB1 en esta fase del parásito se observó agrupada cerca del kinetoplasto, el núcleo y el polo aflagelar. La PHB2 mostró una distribución similar a la PHB1, pero de forma más agregada. La localización de las PHBs por debajo del kinetoplasto en algunos epimastigotes parece estar colocalizado en la bolsa flagelar. Asimismo ambas PHBs se observaron en regiones que colocalizan con la mitocondria (color amarillo en el MERGE).

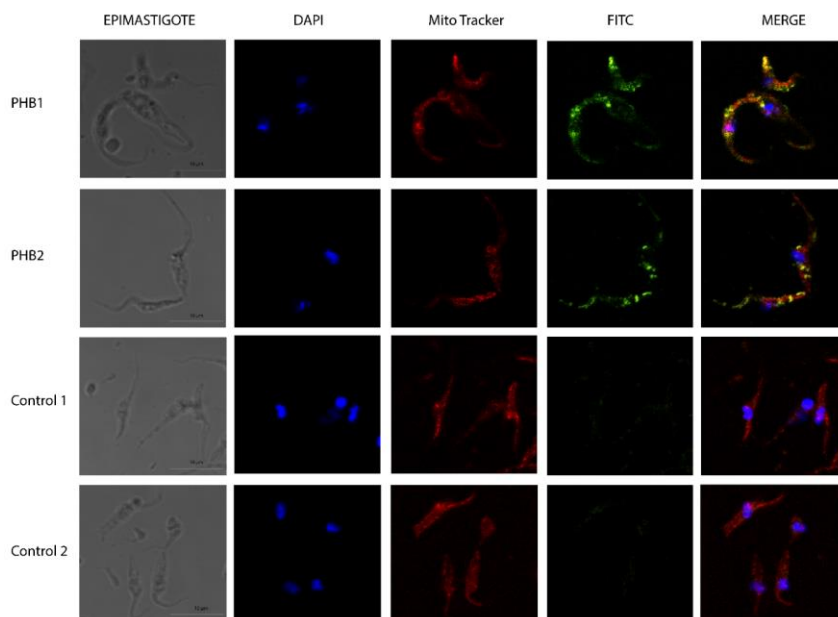


Figura 4.25. Inmunolocalización de las PHBs mediante microscopia láser confocal en el estadio de epimastigotes. En azul se observa el ADN marcado con DAPI, en rojo se observa la mitocondria y en verde las PHB1 y PHB2 detectadas con anticuerpo secundario conjugado a FITC. En MERGE se observa el solapamiento del canal verde, rojo y azul. Control 1: suero pre-inmune como anticuerpo primario; Control 2: control usando solo el anticuerpo secundario.

En la **Figura 4.26**, se muestra la localización de las PHBs nativas en el estadio de Tripomastigotes. Tanto la PHB1 como la PHB2 se las observa en esta fase de forma continua rodeando la superficie del parásito, visualizando algunos acumulos en la bolsa flagelar, que al igual que en los epimastigotes pudiera ser el aparato de Golgi. En la **Figura 4.27** se muestra la localización de las proteínas nativas en las formas amastigotas. En este estadio las proteínas PHB1 y PHB2 se observaron distribuidas uniformemente en la superficie del parásito, distribución similar a las que se observó en las formas de tripomastigotas procedentes de cultivos celulares.

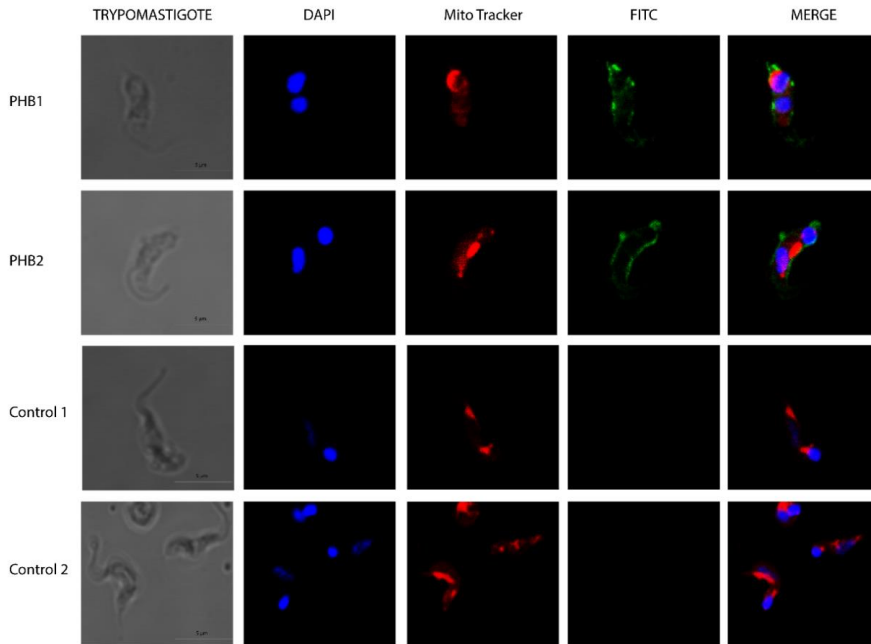


Figura 4.26. Immunolocalización de las PHBs mediante microscopía láser confocal en el estadio de tripomastigotes. En azul se observa el ADN marcado con DAPI, en rojo se observa la mitocondria y en verde las PHB1 y PHB2 detectadas con anticuerpo secundario conjugado a FITC. En MERGE se observa el solapamiento del canal verde, rojo y azul. Control 1: suero pre-inmune como anticuerpo primario; Control 2: control usando solo el anticuerpo secundario.

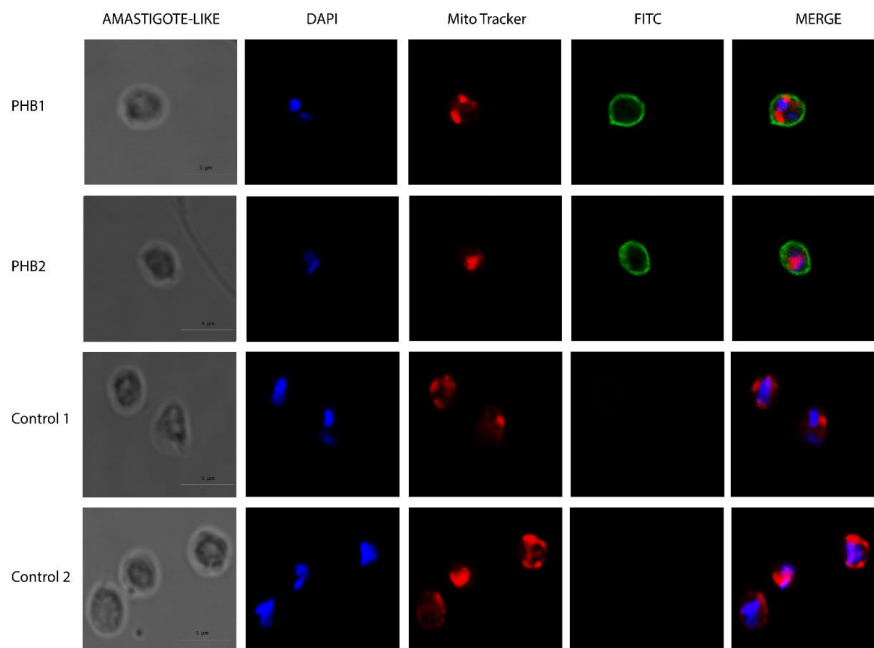


Figura 4.27. Immunolocalización de las PHBs mediante microscopía láser confocal en el estadio de amastigotes. En azul se observa el ADN marcado con DAPI, en rojo se observa la mitocondria y en verde las PHB1 y PHB2 detectadas con anticuerpo secundario conjugado a FITC. En MERGE se observa el solapamiento del canal verde, rojo y azul. Control 1: suero pre-inmune como anticuerpo primario; Control 2: control usando solo el anticuerpo secundario.

4.4.2 Immunolocalización de PHB1 y PHB2 mediante microscopía electrónica de transmisión

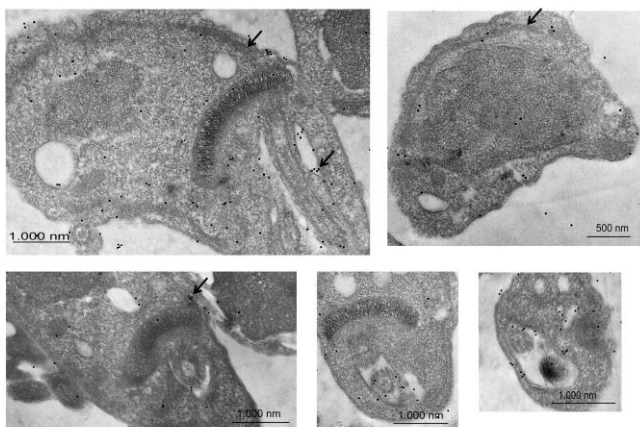
Con objeto de complementar la información obtenida mediante microscopía láser confocal, se realizaron estudios de la localización subcelular de las proteínas de interés mediante estudios de inmunolocalización por microscopía electrónica de transmisión.

Tras la fijación de los parásitos tal y como se describe en apartado 3.14.2 de Materiales y Métodos y ser embebidas en la resina LR-White, fueron seccionadas y preparadas para TEM. Como anticuerpos primarios se utilizaron los sueros obtenidos tras las inmunizaciones a unas diluciones de

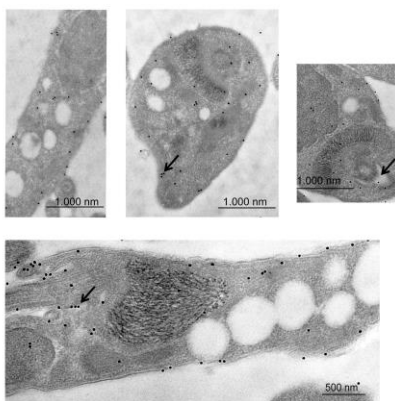
1/100 para los sueros anti-PHB1 obtenidos en ratas, 1/100 para los sueros anti-PHB2 obtenidos en ratones y 1/250 para los sueros anti-PHB2 obtenidos en ratas. Los anticuerpos secundarios se encontraban conjugados con oro coloidal de 10 nm y/o 18 nm. Antes de la visualización al microscopio electrónico de transmisión las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo de Reynolds.

En resultado de la localización de las proteínas PHB1 y PHB2 en las formas epimastigotas se muestra en la **Figura 4.28**. La proteína PHB1 se la observó principalmente confinada en la bolsa flagelar, la mitocondria y agrupada cerca del kinetoplasto. La PHB2 presentó una distribución similar, pero también se la observó en algunas zonas de la superficie del parásito. Estos resultados concuerdan y complementan a los obtenidos mediante inmunofluorescencia confocal.

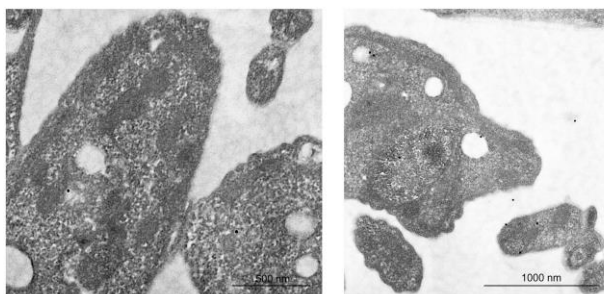
PHB1



PHB2



Control 1



Control 2

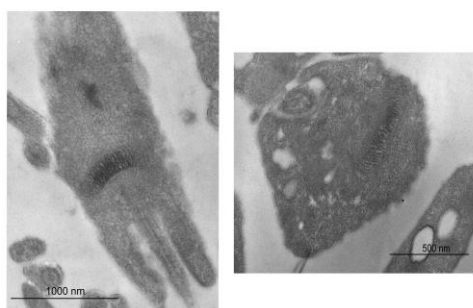
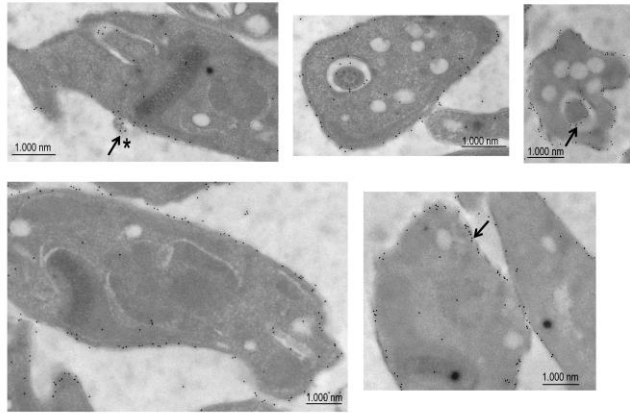


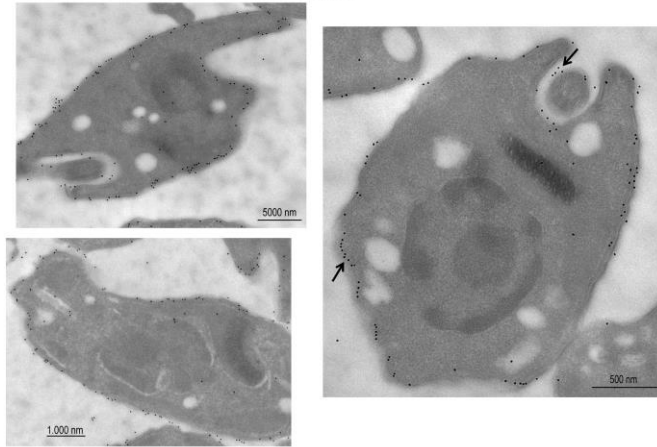
Figura 4.28. Inmunolocalización de las PHBs mediante microscopía electrónica de transmisión en el estadio de epimastigotes. Las PHB1 y PHB2 de *T. cruzi* fueron detectadas con los inmunosueros obtenidos frente a dichas proteínas en ratas y el anticuerpo secundario anti rata conjugado con oro coloidal de 18 nm. F: flagelo; N: núcleo; FP: bolsa del flagelo; M: mitocondria; K: kinetoplasto.

Las **Figuras 4.29 y 4.30** muestran la localización de las PHBs en los estadios de tripomastigotes. En la **Figura 4.29** se muestra individualmente a cada una de las PHBs distribuidas a lo largo del cuerpo celular y bolsa flagelar. Mientras que en la **Figura 4.30** se muestra la localización conjunta de la PHB1 y la PHB2 al ser localizadas con anticuerpos de diferentes orígenes y tamaños de partículas, se observan como las PHB1 y PHB2 se distribuyen a lo largo de la membrana citoplasmática y de la bolsa flagelar una al lado de otra (indicado por flechas de diferentes colores). Además con un * se señala la presencia de estas proteínas en exovesículas generadas desde la membrana citoplasmática del parásito semejante a lo descrito en *Leishmania major* (161).

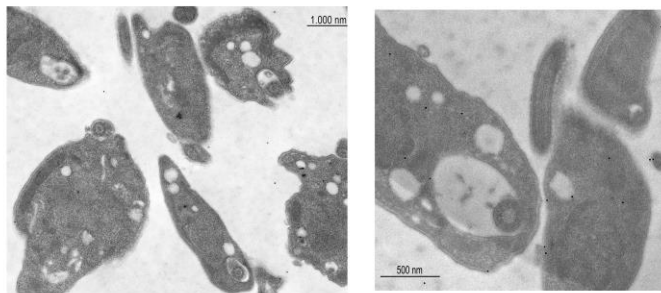
PHB1



PHB2



Control 1



Control 2

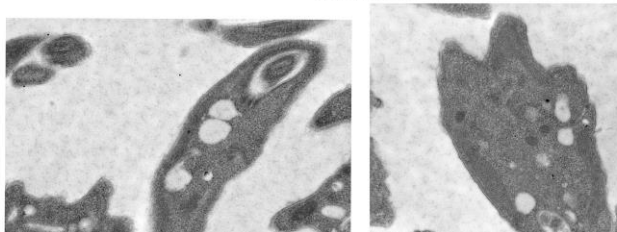


Figura 4.29. Inmunolocalización de las PHBs mediante microscopía electrónica de transmisión en el estadio de tripomastigotes. Las PHB1 y PHB2 de *T. cruzi* fueron detectados con los inmunoseros obtenidos y el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 18 nm. F: flagelo; N: núcleo; FP: bolsa flagelar; M: mitocondria; K: kinetoplasto.

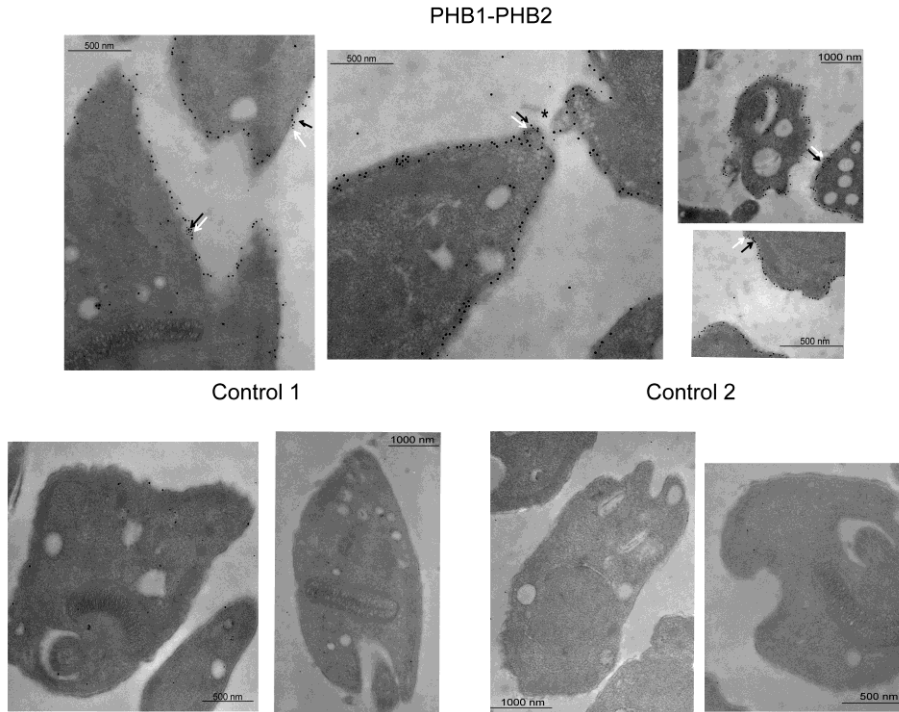


Figura 4.30. Inmunolocalización conjunta de la PHB1 y la PHB2 mediante microscopía electrónica de transmisión en el estadio de tripomastigotes. Las PHBs de *T. cruzi* detectadas con los inmunoseros obtenidos y los anticuerpos secundarios se encontraron conjugados a oro coloidal de 18 nm para la PHB1 (flechas negras) y de 10 nm para la PHB2 (flechas blancas). F: flagelo; N: núcleo; FP: bolsa flagelar; M: mitocondria; K: kinetoplasto; *: exovesículas (EVs) secretadas.

4.5 Localización de las PHBs en exovesículas

Con objeto de corroborar la localización de las PHBs en exovesículas observadas en las **Figuras 4.29 y 4.30** del apartado 4.4 de este capítulo y en colaboración con mi compañera de grupo de trabajo Lissette Retana Moreira cuya Tesis Doctoral versa sobre la biología de los exosomas de *T. cruzi*, y tras el aislamiento de las exovesículas (EVs) y la obtención por separado de

ectosomas y exosomas a partir de las formas epimastigotas y tripomastigotas de diferentes cepas, las muestras fueron concentradas y purificadas para la realización de los ensayos por Western blots.

En las **Figuras 4.31 y 4.32** se muestran los patrones de reconocimiento antigénico obtenidos tras la realización de los Western blots enfrentando los lisados de exosomas y ectosomas tanto de las formas epimastigotas como tripomastigotas de las cepas CL Brener, DM28c y PAN4 de *T. cruzi* con los anticuerpos primarios anti-PHB1 y anti-PHB2. En la **Figura 4.31** se observa la detección de la PHB1 con un tamaño de ~31 kDa en todas las cepas ensayadas tanto en ectosomas como en exosomas. Sin embargo, la PHB2 se detectó solo en el carril que contenía las proteínas totales de exosomas provenientes de la cepa PAN4 con un tamaño de ~33 kDa (**Figura 4.32**) y en los carriles que contenían las muestras de proteínas totales de los ectosomas de todas las cepas ensayadas.

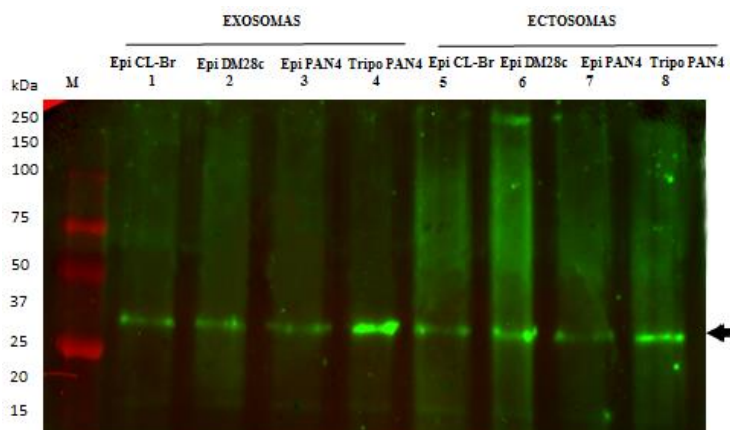


Figura 4.31. Estudio del reconocimiento de la PHB1 en exosomas y ectosomas de las cepas CL Brener, DM28c y PAN4 de *T. cruzi*. M: marcador de peso molecular All Blue (Bio-Rad); 1: exosomas de epimastigotes de la cepa CL Brener; 2: exosomas de epimastigotes de la cepa DM28c; 3: exosomas de epimastigotes de la cepa PAN4; 4: exosomas de tripomastigotes de la cepa PAN4; 5: ectosomas de epimastigotes de la cepa CL Brener; 6: ectosomas de epimastigotes de la cepa DM28c; 7: ectosomas de epimastigotes de la cepa PAN4; 8: ectosomas de tripomastigotes de la cepa PAN4.

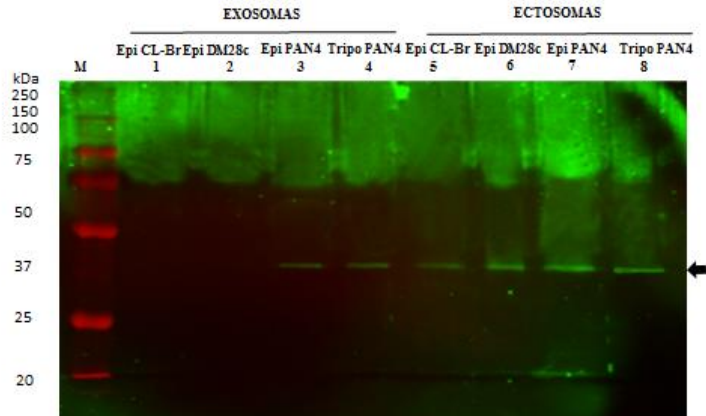


Figura 4.32. Estudio del reconocimiento de la PHB2 con el suero anti-PHB2 en exosomas y ectosomas de las cepas CL Brener, DM28c y PAN4 de *T. cruzi*. M: marcador de peso molecular All Blue (Bio-Rad); 1: exosomas de epimastigotes de la cepa CL Brener; 2: exosomas de epimastigotes de la cepa DM28c; 3: exosomas de epimastigotes de la cepa PAN4; 4: exosomas de tripomastigotes de la cepa PAN4; 5: ectosomas de epimastigotes de la cepa CL Brener; 6: ectosomas de epimastigotes de la cepa DM28c; 7: ectosomas de epimastigotes de la cepa PAN4; 8: ectosomas de tripomastigotes de la cepa PAN4.

4.6 Ensayos de unión de las PHBs a Fe^{3+}

Nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente como las PHBs de *L. major* poseen la capacidad de unirse a Fe^{3+} (161). En el análisis bioinformático del apartado 4.1.1 se predijo un sitio de unión a Fe^{3+} para la PHB1 de *T. cruzi* con el programa IonCom y dos posibles sitios de unión con el programa Galaxy para la PHB2 de *T. cruzi*. A fin de corroborar si las PHBs de *T. cruzi* poseen la misma capacidad de unión que las de *L. major* se realizaron una serie de ensayos de purificación de las proteínas que se unen a Fe^{3+} mediante cromatografías de afinidad, así como al estudiar los niveles de expresión de las PHBs en presencia del ion Fe^{3+} añadiendo a los cultivos de epimastigotes diferentes concentraciones de citrato de amonio férrico para determinar si la expresión de las PHBs de *T. cruzi* son dependientes de la concentración de Fe^{3+} disponible en el medio de cultivo.

4.6.1 Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados

Para la realización de la cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) fue necesaria la preparación de la columna tal y como se describe en Material y Métodos 3.6.1. A partir de una columna HiTrap (GE Healthcare) precargada con sefarosa unida a Ni el cual se sustituyó el Ni por Fe^{3+} . Una vez preparada se llevó a cabo la cromatografía empleando como fase de disociación de las proteínas procedentes del lisado total de la cepa DM28c, concentraciones crecientes de una solución de EDTA al objeto de secuestrar el metal unido a las PHBs y así eluirlas de la columna.

En las **Figuras 4.33 y 4.34** se muestran los resultados de la elución tras la cromatografía de afinidad empleando iones Fe^{3+} en la fase inmovilizada, y su reconocimiento mediante un Western blot. En las diferentes calles de la electroforesis se corrieron el lisado total de los flagelados, las muestras resultantes de la elución tras la cromatografía de afinidad a diferentes concentraciones del tampón de elución y finalmente las eluciones finales de la cromatografía. En las dos Figuras se observaron resultados similares, se detectó la presencia de las PHBs en las muestras del lisado de los protozoos, después de ser cromatografiadas, en la primera elución correspondiente a los lavados sin el tampón de elución, debido a que la proteína se encontraba en exceso en comparación con su capacidad de unión de la columna y en las dos eluciones, comprobándose de esta forma su presencia y la capacidad de unión al Fe^{3+} por parte de las PHB1 y PHB2 de *T. cruzi*.

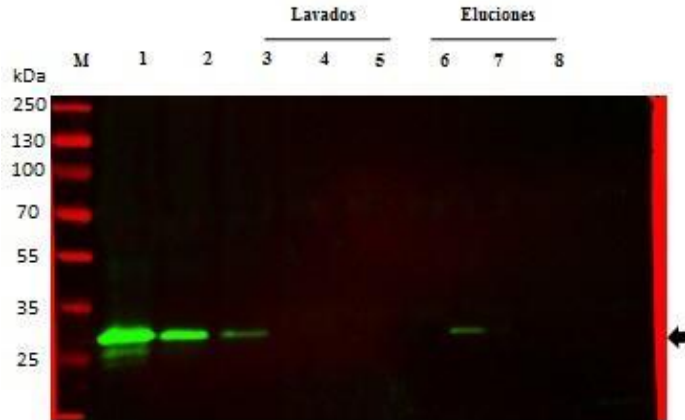


Figura 4.33. Detección mediante Western blot de la PHB1 tras la cromatografía de afinidad en sefarosa ligada a iones Fe^{3+} inmobilizados. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); detección de la PHB1 en las siguientes muestras 1: proteínas totales en el lisado de epimastigotes de la cepa DM28c; 2: proteínas totales de epimastigotes tras el paso por la columna de afinidad; 3: lavado 1; 4: lavado 2; 5: lavado 3; 6: elución 1; 7: elución 2; 8: elución 3.

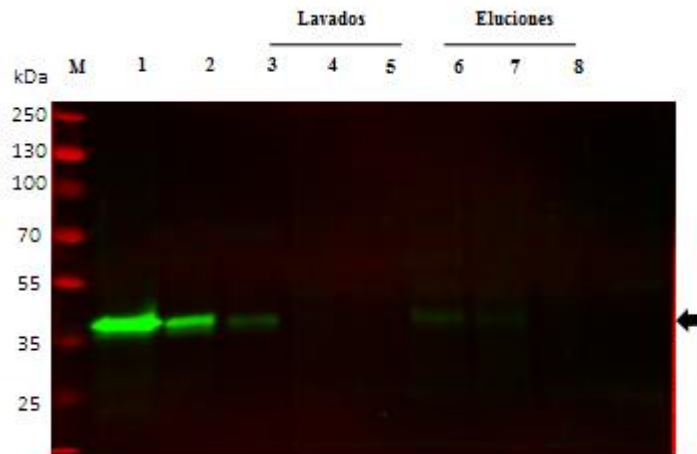


Figura 4.34. Detección mediante Western blot de la PHB2 tras la cromatografía de afinidad en *sefarosa* ligada a iones Fe^{3+} metálicos inmobilizados. M: Marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); detección de la PHB1 en las siguientes muestras 1: proteínas totales en el lisado de epimastigotes de la cepa DM28c; 2: proteínas totales de epimastigotes tras el paso por la columna de afinidad; 3: lavado 1; 4: lavado 2; 5: lavado 3; 6: elución 1; 7: elución 2; 8: elución 3.

4.5.2 Expresión de las proteínas PHB1 y PHB2 en cultivos de parásitos en presencia de citrato de amonio férrico

Cultivos en medio LIT de formas epimastigotas de la cepa DM28c les fue adicionado concentraciones crecientes (0 a 500 μM) de citrato férrico de amónico durante 24 h. Trascurrido lo cual los parásitos fueron concentrados por centrifugación y lisados como se ha descrito en Material y Métodos. Los lisados fueron procesados para una electroforesis en SDS-PAGE y posterior transferencia a membranas de inmunotransferencia como se describió en el apartado 3.9.4, tras lo cual se analizaron las PHBs mediante inmunoblots utilizando los sueros anti-PHB1 y anti-PHB2, como control de carga se determinó la tubulina mediante un anticuerpos específico como ya ha sido descrito.

En las **Figuras 4.35 y 4.36** se muestran los resultados de los inmunoblots. En el **panel A** se muestra la detección de las PHBs y de la tubulina de las formas epimastigotas cultivadas con las diferentes concentraciones de citrato de amonio férrico; en el **panel B** se muestra la cuantificación de la expresión relativa de las PHBs con respecto a la tubulina.

Los resultados muestran cómo la expresión de la PHB1 y la PHB2 se ve afectada por la presencia de iones Fe^{3+} . Así la PHB1 mostró un aumento significativo de la expresión a la concentración de 25 μM de la sal férrica. Concentraciones superiores no parecen mostrar un aumento significativo respecto al cultivo control. Mientras que la expresión de la PHB2 (**Figura 4.36**) mostró una expresión creciente en función de las concentraciones crecientes del ion Fe^{3+} obteniéndose el máximo a la concentración de 250 μM de citrato de amonio férrico. La concentración más elevada disminuyó la expresión de dicha proteína.

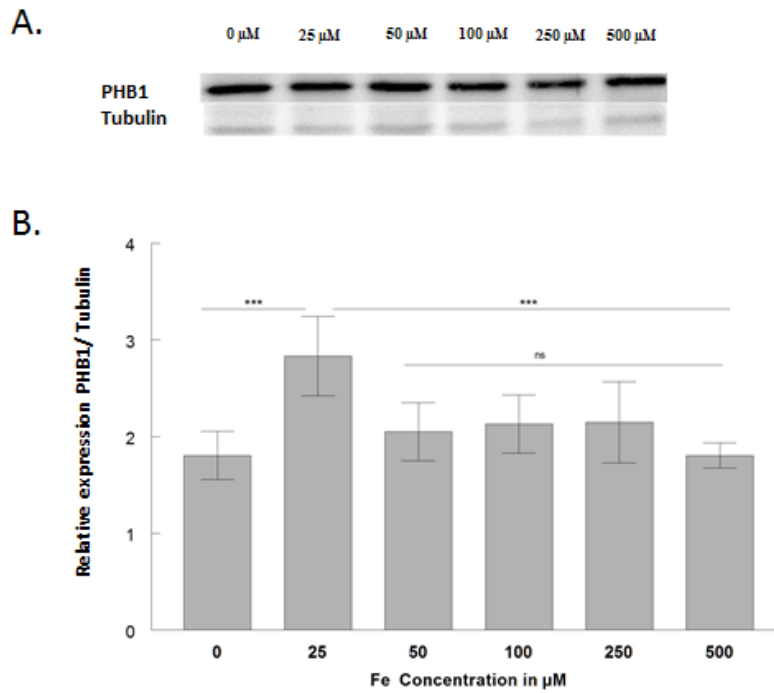


Figura 4.35. Expresión relativa de la PHB1 respecto a la expresión de la tubulina en presencia de diferentes concentraciones de citrato férrico de amónico (0 a 500 μM). Los cálculos de expresión relativa (panel B) se realizaron a partir del valor obtenido del densitograma de cada una de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blots del panel A respecto al valor obtenido para cada uno de los cultivos de la tubulina.

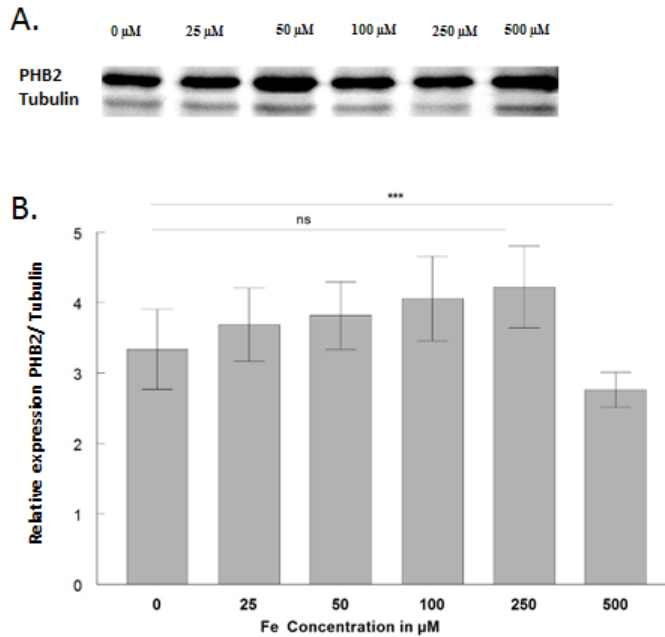


Figura 4.36. Expresión relativa de la PHB2 respecto a la expresión de la tubulina en presencia de diferentes concentraciones de citrato férrico de amónico (0 a 500 μM). Los cálculos de expresión relativa (panel B) se realizaron a partir del valor obtenido del densitograma de cada una de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blots del panel A respecto al valor obtenido para cada uno de los cultivos de la tubulina.

4.7 Estudios de la sobreexpresión de las PHB1 y PHB2 en *T. cruzi*

Con el objeto de determinar el papel que juegan las PHB1 y PHB2 en la biología de *T. cruzi* se ensayó la sobreexpresión de dichas proteínas. Para ello, tal y como se describe en Material y Métodos, 3.1.3.4. Las proteínas fueron clonadas en el vector pTREXn, el cual se integra al genoma debido a la presencia de un fragmento de ADN ribosomal de 800 pb aguas arriba del sitio de clonación múltiple, dicho vector fue modificado por Alonso, V. et al. (2014) (171) el cual introdujo a este vector el marcador TAPtag de ~21 kDa, que permite la purificación por afinidad en tándem habiendo ya sido usado en otros tripanosomátidos (186–191).

Entre las ventajas que posee dicho *tag* se encuentran el poseer un tamaño inferior a la proteína verde fluorescente GFP, normalmente utilizado como proteína de fusión en los experimentos de sobreexpresión. Lo que permite por una parte el reconocimiento de la proteína de fusión, además de facilitar la purificación en tándem por afinidad con columnas de IgG y de calmodulina.

4.7.1 Clonación de los genes *phbs* en el vector de expresión pTREX-TAPtag-GW

Con el propósito de llevar a cabo la sobreexpresión de las PHB1 y PHB2 de *T. cruzi* se procedió a la clonación de los genes de interés. Como se describió anteriormente, se partió de ADNc obtenido a partir de las formas epimastigotes. La amplificación por PCR de los genes *phbs* de *T. cruzi* se llevó a cabo con los cebadores PHB1TAPtagF y PHB1TAPtagR para el gen *phb1* y con los cebadores PHB2TAPtagF y PHB2TAPtagR para el gen *phb2*. Ambos cebadores F presentaron en su extremo 5' un sitio de restricción para el enzima de restricción *Bam*HI. De igual manera los cebadores R presentaron un sitio de restricción para *Xho*I. Tras la amplificación por PCR de la región comprendida entre los cebadores F y R que amplificaron al gen completo a excepción del codón de parada, los fragmentos de ADN se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I como se describió en el apartado 3.7.2 de Materiales y Métodos. Posteriormente se purificó con el kit de Purificación de productos de PCR para la eliminación de los extremos libres digeridos ligándose los fragmentos de ADN al vector pENTR 3C (previamente digerido con las mismas enzimas). El producto de ligación se usó para transformar la cepa DH5 α de *E. coli*.

En la **Figura 4.37** se muestran los resultados del rastreo de los clones positivos para los genes *phbs*. El gen *phb1* amplificado con los cebadores PHB1TAPtagF y PHB1TAPtagR, se observó en 1 de los 4 clones rastreados. Este clon mostró una única banda de amplificación de 828 pb, que

correspondió al tamaño esperado. Asimismo, el gen *phb2* amplificado con los cebadores PHB2TAPtagF y PHB2TAPtagR, fue detectado en 3 clones de los 4 rastreados, obteniéndose una única banda de 930 pb tal y como se esperaba.

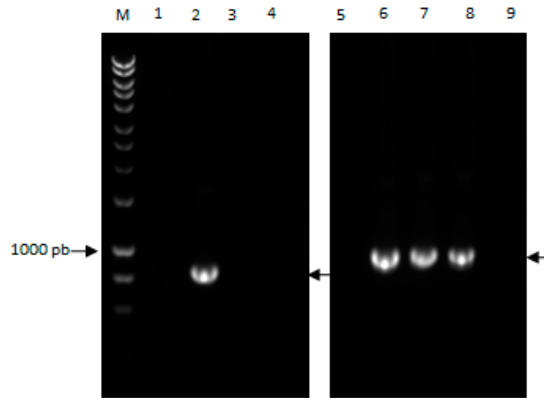


Figura 4.37. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los amplicones obtenidos en el rastreo de los clones positivos amplificados con los cebadores PHB1TAPtagF y PHB1TAPtagR para el gen *phb1* y los cebadores PHB2TAPtagF y PHB2TAPtagR para el gen *phb2*. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); 1 al 4: diferentes clones provenientes de la transformación con el plásmido pTAPHB1; 5 al 8: diferentes clones provenientes de la transformación con el plásmido pTAPHB2; 9: control negativo de la PCR.

Una vez obtenidos los clones de entrada a los cuales les denominamos pENHB1 (fusión del vector pENTR3C y el gen *phb1*) y pENHB2 (fusión del vector pENTR3C y el gen *phb2*), se procedió a la reacción de la LR Clonasa con el vector pTREX-TAPtag-GW. Para esta reacción, como se ya se ha indicado en el apartado 3.7.8 de Materiales y Métodos se mezclaron la enzimas Gateway LR Clonasa II (Invitrogen) que cataliza la recombinación *in vitro* de los clones de entrada pENHB1/ pENHB2 (que contienen el gen de interés flanqueado por sitios attL) y el vector de destino pTREX-TAPtag-GW (que contiene sitios attR) para generar clones de expresión (attL + attR = attB) como se visualiza en la **Figura 3.7** de Materiales y Métodos. Con el producto de estas reacciones se transformaron en células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli*, obteniendo como resultado las cepas *E. coli* pTAPHB1 (fusión del vector pTREX-TAPtag-GW y el gen *phb1*) y *E. coli* pTAPHB2 (fusión del

vector pTREX-TAPtag-GW y el gen *phb2*); mas el subproducto de la reacción del vector pENTR3C fusionado al gen *cddb*. Este subproducto no debió crecer, debido a que el gen *cddb* interfiere con la actividad de la ADN girasa, induciéndola a formar un complejo covalente con el ADN, promoviendo así la rotura del plásmido.

En las **Figuras 4.38 y 4.39** se muestran los resultados del rastreo de algunos clones para los genes *phb1* y *phb2*, respectivamente. Tras el rastreo de 20 clones para el gen *phb1*, usando los cebadores PHB1TAPtagF y PHB1TAPtagR, se obtuvieron 19 clones positivos. En la **Figura 4.38** se observa como los clones 1 al 3 y 5 al 7 fueron positivos, ya que amplificaron una única banda de 828 pb, del tamaño esperado. En el rastreo de los clones para el gen *phb2* se utilizaron los cebadores PHB2TAPtagF y PHB2TAPtagR, y se obtuvieron 15 clones positivos de un total de 20. En la **Figura 4.39** se muestra el rastreo de 7 clones para el gen *phb2*, donde los clones 4 al 8 fueron positivos al amplificar una única banda de 930 pb.

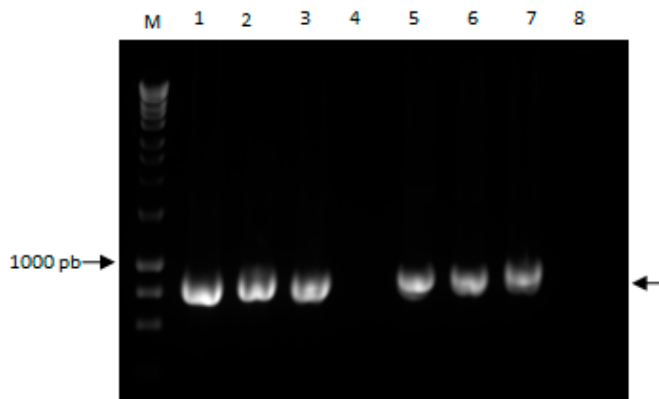


Figura 4.38. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de algunos amplicones obtenidos en el rastreo de los clones amplificados con los cebadores PHB1TAPtagF y PHB1TAPtagR. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); 1: amplificación del gen *phb1* a partir de ADNg (control positivo); 2 al 7: diferentes clones provenientes de la transformación; 8: control negativo de la PCR.

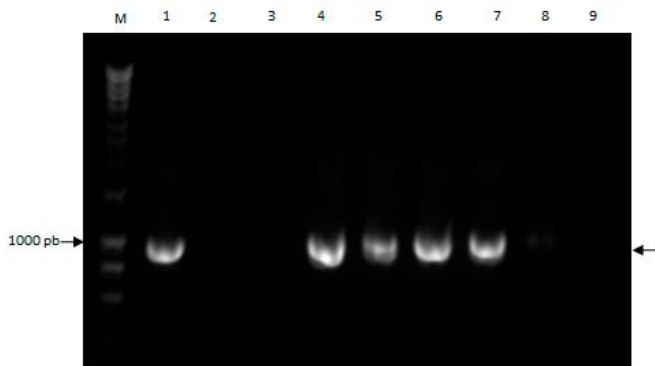


Figura 4.39. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de algunos amplicones obtenidos en el rastreo de los clones amplificados con los cebadores PHB2APtagF y PHB2APtagR. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); 1: amplificación del gen *phb2* a partir de ADNg (control positivo) 2 al 8: diferentes clones provenientes de la transformación; 9: control negativo de la PCR.

El clon 5 conteniendo al plásmido pTAPHB1 y el clon 6 conteniendo al plásmido pTAPHB2 se seleccionaron para llevar a cabo los estudios posteriores. Se extrajeron sus ADN plasmídico y se secuenciaron con los cebadores pTREXTAPtagF, pTREXTAPtagR y TAPtagR. El análisis de las secuencias determinó que no existió ninguna mutación y que el marco de lectura de los genes fusionado era el diseñado.

4.7.2 Transfección y sobreexpresión de las PHBs en *T. cruzi*

Tras la obtención del ADNp mediante el *PureYield Plasmid Midiprep System Kit* a partir de las cepas *E. coli* (pTAPHB1), *E. coli* (pTAPHB2) y *E. coli* (pTAP), esta última conteniendo el plásmido vacío (pTREX-TAPtag-GW), el ADN plasmídico obtenido se usó para transfectar por electroporación los epimastigotes en fase exponencial de la cepa DM28c tal y como se describió en el apartado 3.15.1. Hay que recordar que el plásmido pTREX-TAPtag-GW le confiere a los parásitos transfectados resistencia a neomicina, después de 24 h post-transfección se añadió el antibiótico (200 µg/ml de gentamicina (G418), ya que dicho antibiótico posee un espectro de acción similar a la neomicina) a los cultivos a fin de seleccionar aquellos parásitos donde la

transfección fue efectiva. Los parásitos se cultivaron en medio LIT suplementado con SBFi más el antibiótico durante ~6 semanas. Con los extractos totales de los flagelados transfectados, se realizaron ensayos de Western Blots para comprobar la sobreexpresión de las proteínas de fusión, utilizando como anticuerpo primario el anti-CBP, que reconoce al TAPtag.

En la **Figura 4.40** se muestra el resultado de la detección de los marcadores de fusión de las proteínas de estudio. Para la PHB1 recombinante (carril 1) se observó una banda con el tamaño esperado que fue de ~58 kDa, pero además de la proteína sobreexpresada, se visualizaron otras bandas de menor tamaño, que podrían proceder bien de la expresión de proteínas recombinantes en una población heterogénea o la degradación de la proteína de fusión. En el caso de la PHB2 (carril 2) se observó principalmente una banda con el tamaño de ~60 kDa, la cual concuerda con el tamaño esperado.

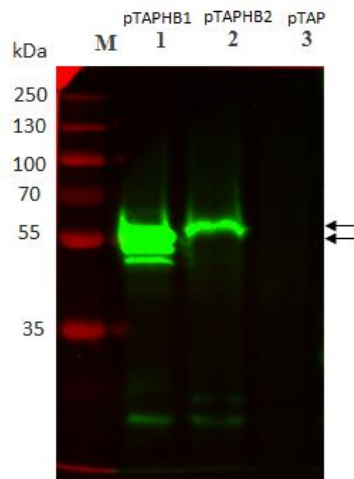


Figura 4.40. Detección mediante Western blot de la sobreexpresión de las PHB1 y PHB2 recombinantes en poblaciones policlonales utilizando como anticuerpo primario anti-CBP (Abcam) que reconoce al marcador TAPtag. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); proteínas totales de epimastigotes de las siguientes líneas celulares: 1. *T. cruzi* (pTAPHB1); 2: *T. cruzi* (pTAPHB2) y 3: *E. coli* (pTAP).

Debido a la presencia de otras bandas de diferentes tamaños al esperado, se decidió proceder a la obtención de poblaciones clonales. Para ello, se realizó una clonación de los flagelados transfectados mediante el método de la dilución límite, en placas de 96 pocillos (NUNC) de las líneas celulares *T. cruzi* (pTAPHB1), la PHB2 *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP) con el fin de obtener poblaciones homogéneas. El proceso para la obtención y estabilización de las poblaciones clonales estables duró un total de ~3 meses. De ello, se seleccionaron 5 clones de los parásitos transfectados, que se analizaron nuevamente mediante Western blots.

En las **Figuras 4.41 y 4.42** se presentan los resultados de los Western blots utilizando extractos de proteínas totales obtenidos de los cultivos de los clones crecidos y estabilizados para detectar la sobreexpresión de las PHBs. Los **paneles A** muestran los controles de carga teñidos con azul de Coomassie y en los **paneles B** los resultados de los Western blots utilizando como anticuerpo primario anti-CBP, que reconoce al TAPtag. El análisis mostró que todos los clones seleccionados sobreexpresaron la PHB1, si bien se observó una sobreexpresión mayor en los clones 3 y 4 (**Figura 4.41, Panel B**).

En el caso de la PHB2, no todos los clones sobreexpresaron la proteína PHB2 recombinante, solo se obtuvo dicha sobreexpresión en los clones 2 al 5, presentando el clon 5 una mayor sobreexpresión en comparación con el resto de los clones estudiados.

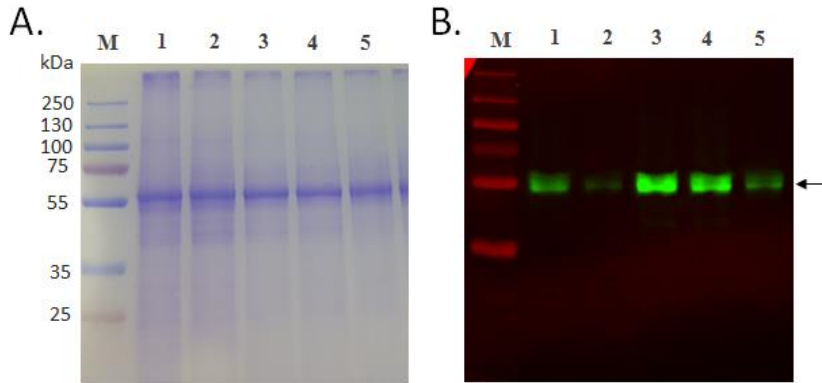


Figura 4.41. Detección mediante Western blot de la proteína PHB1 recombinante a partir de extractos proteicos de poblaciones clonales de *T. cruzi* (pTAPHB1), usando el anticuerpo anti-CBP (Abcam) como anticuerpo primario. En el panel A se muestra el control de carga. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo) 1 al 5: SDS-PAGE con extractos proteicos de los diferentes clones transfectedos teñidos con azul de Coomassie. El panel B se muestra el resultado del WB. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); 1 al 5: WB de los extractos proteicos de los diferentes clones.

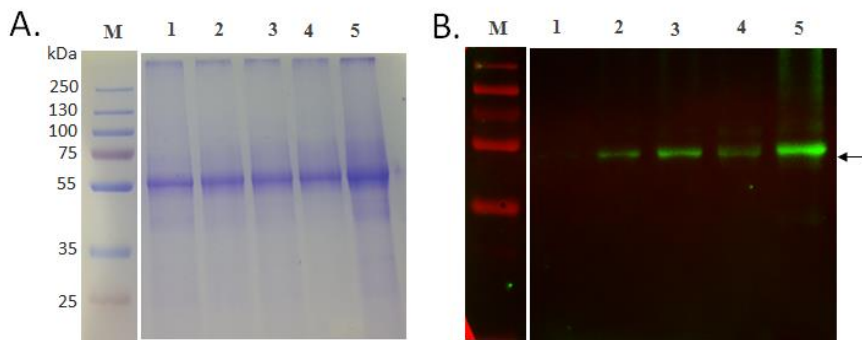


Figura 4.42. Detección mediante Western blot de la proteína PHB2 recombinante a partir de extractos proteicos de las poblaciones clonales de *T. cruzi* (pTAPHB2), usando anti-CBP (Abcam) como anticuerpo primario. En el panel A se muestra el control de carga. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo) 1 al 5: SDS-PAGE con extractos proteicos de los diferentes clones transfectedos teñidos con azul de Coomassie. El panel B se muestra es el resultado del WB. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); 1 al 5: WB de los extractos proteicos de los diferentes clones.

Tras la selección de un clon capaz de sobreexpresar las proteínas PHB1 y PHB2, se procedió a la detección de las proteínas recombinantes PHB1 y PHB2 con los inmunosueros obtenidos y al estudio de los niveles de expresión relativa con respecto a la tubulina. De igual manera se estudiaron los niveles de expresión de las dos PHBs procedentes de la transfección con respecto a la expresión de las PHBs endógenas (**Figuras 4.43 y 4.44**).

En los **paneles A** se muestran los resultados de la detección de las PHB1 y PHB2 recombinantes en poblaciones clonales de *T. cruzi* mediante Western blots. En los **paneles B** se muestra la cuantificación de la expresión relativa de las proteínas recombinante con respecto a la expresión de la tubulina. En el **panel B** de la primera Figura se observó levemente una mayor expresión de la PHB1 recombinante frente a la tubulina, pero se visualizó casi el doble de expresión de la tubulina frente a la PHB1 endógena, comparando entre las dos PHBs se observó una mayor sobreexpresión de la proteína PHB1 recombinante. Mientras que para la proteína PHB2 se observó más del doble de expresión de la PHB2 endógena frente a la recombinante y una mayor expresión de la tubulina frente a la expresada por los clones no transfectados.

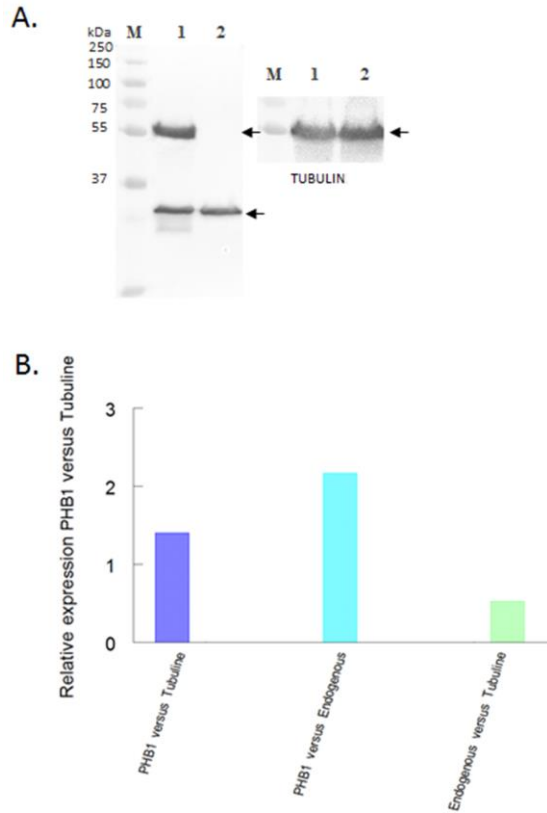


Figura 4.43. Expresión relativa de la PHB1 recombinante y endógena de una población clonal frente a la expresión de la tubulina. Los cálculos de expresión relativa (panel B) se realizaron a partir del densitograma de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blots del panel A. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo) 1: proteínas totales de epimastigotes provenientes de una población clonal de *T. cruzi* (pTAPHB1) 2: proteínas totales de epimastigotes provenientes una población clonal de *T. cruzi* (pTAP).

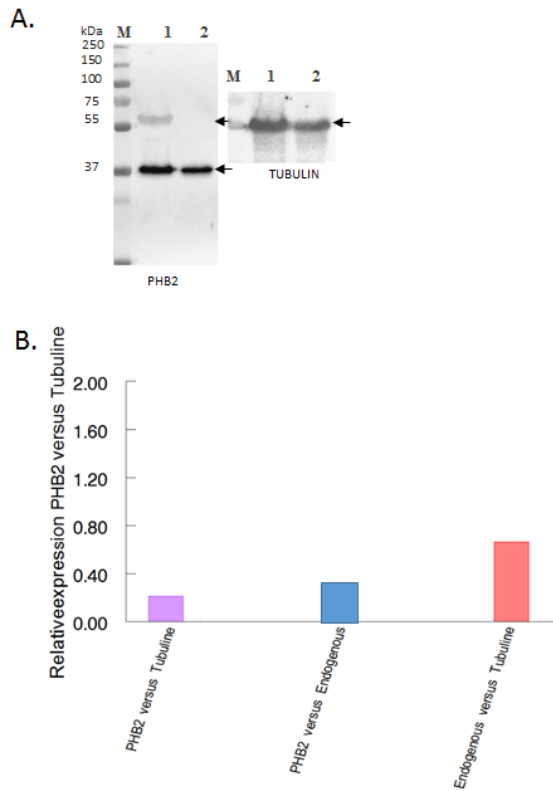


Figura 4.44. Expresión relativa de la PHB2 recombinante y producción endógena de una población clonal frente a la expresión de la tubulina. Los cálculos de expresión relativa (panel B) se realizaron a partir del área de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blots del panel A. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo) 1: proteínas totales de epimastigotes provenientes de una población clonal de *T. cruzi* (pTAPHB2) 2: proteínas totales de epimastigotes provenientes de la población clonal de *T. cruzi* (pTAP).

4.7.3 Estudio fenotípico de las líneas que sobreexpresan las PHBs en *T. cruzi*

Con objeto de observar las características morfológicas de las líneas de los flagelados que sobreexpresan las PHBs se estudiaron las cepas *T. cruzi* (pTAPHB1) y *T. cruzi* (pTAPHB2) comparándose con el control *T. cruzi* (pTAP). Para ello se partió de formas epimastigotas de las distintas líneas

celulares, se fijaron los parásitos con metanol y posteriormente se procedió a teñirlos con Giemsa durante 30 minutos.

En la **Figura 4.45** se muestra la morfología de los distintos clones teñidos con la tinción de Giemsa. Como se observa los clones que sobreexpresaron las PHB1 y PHB2 no presentan cambios apreciables en su morfología con respecto a la cepa control.

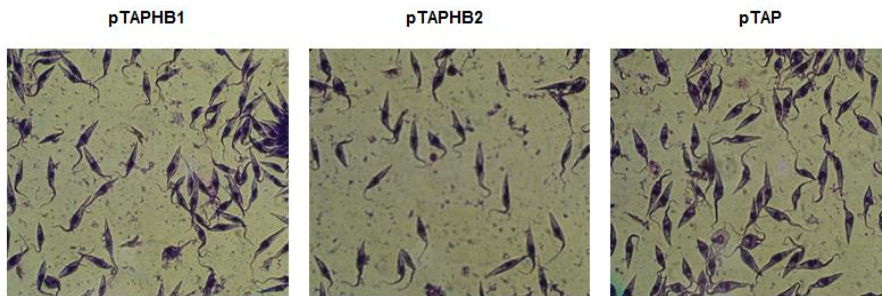


Figura 4.45. Observación bajo el microscopio al 400 X de las diferentes líneas celulares *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP).

4.7.4 Curvas de crecimiento

Al objeto de estudiar los niveles de crecimiento y multiplicación de los diferentes clones *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP) fueron cultivados en medio LIT 10% partiendo inicialmente 1.10^6 parásitos/ml. El crecimiento celular se controló realizando conteos de parásitos por triplicado en la cámara de Neubauer cada 24 h durante 8 días.

En la **Figura 4.46** se muestran las curvas de crecimiento de los clones *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP). Como se observa en la Figura no hay diferencias significativas de crecimiento entre los que sobreexpresan las PHB1 y PHB2 con respecto al control.

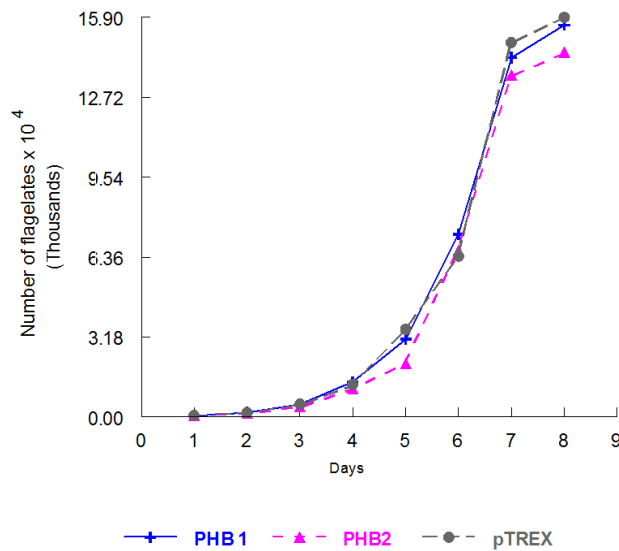


Figura 4.46. Curvas de crecimiento de los distintos clones: *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP), durante 8 días.

4.7.5 Cinética de diferenciación de las líneas celulares que sobreexpresan las PHBs

Para realizar los estudios de metacicloénesis, es decir, la diferenciación de epimastigotes de *T. cruzi* a tripomastigotes metacíclicos, se partió de cultivos en fase logarítmica de crecimiento de los tres clones de *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP). Tras el recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer por triplicado se ajustó el número de parásitos a 5×10^8 flagelados/ml en medio TAU (Triatomine Artificial Urine) incubándose durante 2 h a 28°C. Tras esto, los parásitos fueron diluidos a 5×10^6 flagelados/ml con el medio TAU-3AAG suplementado con aminoácidos y se incubaron durante 72 h a 28°C.

En la **Figura 4.47** se muestra el resultado de la cinética de transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos en las distintas líneas celulares. Como se observa en la figura los parásitos que sobreexpresaron a las proteínas PHB1 y PHB2 alcanzaron los mayores porcentajes de diferenciación a las 48

h. En ese punto los porcentajes de diferenciación para los parásitos que sobreexpresan la PHB1 fue de 64%, y para los parásitos que sobreexpresan la PHB2 fue de 44% mientras que en el control solo produjo el 21% de diferenciación. Esto nos sugiere que en condiciones de estrés nutricional las PHBs podrían estar facilitando la diferenciación de los parásitos en estudio.

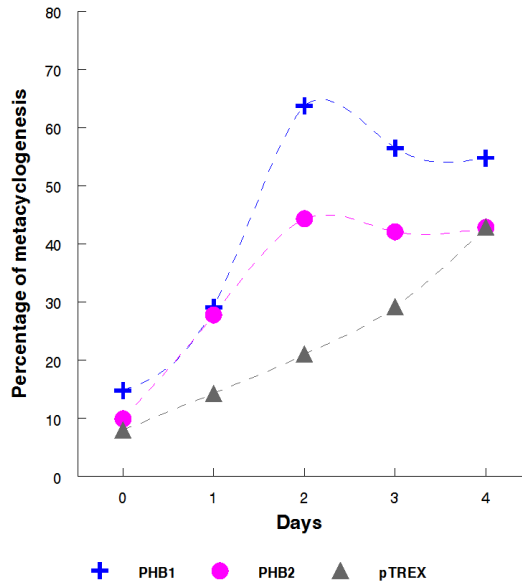


Figura 4.47. Cinética de diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos de las líneas de los parásitos de *T. cruzi* (pTAPHB1) sobreexpresando la PHB1 recombinante, *T. cruzi* (pTAPHB2) sobreexpresando la PHB2 recombinante y el control *T. cruzi* (pTAP).

4.7.6 Sobreexpresión de las PHBs en los diferentes estadios

Con objeto de corroborar la correcta sobreexpresión de las PHBs recombinantes en los diferentes estadios, se realizaron Western blots como se describió en el apartado 3.9.4 de Materiales y Métodos; tras la obtención de los extractos proteicos de las formas de epimastigotas, tripomastigotas sanguíneos y amastigotas de las líneas celulares que sobreexpresaron a las PHBs en *T. cruzi*.

En la **Figura 4.48** se muestra la detección de la PHB1 y PHB2 en los estadios de epimastigotes, tripomastigotes sanguíneos y amastigotes. Como se observa las PHBs recombinantes se expresaron correctamente en todos los estadios, con un tamaño esperado de ~57 kDa para la PHB1 y ~60 kDa para la PHB2.

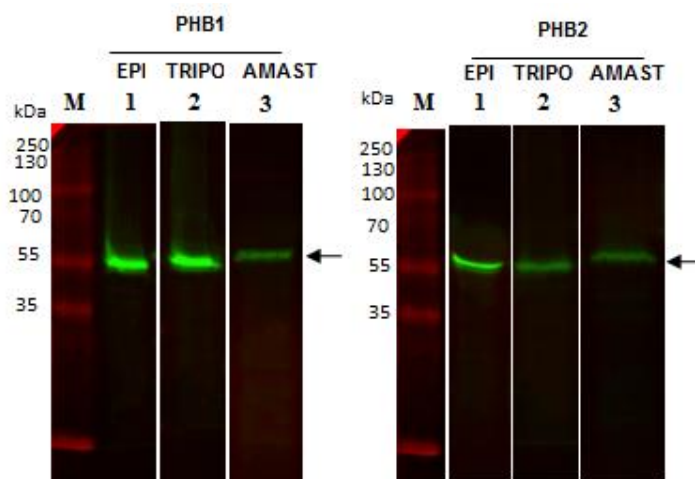


Figura 4.48. Detección de las PHB1 y PHB2 recombinantes en los estadios de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de las cepas *T. cruzi* (pTAPHB1) y *T. cruzi* (pTAPHB2) utilizando como anticuerpo primario anti-CBP (Abcam) que reconoce al TAPtag.

4.7.7 Microscopia de fluorescencia confocal durante el proceso de infección *in vitro* con los parásitos que sobreexpresan las PHBs

Con objeto de comprobar si las PHBs de *T. cruzi* pueden facilitar la interacción parásito hospedador, se infectaron células Vero con los tripomastigotes metacíclicos obtenidos de las líneas celulares que sobreexpresaban las proteínas PHB1 y PHB2. Los parásitos se convirtieron en amastigotes, se dividieron, para luego liberarse de las células en formas de tripomastigotas sanguíneos. Para los ensayos se partió del mismo número de formas tripomastigotas con los cuales se infectaron células Vero en una proporción de 4 tripomastigotes sanguíneos por célula Vero. A las 2 h post-

infección se realizaron lavados a las células con el fin de eliminar los parásitos que no habían infectado ninguna célula. Tras una incubación de 72 h se lavaron nuevamente y las células se fijaron con solución de Karnovsky. Seguidamente se prepararon las muestras como se describió en el apartado de Materiales y Métodos para su observación en el microscopio láser confocal. Como anticuerpos primarios se utilizaron anti-PHB1 y anti-PHB2 y como anticuerpo secundario anti-rata marcado con FITC (Sigma).

En la **Figura 4.49** se muestra el resultado obtenido tras el conteo por triplicado de 150 células Vero a las 72 h post-infección con las líneas *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP). En el **panel A** se muestra algunos de los campos utilizados en el conteo de células infectadas y amastigotes por células obtenidos por microscopia confocal utilizando como anticuerpo primario los sueros obtenidos tras las inmunizaciones en ratas. En el **panel B** se muestra el resultado obtenido tras el análisis de la Figura A. Como se visualiza en el gráfico de barras, no se observaron diferencias significativas en la infectividad de las líneas que sobreexpresan a las PHB1 y PHB2 en comparación con el control. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la cantidad de amastigotes por células de las líneas que sobreexpresan a las proteínas de estudio con respecto al control.

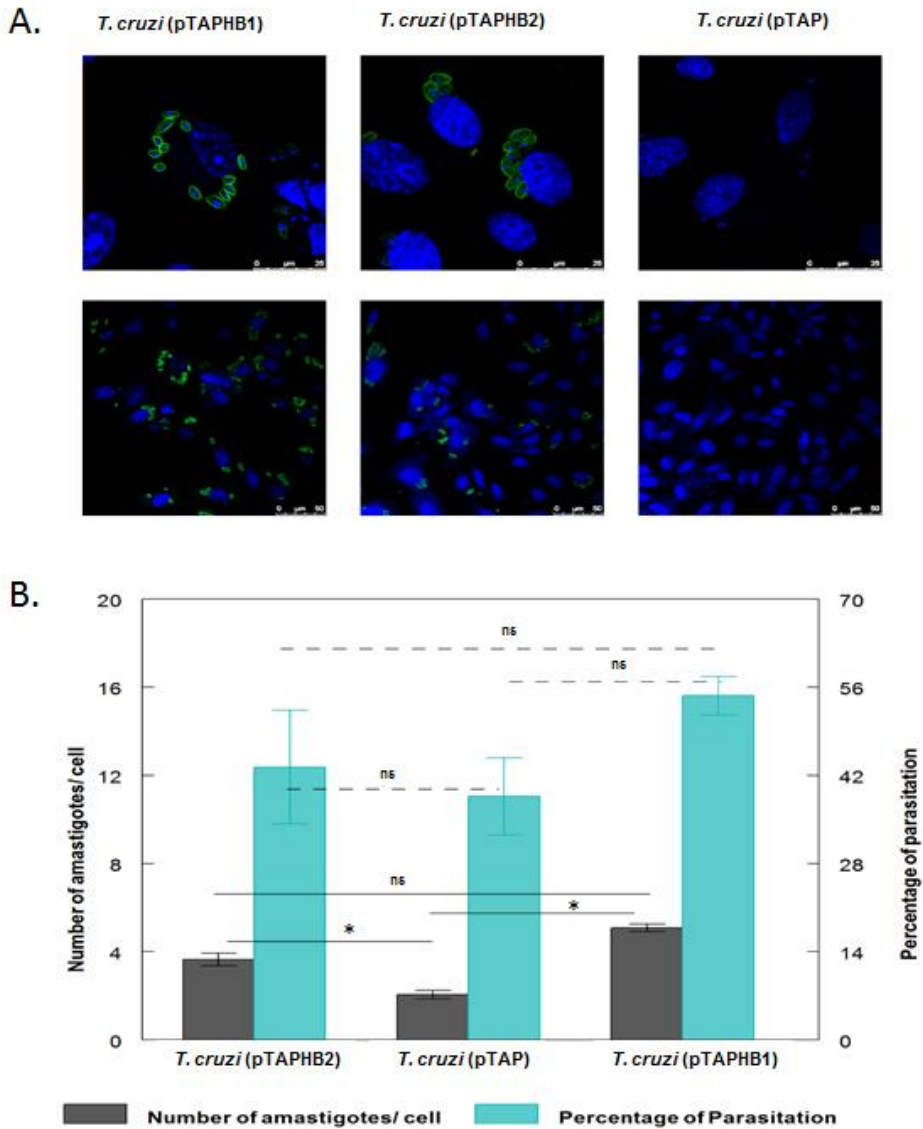


Figura 4.49. Porcentajes de parasitación y número de amastigotes por célula de las líneas *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2), y *T. cruzi* (pTAP). Panel A: microscopia confocal de células Vero a las 72 h post-infección con tripomastigotes sanguíneos de las distintas líneas celulares. Para la detección se usó como anticuerpo primario los inmunosueros anti-PHB1 y anti-PHB2 y como anticuerpo secundario anti-rata conjugado con FIT (verde). El colorante DAPI fue usado como marcador del ADN (azul). Panel B: los cálculos de la infectividad y de amastigotes por célula se realizaron a partir del recuento de células infectadas y número de amastigotes por células.

4.7.8 Evaluación del estrés oxidativo en *T. cruzi* de las líneas celulares que sobreexpresan las PHBs

Recientemente nuestro grupo de investigación describió como en promastigotas de *L. major* las PHBs participan en los mecanismos de supervivencia de los protozoos contrarrestando la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (161). Debido a estas evidencias, sometimos a las líneas celulares que sobreexpresaron las PHBs y su control a condiciones de estrés oxidativo, añadiendo a los cultivos H_2O_2 y marcándolas con DCFDA (fluorocromo usado como marcador del estrés oxidativo). Después de la difusión en la célula, el DCFDA/ H_2 DCFDA se desacetila por las esterasas celulares a un compuesto no fluorescente, que posteriormente se oxida por acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) el cual es detectado por fluorescencia pudiendo determinarse su intensidad mediante citometría de flujo.

Para realizar el estudio, en primer lugar se determinaron las condiciones óptimas para hacer el ensayo para lo cual a diferentes cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* (pTAP) (1.10^5 , 5.10^5 , 1.10^6 , 5.10^6 y 1.10^7) se les estudió la viabilidad celular en presencia de distintas concentraciones de H_2O_2 (de 0 a 800 μ M). Tras incubar los parásitos durante 40 min se evaluó la viabilidad y la intensidad del DCF. Tras el análisis de viabilidad celular, se determinó que la mejor condición para llevar a cabo los experimentos fue de 1.10^7 células con 500 μ M de H_2O_2 , incubándolos durante un total de 90 minutos. Una vez fijadas las condiciones óptimas se evaluó el estrés oxidativo en los clones de *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP).

En la **Figura 4.50** se muestra el análisis de los resultados obtenidos de los niveles de fluorescencia con el citómetro de flujo, tras someter a los cultivos a un estrés con especies reactivas de oxígeno. En el **panel A** se muestran las medidas de DCF de células tratadas con H_2O_2 con respecto a las no tratadas,

mientras que en el **panel B** se muestra la intensidad media de fluorescencia (MIF) de la tasa de cambio del DCF de las muestras tratadas y no tratadas. Comparando estadísticamente las distintas líneas celulares con el test LSD Fisher $p < 0.05$, se observaron diferencias significativas entre las líneas que sobreexpresaron las PHBs y el control. Esto sugiere que las líneas celulares que sobreexpresaron las PHBs son más resistentes a condiciones del estrés oxidativo inducido, lo que podría indicar que las proteínas PHB1 y PHB2 en *T. cruzi*, al igual que en *L. major*, pueden tener un papel protector frente a ROS.

De los datos obtenidos se desprende que el clon que sobreexpresó la PHB1 es más resistente a las condiciones de estrés oxidativo que el clon que sobreexpresó a la PHB2. No obstante, esta diferencia entre los clones que sobreexpresan a las PHBs podría deberse a la diferencia de expresión entre las distintas PHBs, dado que como se observó en el apartado 4.7.2 de este capítulo; la línea *T. cruzi* (pTAPHB1) expresó en mayor cantidad a la PHB1 recombinante que a la endógena, en comparación con la línea *T. cruzi* (pTAPHB2) que expresó en menor cantidad a la proteína recombinante que a la endógena correspondiente (**Figuras 4.43 y 4.44**).

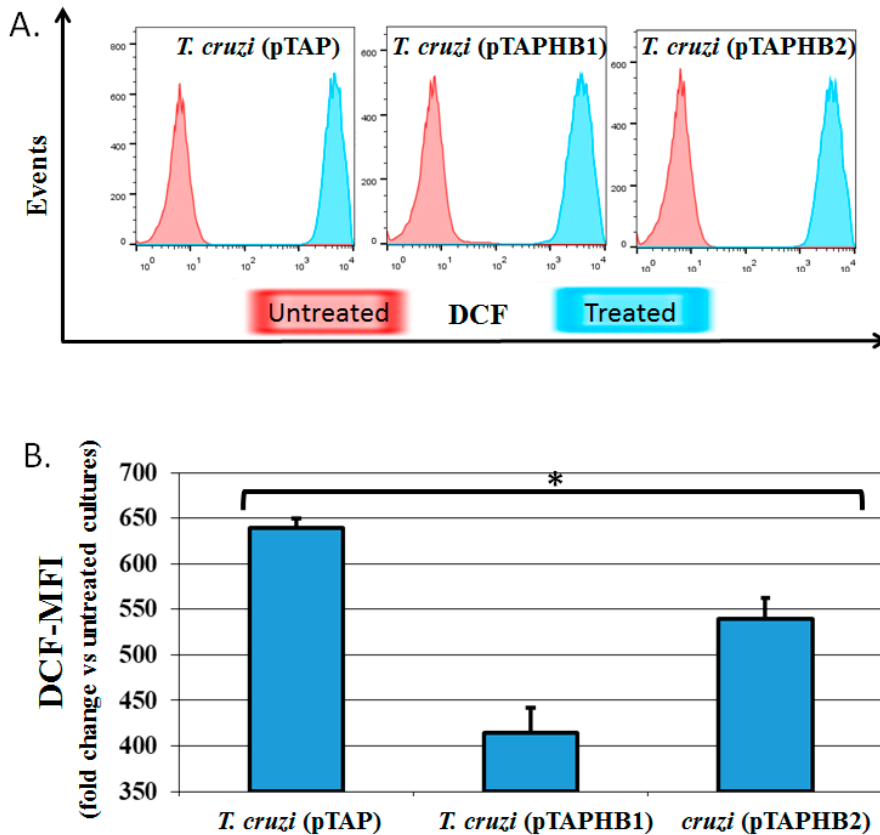


Figura 4.50. Resultados obtenidos mediante citometría de flujo del efecto del tratamiento con H₂O₂ de las distintas líneas celulares *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP). Panel A: medidas obtenidas con la sonda DCF en muestras tratadas con H₂O₂ y no tratadas en cada línea celular. Panel B: análisis de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la tasa de cambio de DCF de las muestras tratadas y no tratadas. El test LSD Fisher $p < 0.05$ se utilizó para determinar si existían diferencias significativas entre las diferentes líneas celulares (*).

4.7.9 Purificación de las PHBs por afinidad en tándem

Como se describió anteriormente el método TAPtag es un método para la purificación de complejos proteicos en condiciones nativas con un alto grado de pureza. El TAPtag contiene dominios de unión a IgG (proteína A de *S. aureus*) y un péptido de unión a Calmodulina (CBP) separados por un sitio de digestión para la proteasa TEV del Virus Mosaico del Tabaco (182).

Se partió de cultivos en masa en fase exponencial de crecimiento de cada uno de los clones de (*T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP)) en LIT suplementado con 10% de SBFi. De los organismos cultivados, se prepararon extractos proteicos totales tal y como se describe en el apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos. Los extractos se concentraron por centrifugación resuspendiéndose en buffer de lisis conteniendo 0.5% al 2% del detergente no-iónico NP-40. Esta metodología está diseñada al objeto de mantener la integridad de los complejos proteicos en condiciones nativas. Las muestras fueron cromatografiadas por afinidad en columnas de sefarosa ligada a IgG, las cuales se deben unir a las proteínas recombinantes a través de la proteína A que forma parte del TAPtag. Tras realizar varios lavados, a fin de eliminar las proteínas no ligadas, se procedió a la elución de los complejos con el buffer que contenía a proteasa TEV, a fin de escindir la proteína quimérica liberando de esta manera a las proteínas de estudio. Las proteínas eluidas obtenidas a partir de la primera columna se volvieron a purificar por afinidad, esta vez utilizando columnas de sefarosa unida a calmodulina. Las muestras se cromatografiaron a través de las nuevas columnas, y tras los lavados se eluyeron con EGTA para liberar el complejo proteico de interés. Las proteínas eluidas se precipitaron con acetona y se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE al 12% para su posterior tinción con plata e inmunotransferencia.

En las **Figuras 4.51 y 4.52** se muestran los resultados de los Western blots obtenidos, en los cuales se observan las PHBs endógenas y recombinantes. En los **paneles A** se muestran los resultados obtenidos con los cultivos que sobreexpresaron las PHBs y en los **paneles B** se muestran los resultados con el control *T. cruzi* (TAP). Como se observa en los **paneles A** de ambas Figuras, las PHBs recombinantes no se unieron a las columnas, y la totalidad de la proteína pasó a través de la misma. Se concluyó que el problema de no unión podría estar relacionado con la solubilidad de la proteína, debido a que

las proteínas recombinantes no estaban en forma soluble y por eso no eran retenidas en las columnas.

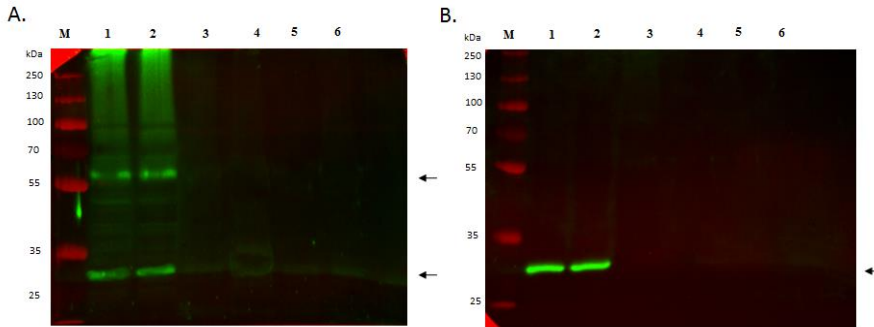


Figura 4.51. Detección mediante Western blot de las PHB1 recombinante y endógena usando el suero anti-PHB1. Panel A: muestras proteicas obtenidas de la línea celular *T. cruzi* (pTAPHB1). Panel B: muestras proteicas obtenidas de la línea celular *T. cruzi* (TAP) (Control). M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); 1: muestra previa a la cromatografía de afinidad; 2: muestra cromatografiada a través de la columna de IgG; 3: lavados de la Columna IgG; 4: elución de la columna de IgG; 5: lavado de la columna de calmodulina; 6: elución de la columna de calmodulina.

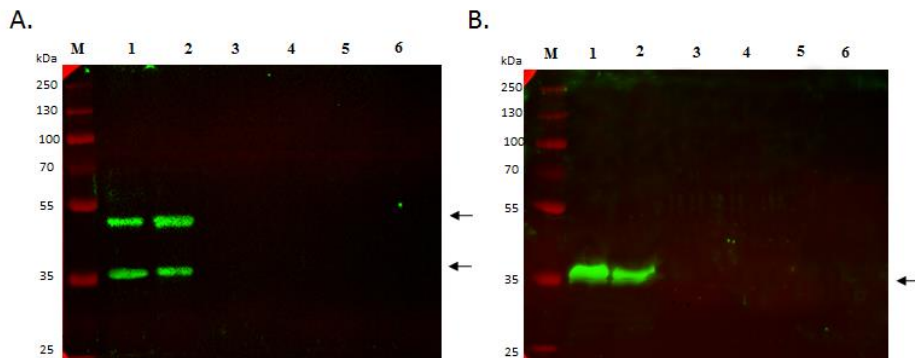


Figura 4.52. Detección mediante Western blot de las PHB2 recombinante y endógenas usando el suero anti-PHB2. Panel A: muestras proteicas obtenidas de la línea celular *T. cruzi* (pTAPHB2). Panel B: muestras proteicas obtenidas del clon *T. cruzi* (TAP) (Control) M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); 1: muestra previa a la cromatografía; 2: muestra cromatografiada por la columna de IgG; 3: lavados de la Columna IgG; 4: elución de la columna de IgG; 5: lavado de la columna de calmodulina; 6: elución de la columna de calmodulina.

Tras este resultado se decidió repetir la purificación de las proteínas de fusión, usando en la cromatografía un 2% de NP-40 (192). El resultado de esta nueva purificación (eluciones de la columna de calmodulina en los extractos proteicos del clon *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP) se muestra en la **Figura 4.53** tras su electroforesis en SDS-PAGE y tinción con plata, no se observó ninguna banda que no se encontrase en el control. No obstante, aunque no se pudo utilizar esta etiqueta para la purificación de los complejos, se la utilizó para el reconocimiento de la proteína recombinante.

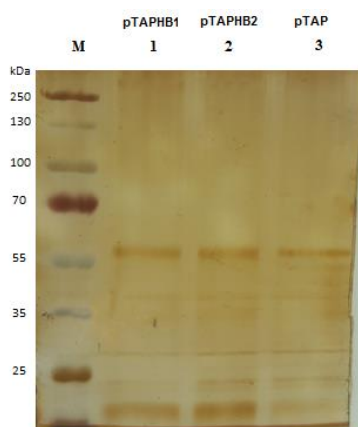


Figura 4.53. Tinción con plata de la electroforesis realizada con las muestras obtenidas tras las eluciones con EGTA de las columnas conteniendo calmodulina. M: marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo); muestras obtenidas a partir de extractos proteicos de las líneas 1: *T. cruzi* (pTAPHB1); 2: *T. cruzi* (pTAPHB2); 3: *T. cruzi* (pTAP).

4.8 Disrupción genética de PHB1 y PHB2 mediante el sistema CRISPR/cas9

Al objeto de ratificar la funcionalidad de ambas proteínas y así lograr el siguiente objetivo de la tesis, el cual consistió en silenciar la expresión de las PHB1 y PHB2 con el objeto de determinar el papel de estas proteínas en la

biología de *T. cruzi*, para ello se utilizó el sistema conocido como CRISPR/Cas9.

Como se describió anteriormente en el apartado 1.4 de la Introducción, existen disponibles muy pocas herramientas celulares y genéticas para trabajar con la manipulación genética de *T. cruzi* (83,193).

La edición del genoma mediante CRISPR (del inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) y la asociación de esta tecnología con la endonucleasa Cas9 y un ARN quimera diseñado o ARNg (del Inglés RNA single guided) o ARNg conforman un complejo ribonucleoproteico capaz de reconocer la secuencia diana y producir roturas en la doble cadena de ADN. La nucleasa Cas9 es capaz de reconocer una secuencia específica, debido a que el ARNg contiene una secuencia entre 19 a 22 nt denominada protoespaciador que reconoce al gen diana. Las roturas de doble hebra generadas por Cas9 se pueden reparar mediante recombinación homóloga mediante ADN donante o mediante uniones finales no homólogas (NHEJ) propensas a errores (74). Los tripanosomátidos son deficientes en la NHEJ canónica, pero tienen un mecanismo de reparación caracterizado más recientemente, denominado unión final mediada por microhomología (MMEJ) (194,195). El MMEJ repara las roturas de ADN mediante el uso de microhomología sustancial que siempre termina en deleciones (83,196,197).

4.8.1 Diseño y localización de los ARN guías a partir de los genes *phb1* y *phb2* de *T. cruzi*

Primeramente, se diseñaron dos ARN guías (ARNg) diferentes para cada gen de estudio utilizando la herramienta bioinformática “Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool” (183). Los protoespaciadores son secuencias complementarias al gen diana de un tamaño entre 19 a 22 nucleótidos de longitud (**Tabla 4.1**). Los parámetros de búsqueda de los

protoespaciadores utilizados fueron los que estaban predeterminados en el programa. Se seleccionaron aquellos ARNg que mostraron un acierto perfecto en los *on-target hits* y que no tuvieron *off-target hits*, todos ellos, poseían un puntaje superior a 0.5, tal y como es recomendado por Tarleton, R. & Peng, D. (2005) (183) dado que en *T. cruzi* una puntuación de la actividad >0.5 se correlaciona fuertemente con una función de éxito del ARNg.

Tabla 4.1. Protoespaciadores diseñados para los genes *phb1* y *phb2* de *T. cruzi* obtenidos con la herramienta EuPaGDT. La columna ARNg ID representa la posición dentro de la secuencia de entrada. Tanto los *on-target hits* como los *off-target hits* se muestran como *perfect match* | *non-perfect match*.

Nombre	ARNg ID	Protoespaciador/ PAM	Puntaje total	<i>On-target hits</i>	<i>Off-target hits</i>
1sgphb1	PHB1_50 1	GGTGGACATTCAGTTTGGCA AGG	0.72	1 0	0 0
2sgphb1	PHB1_60 8	AAAAGCGGGCGGCTATTGTG CGG	0.70	1 0	0 0
1sgphb2	PHB2_62 7	GGCGCAACAGATGGCAGAGC GGG	0.71	1 0	0 0
2sgphb2	PHB2_69 6	TCTTCTTGCGGAAGGTGAGG CGG	0.70	1 0	0 0

En la **Figura 4.54** se muestra localización de los protospaciadores dentro de las secuencias nucleotídicas de los genes de estudio. En la secuencia y marcado en amarillo se muestran las secuencias motivos adyacentes al protospaciador (PAMs), las cuales van inmediatamente después de la secuencia de ADN complementario y contiene la secuencia NGG requerida para el reconocimiento y escisión de la enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Como se observa todos los protospaciadores contenían entre 19 y 21 nucleótidos. Los protospaciadores que no comenzaron por G, se les añadió

una G en su secuencia, debido a que la G inicial aumenta la eficiencia de la transcripción del ARN guía (ARNg) (183).

>*T. cruzi* PHB1

ATGAGTTTGAAATTTCTTCGACATCTTATGACTGGTGTGGTGGCTGCTCGGTAGGCATTACAGCTGCTGCTTTGTCGT
TCGTCCCGGGGAGGCTGCCATCCTTTATAATAAGATTACTGGTCTTAAAGATTTCGGTTACGGCGAAGGTATGCAATTC
GCATTTTGGGCTGGATGACATCAAATGTTTAACTTCGTGTCCGGCCTCGGTTGCTGCAGACCATGACGGGCACAAA
GACCTCAAATGGTAAACATTCTGCTACGTGCTTTGTTCCGCCACAAATTGAGCGACTGCCGCAGATCTATCGTACCT
TGGAATGGACTACGATGAACGTATTCTTCTTCCATCAGCAATGAGATCTTGAAGGCAGTTGTGGCAGAGTACAAGGCGG
AAGAACTGATTAGAAAGCGTGACGCGGTTTCTGCACGCATCTATCAGCTGATGCAAGAGAAGGTGGCACAGTTTGGTCTT
GCTCTGGAGGATCTTCACTGGTGGACATTCAGTTTGGCAAGGAGTTTCATGATTGCCGTGGAGCAAAGCAGGTTGCTCA
GCAGGAGGCGGAGCGTTTCCGTACGTGTTTCCAGGAGAATGAACAGAAAAGCGGGCGCTATTGTGCGGCGGAGGGCG
AGGCCGAGTCAGCGCTCATCTCGGAAGCGATCAAACGTTCTGGCCAGGGCTGCTGGAGTGCAGCGTATTGAGGCA
GTGGTGGACATTGCATCGCAGCTGGTCCAATGAAAATGTGACTTTTGTCCCAACCGATGCCAATTGCTGCTTAACAT
GAAGAAGTTGAGTGGCTGA

>*T. cruzi* PHB2

ATGGCGAAGGCACCACCCGACCTGACTTCTCTCGCTTGCAGCGGAAGTGCGGAAGCGCTTGGTAGCTTTGGTGATGT
TACCGGCCTCTGGCTCTCGTGGCTTTACCGGTATTGTCGGGACGGGGCTCTACAAGTCTGTTACTTCTGTTGACGGTG
GGTGTGCTGCGGTGAAGTTTAAACCCATTACGGGCATGAAGGATAAAGACGTATGGGGAAGGGGCAAACTTTGCCATTCT
TTTCTTGAACACCGGTTGTGTTTACATCCGTAACAAACCCACTGAGGTGATGACGGCAACAGGAAGTGCAGATTGCA
GACTGTTAATTTGGCGGTTCTGTCTCTACCAGCCGAGTGTCAACAACCTATCACAGTCTACCCTAACCTGGGCATGG
AATACGCAGAGATTGTTGTTCCCTCTCTGTCAATGAGATTATCCGTGCGGTTATAGCGCAATTTAACGCCTCCGATCTT
CTTGTAAGCGTCTGAAAGTGAAGCCACCGCATCGTGTATGCTGGCGAGCGTGCGAAGCGATTTTACGTGGACATCAC
AGACGTGTCAATCACCCAGATGAGCTTTGGGAAGGAGTACACCAGCGCCGTGGAGGCTAAACAAGTGGCGCAACAGATGG
CAGAGCGGGCCAAGTGGCGTGTGGAGCAGGCGGAGCAAGAGAAGAAGGGTGCAATCTCTTTCGGGAAGGTGAGGCGGAA
GCGGCTAAGCTATTGGTGCAGCGGTGCAAAAAGATCCAGCCTTTATTACTTTACGCAGCTGGAGGCGTACGTGCAAT
TGCCAAAATGATGAGGAAGCACGGGGTGGCACGCTTTTACCTGGACAGCAGTGGCCTGACTCTCAACGCCAACGCAACTG
GTGGCGAGGGGTGAGCAGAGCTTATGGCAGGCGCCTGTAA

Figura 4.54 Secuencias nucleotídicas de los genes *phb1* y *phb2*, mostrando las secuencias seleccionadas para los diferentes protoespaciadores sugeridos por la herramienta bioinformática “Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool” (183). En verde se muestra al 1sgPHB1, en celeste se muestra al 2sgPHB1, en rojo el 2sgPHB2, en rosado el 2sgPHB2 y en amarillo se muestran las secuencias NGG, necesarias para el reconocimiento y escisión de la Cas9 de *S. pyogenes*.

4.8.2 Amplificación de los diferentes ARNs guías

Posteriormente al diseño de los ARNg y siguiendo el protocolo de Lander, N. et al. (2015) (83), se amplificaron dos ARNg diferentes para cada gen de estudio utilizando como ADN molde el plásmido pUC19sgRNA. Este plásmido contiene la secuencia común de los ARNg, lo que permitió ser utilizado como molde para la amplificación de cualquier ARNg usando un cebador específico que contenía la secuencia del protoespaciador.

En la **Figura 4.55** se muestra el resultado de la amplificación de dos ARNg de cada gen bajo estudio usando el plásmido pUC19sgRNA como molde. Los ARNg para el gen *phb1* se amplificaron con los cebadores directos específicos 1sgPHB1 y 2sgPHB1 y para el reverso se utilizó el cebador común PUCcrisperR, el cual permitió la amplificación del complejo ribonucleico común en todos los guías. Ambos cebadores presentaron un sitio de restricción *Bam*HI en su extremo 5`. Asimismo, para el gen *phb2* se utilizaron los cebadores directos específicos 1sgPHB2 y 2sgPHB2 y el cebador reverso común PUCcrisperR. Como se observó en todos los casos se amplificó una banda principal con el tamaño esperado (122 a 125 pb). No obstante, en los controles de PCR se visualizó la formación de dímeros de los cebadores.

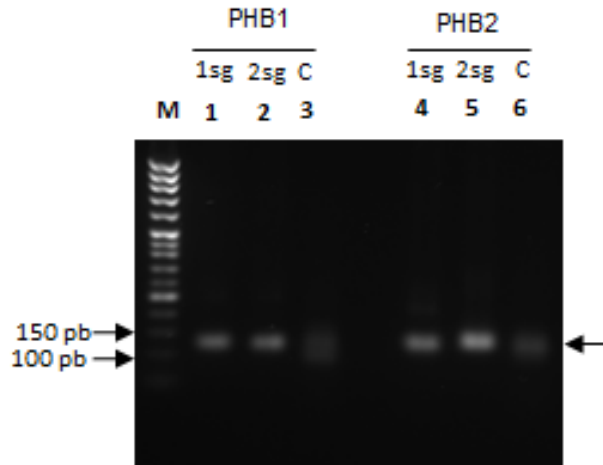


Figura 4.55. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% de las amplificaciones de los distintos ARNg. M: marcador de peso molecular 50-1.000 pb ADN Ladder (Canvax); 1 y 2: ARNg amplificados con los cebadores directos específicos 1sgPHB1 y 2sgPHB1 respectivamente y el reverso común PUCcrisperR; 4 y 5: ARNg amplificados con los cebadores directos específicos 1sgPHB2 y 2sgPHB2 respectivamente y el reverso común PUCcrisperR; 3 y 6: controles negativos de la PCR.

Debido a que se observaron la formación de dímeros de cebadores en los controles de la PCR anterior, se procedió a la realización de una PCR en gradiente de temperatura con los cebadores 1sgPHB1 y el cebador común PUCcrisperR, modificando los parámetros para optimizar la amplificación por PCR: concentración de DMSO (2.5% al 5%), concentración de $MgCl_2$ (1.5 mM a 2 mM), temperatura (50°C a 60°C) y utilizando como molde la PCR anterior.

En la **Figura 4.56** se muestra el resultado de la PCR a 50°C con los cambios introducidos. Como se observa, a esta temperatura no existió formación de dímeros en ninguna de las condiciones. El resultado de la amplificación del 1sgPHB1 a 50°C modificando el ADN molde y algunas concentraciones de DMSO y $MgCl_2$ (**Figura 4.56**). A 50°C de temperatura no se formaron dímeros en los controles y todos los amplicones poseían los tamaños esperados de 122 pb.

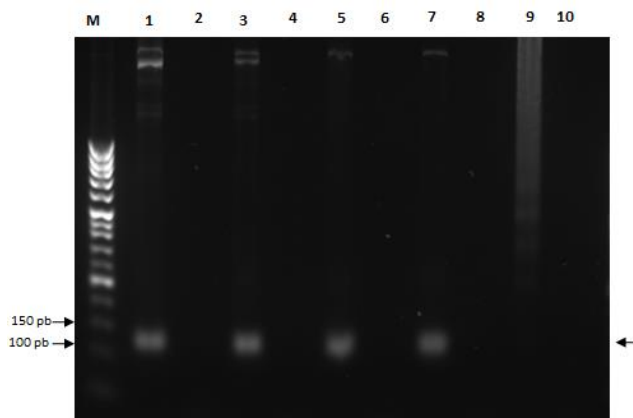


Figura 4.56 Electroforesis en gel de Agarosa al 2% de las amplificaciones del ARNg 1sgPHB1 a 50°C utilizando diferentes ADN moldes y concentraciones de DMSO y MgCL₂. M: marcador de peso molecular 50-1.000 pb ADN Ladder (Canvax); ARNg amplificado con los cebadores 1sgPHB1 y PUCcrisperR con algunas modificaciones 1: con 5% de DMSO y 1.5 mM MgCL₂; 3: con 2.5% DMSO y 1.5 mM MgCL₂; 5: 0% de DMSO y 1.5 mM MgCL₂; 7: 0% DMSO y 2mM MgCL₂; 9: ADN molde de la PCR anterior, 0% de DMSO y 1.5 mM MgCL₂; 2,4,6,8 y 10: controles negativos de la PCR.

El resultado de la amplificación de los diferentes guías que contenían los protoespaciadores específicos con el cebador común PUCcrisperR a 50°C se muestra en la **Figura 4.57**. Como se observa, a 50°C de temperatura de *annealing* no se formaron dímeros en los controles y todos los amplicones poseían los tamaños esperados (122 a 124 pb).

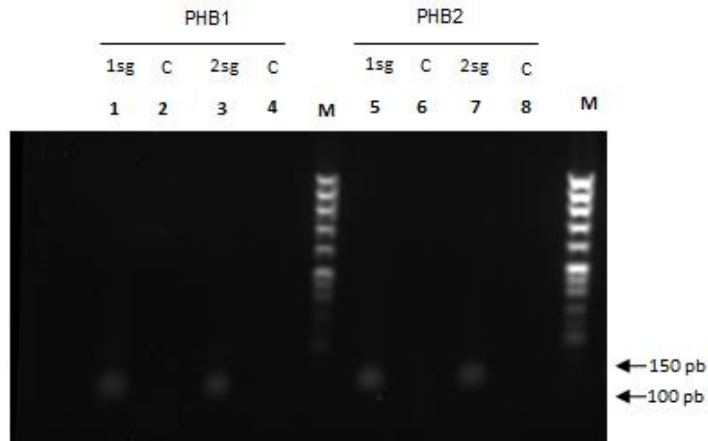
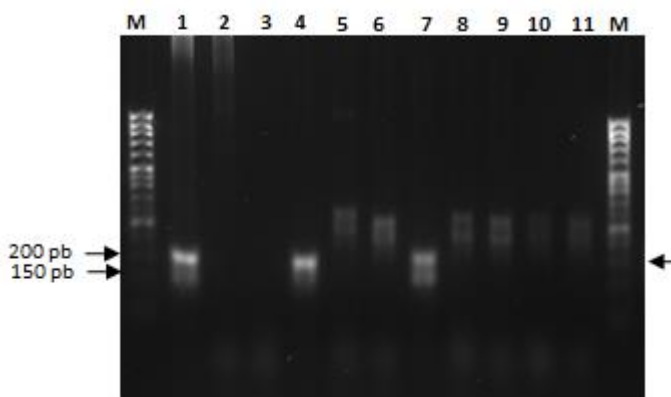


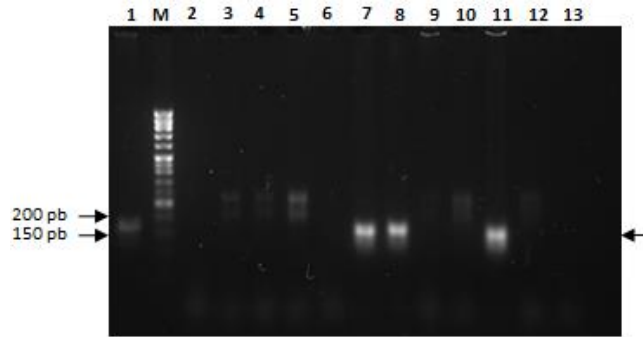
Figura 4.57. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% de las amplificaciones de los distintos guías a 50°C. M: marcador de peso molecular 50-1.000 pb ADN Ladder (Canvax); 1 y 3: ARNg amplificados con los cebadores directos específicos 1sgPHB1 y 2sgPHB1 respectivamente y el reverso común PUCcrisperR; 5 y 7: ARNg amplificados con los cebadores directos específicos 1sgPHB2 y 2sgPHB2 respectivamente y el reverso común PUCcrisperR; 2, 4, 6 y 8: controles negativos de la PCR.

Tras la amplificación de los diferentes ARNg, se digirieron con la enzima de restricción *Bam*HI como se describió en el apartado 3.7.2 de Materiales y Métodos. Asimismo, el vector pREXn/cas9 se digirió con la misma enzima de restricción y a continuación se desfosforilaron los extremos con la fosfatasa alcalina para evitar la recirculación del vector. Posteriormente cada ARNg se ligó con el vector digerido con la enzima T4 ligasa como se describió en el apartado 3.7.6. Los productos de estas ligaciones se usaron para transformar células competentes de la cepa DH5a de *E. coli*. Como resultado se obtuvieron las cepas *E. coli* (1sgCas9PHB1), *E. coli* (2sgCas9PHB1), *E. coli* (1sgCas9PHB2), *E. coli* (2sgCas9PHB2) y el control *E. coli* (ScCas9). Esta última cepa se utilizó como control negativo debido a que el protoespaciador presentó una secuencia de 20 nucleótidos y que no se dirige a ningún gen del genoma de *T. cruzi*. Seguidamente se realizaron los rastreos de los clones positivos mediante PCR de colonia.

En las **Figura 4.58 y 4.59** se muestran los resultados de los amplicones obtenidos en el rastreo de los clones conteniendo los fragmentos de ADN 1sgPHB1 y 2sgPHB1 respectivamente, los cuales poseían los protoespaciadores diseñados a partir del gen *phb1*. Los cebadores utilizados fueron 1sgPHB1 y 2sgPHB1 y un reverso común HX1. De un rastreo de 20 clones para cada ARNg, 5 fueron positivos para el ARNg 1sgPHB1 y 6 para el ARNg 2sgPHB1. Como se observa, los clones positivos poseían el tamaño esperado, 190 pb para el primer guía (**Figura 4.58**) y 192 pb para el segundo (**Figura 4.59**).

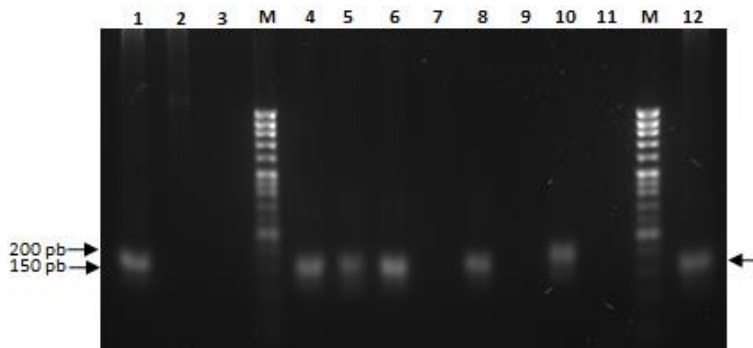


Figuras 4.58. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% de algunos de los amplicones obtenidos en el rastreo de los clones usando los cebadores 1sgPHB1 y PUCcrisperR. M: marcador de peso molecular 50-1.000 pb ADN Ladder (Canvax); 1: amplificación a partir del resultado de la ligación (control positivo); 2: control negativo de la PCR; 3 al 13: diferentes clones provenientes de la transformación.

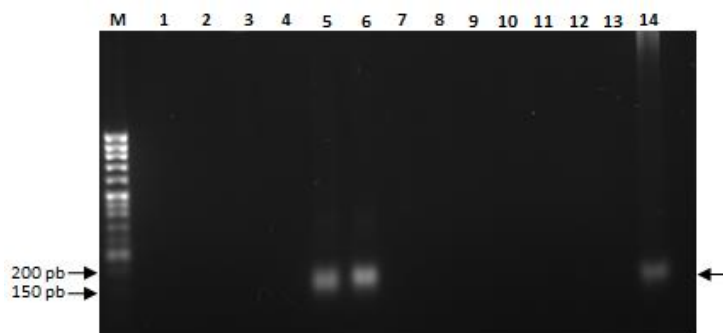


Figuras 4.59. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% de algunos de los amplicones obtenidos en el rastreo de los clones usando los cebadores 2sgPHB1 y PUCrisperR. M: marcador de peso molecular 50-1.000 pb ADN Ladder (Canvax); 1: amplificación a partir del resultado de ligación; 2: control negativo de la PCR; 3 al 13: diferentes clones provenientes de la transformación.

En las **Figuras 4.60 y 4.61** se muestran los resultados del rastreo de los clones positivos para los guías 1sgPHB2 y 2sgPHB2 respectivamente, conteniendo los protoespaciadores diseñados a partir del gen *phb2*. De un rastreo de 20 clones en total para cada guía, 10 fueron positivos para el guía 1sgPHB2 y 5 para el guía 2sgPHB2. Como se observa, los clones positivos poseían el tamaño esperado, 191 pb para el primer guía (**Figura 4.60**) y 192 pb para el segundo (**Figura 4.61**).



Figuras 4.60. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% de algunos de los amplicones obtenidos en el rastreo de los clones usando los cebadores 1sgPHB2 y PUCrisperR. M: marcador de peso molecular 50-1.000 pb ADN Ladder (Canvax); 1 al 12: diferentes clones provenientes de la transformación; 13: control negativo de la PCR; 14: amplificación a partir del resultado de la ligación (control positivo).



Figuras 4.61. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% de algunos de los amplicones obtenidos en el rastreo de los clones usando los cebadores 2sgPHB2 y PUCrisperR. M: marcador de peso molecular 50–1.000 pb ADN Ladder (Canvax); 1 al 12: diferentes clones provenientes de la transformación; 13: control negativo de la PCR; 14: amplificación a partir del resultado de la ligación.

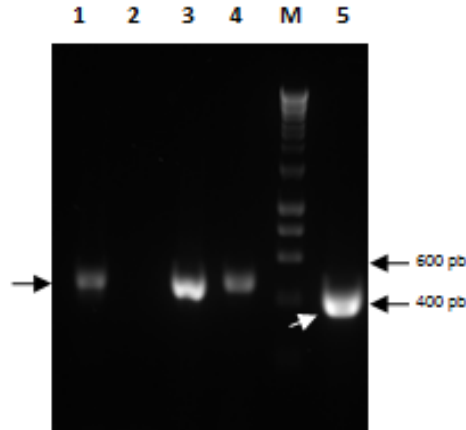
4.8.3 Amplificación de los fragmentos lineales FRL1 y FRL2

Como se describió anteriormente, los tripanosomátidos son deficientes del sistema de reparación canónico NHEJ, sin embargo, poseen el sistema denominado unión final mediada por microhomología (MMEJ), pudiendo de esta manera reparar las rupturas producidas por la endonucleasa Cas9 mediante recombinación homóloga proporcionada por un ADN donante. Por esta razón se diseñaron unos fragmentos lineales con el objeto de co-transfectar con los plásmidos que contienen la Cas9 y los ARNg en un solo paso.

Tras la obtención de los diferentes ARNg, se procedió a la amplificación de las regiones 5' y 3'UTR (regiones no traducidas de los genes) a partir de ADNg de la cepa DM28 de *T. cruzi*. Para ello, se diseñaron dos cebadores PHB1Bsd5'UTRF y PHB1BsdEcoRI5'R los cuales amplificaron un fragmento de ~500 pb aguas arriba del condón de inicio del gen *phb1* denominado región homóloga 1 (HR1). El cebador reverso PHB1BsdEcoRI5'R contuvo un sitio de restricción para la enzima *EcoRI*. Los

cebadores PHB1Bsd3`BamHIF y PHB1Bsd3`UTRR se diseñaron para amplificar la segunda región homóloga de ~500 pb (HR2) ubicada aguas abajo del protoespaciador. El cebador directo PHB1Bsd3`BamHIF tuvo un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI. Continuando con la misma estrategia, se diseñaron los cebadores PHB2Bsd5`UTRF y PHB2BsdEcoRI5`R los cuales amplificaron la región HR1 del gen *phb2*. Los cebadores PHB2Bsd3`BamHIF y PHB2Bsd3`UTRR amplificaron la región HR2. Seguidamente se amplificó el gen *bsd* (confiere resistencia al antibiótico blasticidina) a partir del plásmido pTREXb-tdTOMATO con los cebadores BsdEcoRI5` y BsdBamHIR, los cuales proporcionaron en el extremo 5` el sitio de restricción *Eco*RI y en el extremo 3` el sitio de digestión para la enzima de restricción *Bam*HI.

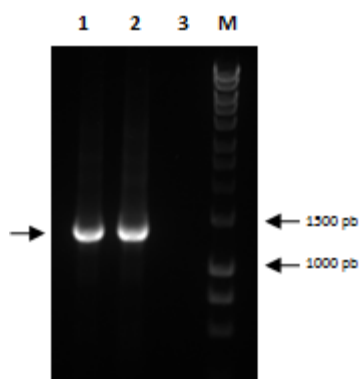
En la **Figura 4.62** se muestra el resultado de las amplificaciones de los fragmentos de ADN HR1 y HR2 aguas arriba y aguas abajo de los genes *phb1* y *phb2* y del gen *bsd* (carril 5). Como se observa, se amplificaron con éxito las regiones HR1 de ambos genes, pero solo la región HR2 del gen *phb2*. Con objeto de amplificar la región HR2 del gen *phb1* se diseñaron otros tres pares de cebadores diferentes, pero ninguno de ellos tuvo éxito en la amplificación de dicha región. Además se intentó amplificar esta región con diferentes combinaciones de los diferentes cebadores diseñados, pero no se obtuvieron fragmentos con los tamaños esperados, motivo por el cual se planteó la posibilidad de que el extremo 3`UTR del gen *phb1* se encontraba anotado incorrectamente en la base de datos TriTrypDB. La edición del gen *phb1* mediante recombinación homóloga, fue por tanto abandonada ante la imposibilidad de amplificar la región HR2 de *phb1*.



Figuras 4.62. Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% de las regiones homólogas (HR) 1 y 2 de los genes *phb1* y *phb2* obtenidas a partir de ADN_g de la cepa DM28c de *T. cruzi*. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); 1: región HR1 del gen *phb1* amplificada con los cebadores PHB1Bsd5'UTRF y PHB1BsdEcoRI5'R; 2: región HR2 del gen *phb1* amplificada con los cebadores PHB1Bsd3'BamHIF y PHB1Bsd3'UTRR; 3: región HR1 del gen *phb2* amplificada con los cebadores PHB2Bsd5'UTRF y PHB2BsdEcoRI5'R; 4: región HR2 del gen *phb2* amplificada con los cebadores PHB2Bsd3'BamHIF y PHB2Bsd3'UTRR; 5: gen *bsd* amplificado a partir del vector pTREXb-tdTOMATO con los cebadores BsdEcoRIF y BsdBamHIR.

Tras la amplificación del fragmento HR1 del gen *phb2*, se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y asimismo el fragmento HR2 se digirió con la enzima *BamHI*. Además, se realizó una doble digestión *EcoRI-BamHI* del fragmento de ADN que contenía al gen *bsd*. Tras la digestión, se ligaron con la enzima T4 ligasa en dos proporciones diferentes 1HR1:1bsd:1HR2 y 3HR1:1bsd:3HR2. Tras la ligación se llevó a cabo una amplificación de los fragmentos ligados mediante PCR. Para poner a punto dicha PCR se realizó un gradiente de temperaturas (56°C a 65°C) y de concentración de iones magnesio (1.5–3.5 mM). Tras ello se determinó que las condiciones óptimas para la amplificación fueron a 62°C y una concentración de 2.5 mM de MgCL₂. Bajo estas condiciones se observó una única banda de ~1.400 pb, cuyo tamaño concuerda con el tamaño esperado. En la **Figura 4.63** se observa el resultado de la amplificación tras la PCR del fragmento lineal denominado

FRL2, el cual contiene las regiones homólogas del gen *phb2* (HR1 + bsd + HR2) de un tamaño de ~1.400 pb.



Figuras 4.63. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de la amplificación del fragmento lineal FRL2 a partir del resultado de la ligación de los fragmentos HR1, HR2 y el gen *bsd*. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); amplificación a partir de los cebadores PHB2Bsd5'UTRF y PHB1Bsd3'UTRR utilizando como ADN molde el resultado de la ligación en las siguientes proporciones 1: FRL2 (1HR1:1bsd:1HR2) y 2: FRL2 (3HR1:1bsd:3HR2) 3: control negativo de la PCR.

Dado que para realizar la transfección de las células se requiere una alta cantidad de fragmento lineal FRL2 25 µg y además se llevó a cabo por triplicado, se procedió a su clonación en el vector pGEM-T Easy. El producto de ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α. Del rastreo de 10 clones mediante PCR de colonia, se obtuvieron 5 positivos (**Figura 4.64**). Todos ellos mostraron un tamaño amplificado de ~1.400 pb que concordó con el tamaño esperado. Para estudios posteriores se escogió al azar el clon 2, al cual se le extrajo ADNp que se usó como molde para la amplificación del fragmento lineal FRL2.

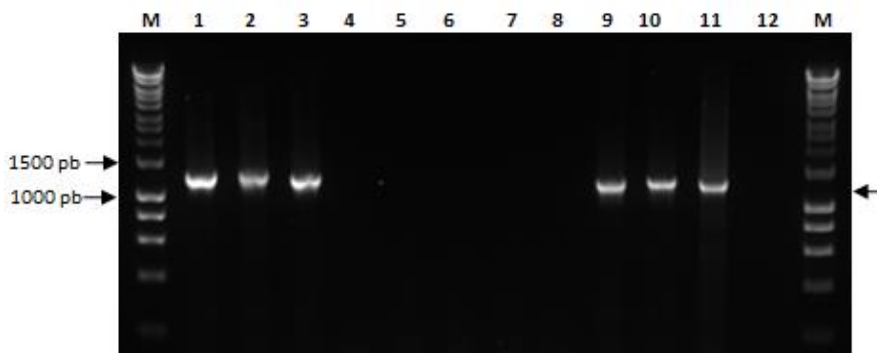


Figura 4.64. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los amplicones obtenidos en el rastreo de los clones de la transformación. El rastreo se realizó con los cebadores PHB2Bsd5'UTRF y PHB1Bsd3'UTRR. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline), 1 al 10: diferentes clones provenientes de la transformación; 11: amplificación del FRL2 a partir del resultado de la ligación; 12: control negativo de la PCR.

4.8.4 Transfección de *T. cruzi* con los diferentes ARNg

Para la interrupción de los genes *phb1* y *phb2* de *T. cruzi* se realizó una transfección en un solo paso añadiendo 25 µg de los plásmidos conteniendo los diferentes guías como se describió en el apartado 4.7.2 de este capítulo. Además, para los plásmidos que contenían los ADN guías 1sgPHB2 y 2sgPHB2 se realizó una co-transfección con 25 µg del fragmento lineal FRL2. En teoría, este fragmento, a través de la recombinación homóloga se integraría en el *locus* del gen *phb2*, permitiendo una selección de los parásitos transfectados en un menor tiempo al existir la posibilidad de la selección doble gracias al gen de resistencia *bsd*. Todas las transfecciones se realizaron por triplicado, además se utilizaron como controles las transfecciones negativas empleando PBS y con el plásmido ScCas9.

Tras la transfección, se seleccionaron los parásitos que portaban los plásmidos de interés durante ~5 semanas, añadiendo 200 µg/ml del antibiótico G418 y 20µg/ml de blasticidina a aquellos parásitos co-transfectados con el fragmento lineal FRL2. Como resultado de la selección se obtuvieron las líneas de

parásitos transfectados *T. cruzi* (1sgCas9PHB1), *T. cruzi* (2sgCas9PHB1), *T. cruzi* (1sgCas9PHB2), *T. cruzi* (2sgCas9PHB2) y los controles *T. cruzi* (ScCas9) y *T. cruzi* DM28c (control de selección). A continuación, se realizaron extracciones de ADNg para comprobar la presencia o ausencia de los genes de estudio. Además se obtuvieron extractos de proteínas totales de cada línea celular a fin de realizar Western blots y comprobar la disrupción completa de los genes *phb1* y *phb2* y por tanto de la eliminación de las proteínas para cuales codifican estos genes.

4.7.4.1 Disrupción del gen *phb1* mediante el sistema CRISPR/cas9

Tras la transfección se rastrearon mediante PCR 20 clones de la línea *T. cruzi* (1sgCas9PHB1) y otros 20 clones de la línea *T. cruzi* (2sgCas9PHB1) usando los cebadores PHB1F y PHB1R. Como se muestra En la **Figura 4.65** todos los clones seleccionados fueron positivos y tuvieron el tamaño esperado, el cual era de ~819 pb.

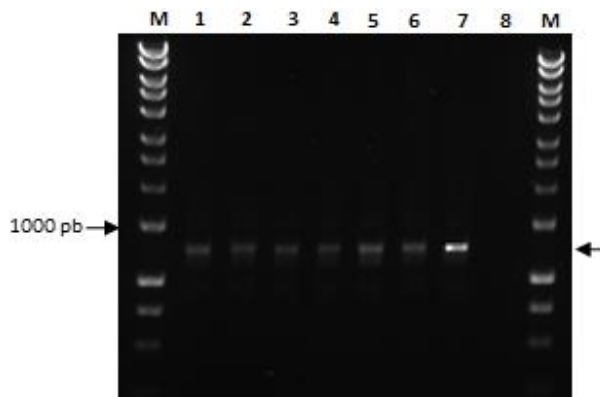


Figura 4.65. Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% de los amplicones obtenidos tras la amplificación del gen *phb1* con los cebadores PHB1F y PHB1R. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline), 1 al 6: diferentes clones amplificados; 7: amplicón obtenido a partir de ADNg; 8: control negativo de la PCR.

Debido a que las líneas de parásitos transfectados *T. cruzi* (1sgCas9PHB1), *T. cruzi* (2sgCas9PHB1) no se co-transfectaron con un fragmento lineal, las

posibles mutaciones producidas podían ser de tamaño pequeño como inserciones o deleciones y como consecuencia no se observarían cambios en el tamaño del gen. Por este motivo, tras la extracción de ADNg los amplicones fueron secuenciados con objeto de determinar si existía alguna mutación con respecto al gen de origen. El resultado que se obtuvo fue que no se encontró ninguna mutación, deleción o inserción en el gen *phb1*. Lander, N. et al (2016) reportaron que al transfectar células de *T. cruzi* con el vector pTREX/cas9 conteniendo los ARNg que tenían como diana a los genes *prf1* y *pfr2* (*paraflagellar rod*), no detectaron ninguna mutación, pero observaron el efecto de la falta de las proteínas PFR1 y PFR2, que en su caso fue el desligamiento del flagelo del cuerpo del protozoo. Este hecho nos animó a seguir analizando el fenotipo de las células transfectadas.

Para comprobar si a pesar de no encontrar ninguna mutación había una disminución de la expresión de la PHB1 se seleccionaron 10 clones de las líneas *T. cruzi* (1sgCas9PHB1) y *T. cruzi* (2sgCas9PHB1), se obtuvieron extractos de proteínas totales y se realizaron análisis de la cantidad de proteína PHB1 mediante la técnica de Western blot. En la **Figura 4.66** se muestra el resultado de la detección de la PHB1 de algunos clones de *T. cruzi* (1sgCas9PHB1) y *T. cruzi* (ScCas9). Se observó una diferencia significativa en el nivel de expresión del clon 1 de la línea (1sgCas9PHB1) con respecto al clon 3 *T. cruzi* (ScCas9) que sirvió de control en el experimento de expresión. No obstante, no se observaron diferencias en los niveles de expresión entre los diferentes clones de la cepa *T. cruzi* (2sgCas9PHB1) y el control (resultados no mostrados).

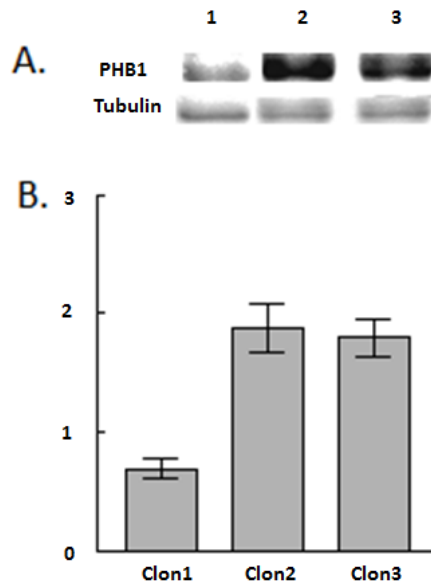


Figura 4.66. Expresión relativa de la PHB1 frente a la expresión de la tubulina de diferentes clones en el estadio de epimastigotes de la cepa *T. cruzi* (1sgCas9PHB1). Los cálculos de expresión relativa (panel B) se realizaron a partir del área e intensidad de las bandas obtenidas (Quantiscan V.1.25) en los ensayos de Western blot del panel A. 1, 2: diferentes clones de la cepa *T. cruzi* (1sgCas9PHB1); 3: cepa *T. cruzi* (ScCas9) (control).

Con el fin de comprobar el papel de la PHB1 en *T. cruzi*, se seleccionó el clon 1 ya que mostró una expresión de la PHB1 menor que el resto. Como se describió en el apartado 4.7.8 de este capítulo, mediante el marcador de oxidación DCF, se determinó los niveles de fluorescencia con el citómetro de flujo, tras someter a al cultivo a un estrés con especies reactivas de oxígeno.

En la **Figura 4.67** se presenta el análisis de los resultados obtenidos tras las medidas realizadas con el citómetro de flujo. En el **panel A** se muestran las medidas de DCF en presencia y en ausencia de H_2O_2 en cada línea celular. Mientras que en el **panel B** se muestra la intensidad media de fluorescencia (MIF) de la tasa de cambio del DCF de las muestras tratadas y no tratadas. Comparando las líneas celulares (1sgCas9PHB1) y el control *T. cruzi* (ScCas9) con el test LSD Fisher (ANOVA) $p < 0.05$, se observaron diferencias

significativas entre las mismas. Esto sugiere que las líneas celulares que poseen una disminución de la PHB1 son menos resistentes a condiciones de estrés oxidativo en comparación con el control. Estas observaciones complementan a los resultados obtenidos con la línea celular que sobreexpresó a la PHB1 en *T. cruzi*; corroborando de esta manera que la PHB1 tiene un papel protector frente a ROS.

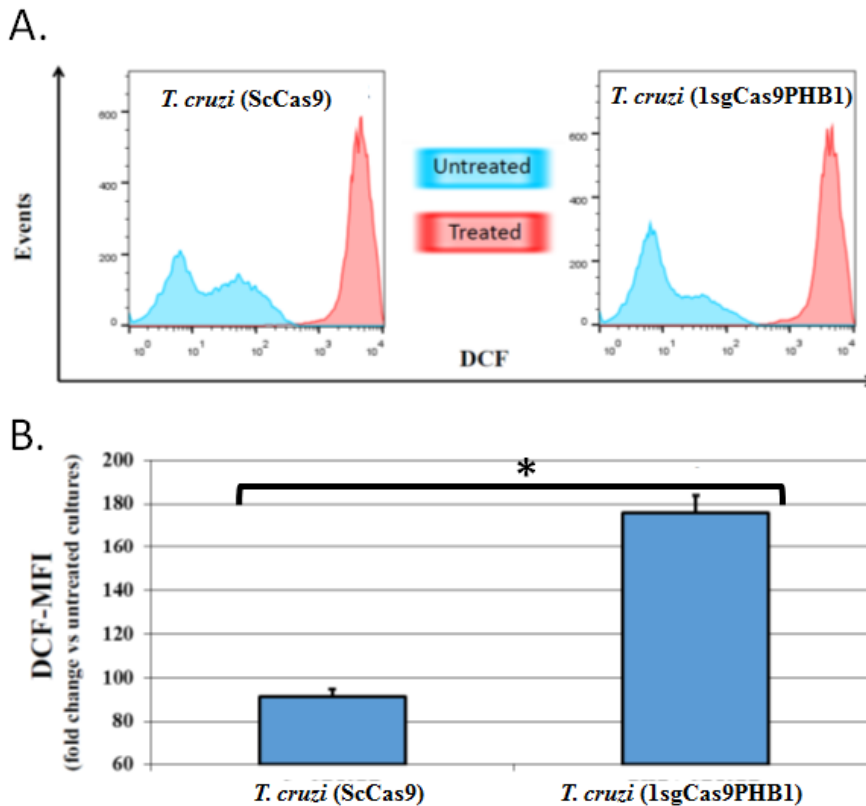


Figura 4.67. Análisis de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo de las distintas línea celulares *T. cruzi* (pTAPHB1), *T. cruzi* (pTAPHB2) y *T. cruzi* (pTAP) marcadas con la sonda DCFDA e incubados con H₂O₂. Panel A: medidas obtenidas con la sonda DCF en los flagelados tratados con H₂O₂ y no tratadas de cada clon. Panel B: análisis de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la tasa de cambio de DCF de las células tratadas y no tratadas. El test LSD Fisher (ANOVA) p<0.05 se utilizó para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes clones (*).

4.7.4.2 Disrupción del gen *phb2* mediante el sistema CRISPR/cas9

Debido a que los clones de *T. cruzi* (1sgCas9PHB2) y *T. cruzi* (2sgCas9PHB2) debían incorporar por recombinación homóloga al fragmento lineal HRL2, tras una extracción de ADNg como se describió en el apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos, se realizó un análisis por PCR con el fin de corroborar la incorporación del gen de resistencia a la blasticidina en el genoma de los clones. En este análisis se realizó el rastreo de 30 clones (15 representantes de cada guía). En la **Figura 4.68** se muestra el resultado de la amplificación por PCR de los genes *phb2* y *bsd* en algunos de los clones analizados. Como se observa en la Figura, dos clones de la línea celular *T. cruzi* 1sgCas9PHB2 incorporaron el fragmento HLR2, uno de ellos homocigótico y el otro posiblemente en heterocigótico, ya que los flagelados del primer clon murieron 6 días después de la realización de la PCR y los del segundo clon murieron 14 días después. Los clones que no incorporaron el fragmento FRL2, sobrevivieron. Estos resultados, nos sugieren que la falta de gen *phb2* y su producto PHB2, es letal para el parásito. Previamente a la muerte total de los parásitos, algunos de los parásitos homocigóticos fueron fijados para microscopía electrónica. Las muestras se incluyeron en resina Epon y se prepararon para su observación en el microscopio electrónico de transmisión.

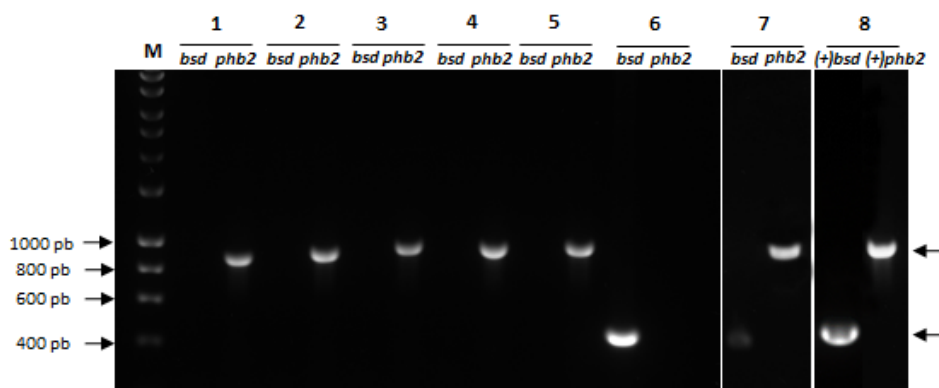
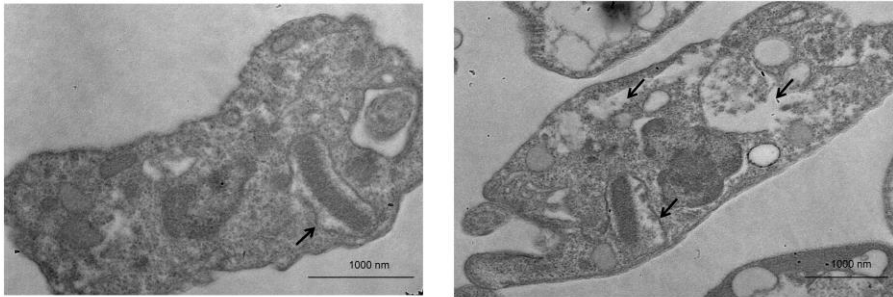


Figura 4.68. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los amplicones obtenidos tras el reemplazamiento del gen *phb2* y la incorporación del fragmento lineal FRL2. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline), 1 al 7: diferentes clones amplificados con dos juegos de cebadores diferentes para la amplificación de los genes *phb2* y *bsd*; 8: controles positivos de la PCR.

En la **Figura 4.69** muestra el resultado fenotípico de la disrupción del gen *phb2* mediante el sistema CRISPR/Cas9 en los parásitos *T. cruzi* (1sgCas9PHB2) (**panel A**) comparado con el control *T. cruzi* (ScCas9) (**panel B**). Tal y como señalan las flechas se observó la formación de un citoplasma vacuolado, quizás como consecuencia de la distensión de las membranas de las vesículas del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, en general aparece un citoplasma laxo y grandes distensiones y herniaciones de la membrana mitocondrial en especial visible en las proximidades de la mitocondria y el kinetoplasto.

A.



B.

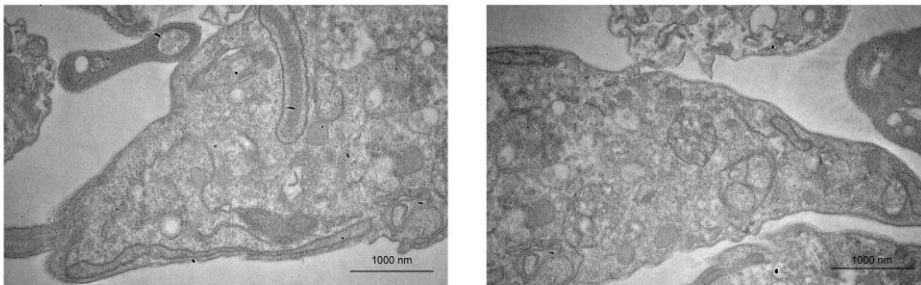


Figura 4.69. Ultraestructura del clon 6 *T. cruzi* (1sgCas9PHB2), el cual incorporó el fragmento lineal FRL2 en homocigosis. Imágenes mediante el microscopio electrónico de transmisión (MET) de: A. *T. cruzi* (1sgCas9PHB2) y B. *T. cruzi* (ScCas9) (control).

4.9 Protección de las PHBs al daño inducido por el H₂O₂

Como se describió en el apartado 1.8 de la Introducción, las PHBs pueden localizarse en el núcleo y sufrir modificaciones postranscripcionales, cambiando su localización. Similar a lo observado por nuestro grupo de investigación en *L. major* donde las PHBs cambian su localización al núcleo en condiciones de estrés oxidativo (161).

En la imagen de microscopía confocal (**Figura 4.25**) las PHBs se encuentran próximas al núcleo y kinetoplasto, sugiriendo que quizás estas proteínas podrían tener un papel de protección del ADN. Para corroborarlo se planteó un experimento similar al descrito por Cruz-Busto, T., et al. (2018) (161), que

consistió en determinar si las PHBs son capaces de proteger al ADN del daño oxidativo con la participación de los iones Fe^{3+} que acomplejan .

Este ensayo consistió en determinar si las PHBs son capaces de proteger al ADN del daño oxidativo producido por el hierro.

Para este ensayo, se añadieron a un volumen final de 25 μl de reacción 10 nM de ADN superenrollado del plásmido pUC19, 50 μM FeCl_3 , junto a 10 mM H_2O_2 y las proteínas (PHB1, PHB2, más un control negativo conteniendo albúmina bovina (BSA)). Cada proteína se ensayó a tres concentraciones distintas (500, 250 y 125 $\mu\text{g} / \text{ml}$) como ya ha sido explicado.

La **Figura 4.70** muestra el ensayo de protección de las PHBs del daño oxidativo producido por el hierro al ADN. El daño en el ADN se observó principalmente cuando estaban presentes conjuntamente cloruro férrico como peróxido de hidrógeno. El control llevado a cabo usando la proteína BSA no mostró ninguna protección del ADN, por lo que se observa un aumento del ADN circular relajado (II) (carriles 8 al 10), mientras las reacciones que contienen a las proteínas recombinantes PHB1 (carriles 2 al 4) y PHB2 (carriles 5 al 7) mantienen la forma superenrollada del ADN plasmídico casi sin ser *nickeado*, similar a la que se observa en el control de ADN plasmídico (carril 1). Al comparar los carriles 2 y 5, ambos contiendo 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada PHB respectivamente, se observó que la PHB2 parece proporcionar una mayor protección al ADN que la PHB1.

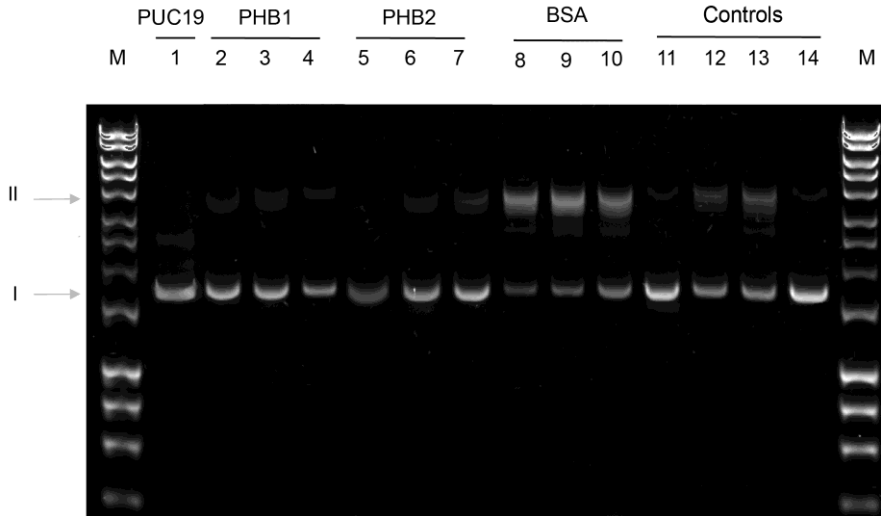


Figura 4.70. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las formas moleculares del plásmido pUC19 tras el ensayo del daño al ADN superenrollado del plásmido. Al lado izquierdo de figura se indican los tamaños de cada una de las formas del plásmido pUC19 (I) superenrollado, (II) lineales de longitud completa. M: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline). Las reacciones contenían ADN plasmídico superenrollado (pUC19) en las siguientes condiciones: 1: solo ADN; 2 al 4: ADN más 50 μM de FeCl_3 , 10 mM de H_2O_2 y concentraciones decrecientes de la proteína PHB1 (500, 250 y 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 5 al 7: ADN más 50 μM de FeCl_3 , 10 mM de H_2O_2 y concentraciones decrecientes de PHB2 (500, 250 y 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los controles, además de contener pUC19 se le añadieron los siguientes componentes: 8 al 10: ADN más 50 μM FeCl_3 , 10 mM H_2O_2 y concentraciones decrecientes de BSA (500, 250 y 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 11 al 12: cada reactivo solo, FeCl_3 y H_2O_2 respectivamente; 13: mezcla de FeCl_3 y H_2O_2 ; 14: la mezcla PHB1 y PHB2.

En la **Figura 4.71** se presenta un experimento similar realizado con las PHBs de *T. cruzi*, que ya se encuentra publicado por Cruz-Bustos, T. et al. (2018) (161) donde se muestra como también las PHBs de *L. major* participan igualmente en la protección del ADN frente a ROS, los cuales son capaces de *nickear* el ADN. En este caso se observó una mayor diferencia entre las concentraciones ensayadas de las proteínas de *L. major*, PHB1 (carriles 2 al 4) y PHB2 (5 al 7); la mayor protección del ADN, fue en aquellas en la que las muestras se les agregaron 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la PHB1. De igual manera, se observó

la protección del ADN frente al estrés oxidativo en aquellas muestras a las que se agregó la proteína PHB2 la concentración de 500 y 250 $\mu\text{g/ml}$.

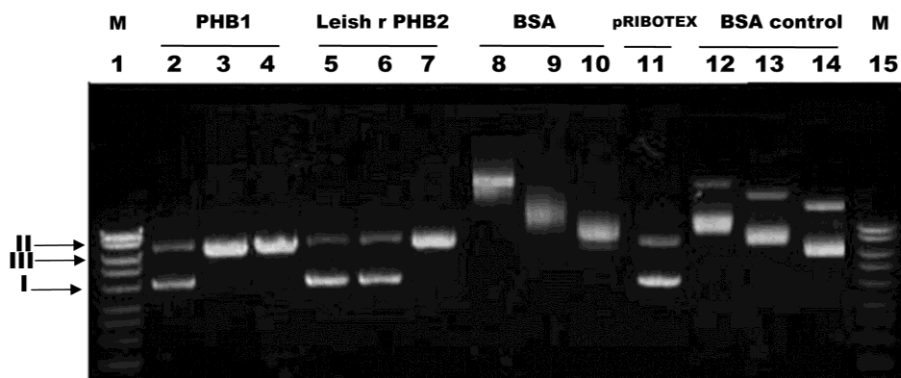


Figura 4.71. Resultado del ensayo de relajación del ADN superenrollado. Al lado izquierdo de Figura se indican las posiciones del plásmido pRIBOTEX (I) superenrollado, (II) lineales de longitud completa y (III) circulares relajadas. 1 y 15: Marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); 2 al 4: ADN más 50 μM de FeCl_3 , 10 mM de H_2O_2 y concentraciones decrecientes de la proteína PHB1 de *L. major* (500, 250 y 125 $\mu\text{g/ml}$); 5 al 7: ADN más 50 μM de FeCl_3 , 10 mM de H_2O_2 y concentraciones decrecientes de PHB2 de *L. major* (500, 250 y 125 $\mu\text{g/ml}$). Los controles además de contener al plásmido se añadieron los siguientes componentes; 8 al 10: ADN más FeCl_3 50 μM y H_2O_2 10 mM y BSA decreciente (500, 250 y 125 $\mu\text{g/ml}$); 11: solo ADN; 12 al 14: ADN con diferentes concentraciones de BSA (500, 250 y 125 $\mu\text{g/ml}$) (control negativo).

Estos experimentos nos muestran que tanto las PHBs de *T. cruzi* como las de *L. major*, poseen la capacidad de proteger el ADN frente a la oxidación y en ambos casos es la PHB2 la que posee una mayor capacidad de protección.

4.10 Capacidad Antigénica de la proteína recombinante PHB2 de *T. cruzi* en el potencial diagnóstico de pacientes chagásicos.

La búsqueda de nuevos antígenos capaces de ser usados en el diagnóstico inmunológico de la enfermedad de Chagas es una constante en todos los trabajos de proteómica en los que se manejan tanto proteínas nativas como recombinantes, a fin de buscar nuevos blancos de diagnóstico con mayor

sensibilidad y especificidad y que puedan permitir a ser posible un mejor análisis del pronóstico de dicha enfermedad. Debido a esto, se planteó como objetivo determinar la antigenicidad de las proteínas de estudio y su potencial utilización como antígenos diagnósticos de pacientes chagásicos.

Para este estudio se utilizó solamente la PHB2 ya que el anticuerpo obtenido frente a la PHB1 recombinante, en experimentos previos, mostró baja especificidad al dar reacciones cruzadas con *L. major*, parásito que comparte áreas geográficas de infección con *T. cruzi*.

Tras expresar y purificar la proteína recombinante PHB2 en *E. coli* como se describió en el apartado 3.10.4 de Materiales y Métodos, se sensibilizaron con 5 µg de proteína recombinante por cada pocillo. Tras el bloqueo de los pocillos con tampón de bloqueo, se añadieron como anticuerpo primario los sueros de los pacientes chagásicos a diferentes diluciones, posteriormente incubándose posteriormente con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, el cual se reveló con la solución de sustrato de la peroxidasa.

En la **Figura 4.72** se muestra el resultado del estudio de la detección de la PHB2 de *T. cruzi* mediante la técnica de ELISA utilizando como anticuerpo primario el suero de 32 pacientes chagásicos procedentes de Argentina, asintomáticos y con diferentes grados de patologías cardíacas (arrítmicos y con insuficiencia cardíaca). El punto de corte utilizado fueron los valores de la media de individuos sanos (controles negativos) más 3 veces las desviaciones estándares obtenidas de las absorbancias de dichos sueros. La técnica de ELISA indirecta mostró una sensibilidad del 93.3% y con un 92.3% de especificidad.

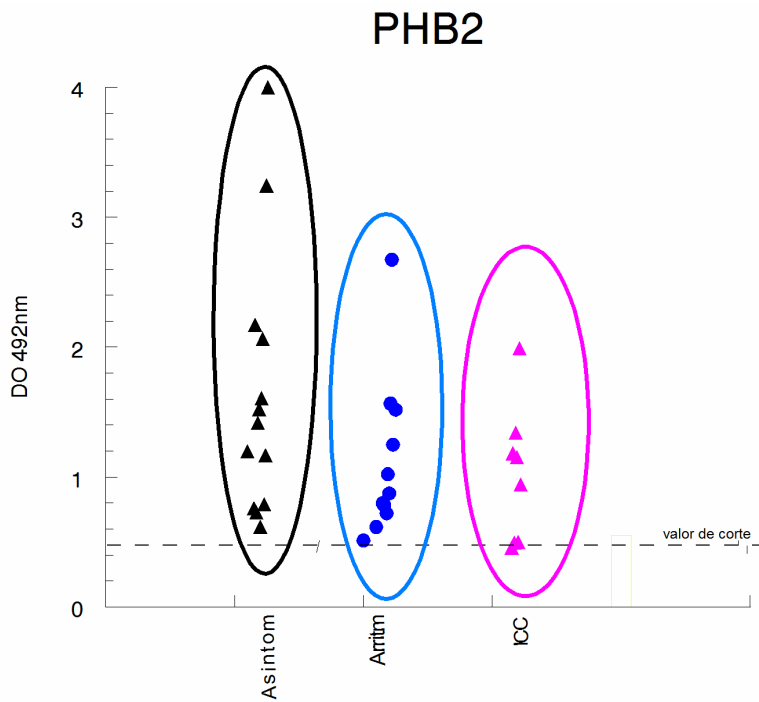


Figura 4.72. Estudio de la detección de la PHB2 de *T. cruzi* mediante la técnica de ELISA utilizando como anticuerpo primario el suero de 32 pacientes chagásicos. En el eje Y se muestran los valores de densidad óptica a 492 nm obtenidos en el ensayo y en el eje X los pacientes positivos para Chagas con diferentes patologías: asintomáticos (ASIN), arrítmicos (ARRIT) y con cardiopatía demostrada (ICC). El valor de corte fue calculado utilizando el promedio de los sueros negativos de 13 personas sanas no chagásicos al que se le suma 3 veces la desviación estándar de dichos sueros, como factor de fiabilidad.

5. DISCUSIÓN

Como es bien conocido, las membranas biológicas, están constituidas por una bicapa lipídica compuesta por fosfatidilcolina, fosfatidil serina, esfingomielina y colesterol, mostrando ciertas diferencias dependiendo de los organismos que se trate, en el caso de los hongos o protozoos como los Kinetopláستidos donde existe ergosterol en lugar del colesterol. Por lo que tanto la composición, como las estructuras de la membrana, son heterogéneas incluso dentro de un mismo tipo de célula. Existen zonas donde el espesor de la membrana varía, haciéndose más estrecha, y denominándose a dichas zonas como balsas lipídicas o dominios Rafts, donde aumenta la concentración de fosfolípidos, proteínas y colesterol o ergosterol (198) lo que hace que dichos dominios presenten más rigidez que el resto de la membrana (199).

Dichas zonas, con una anchura aproximada de 10 a 100 nm (200), son difíciles de visualizar mediante microscopía óptica o incluso aún bajo microscopía electrónica. En dichos dominios residen numerosas funciones biológicas específicas de las membranas como la endocitosis, la homeostasis del colesterol y del calcio, la transducción de señales, transporte y anclaje de la membrana al citoesqueleto (201). A pesar de las dificultades que presentan para su observación, son relativamente fáciles de purificar mediante el uso de detergentes no iónicos en procesos de extracción fría y con ellos purificar las proteínas propias de estos dominios (202,203). En las balsas lipídicas de mayor tamaño se encuentran las caveolas, invaginaciones de 50-100 nm de la membrana plasmática presentes en muchos tipos de células de vertebrados. Las caveolas poseen proteínas tales como la calmodulina y la caveolina que le da nombre a dicha estructura (204,205), de importante funcionalidad biológica como es la transducción de señales, jugando un papel en la endocitosis, la captura y fagocitosis de bacterias y de virus (206) y algunas de ellas como la calmodulina presente en las exovesículas que segregan las células.

Muchas de las proteínas que se encuentran en las balsas lipídicas comparten un dominio en su secuencia, denominado como dominio PHB o SPFH o Band7, que da nombre a la superfamilia al que pertenecen las prohibitinas (148,207), proteínas objeto de este estudio. Dentro de esta superfamilia también encontramos a las erlinas (132,148), estomatinas (208), flotilinas(209), Hflk/C (210), vacuolinas (209), entre otras. La prohibitina 1 (PHB1) fue la primera en ser estudiada, por lo cual se le denominó a dicho motivo PHB y se le atribuyó la capacidad anti-proliferativa. Hoy en día, esta actividad se le atribuye al extremo 3' UTR del ARNm del gen *phb1*, no a la proteína en sí (207). Las PHBs constituyen un grupo de dos proteínas altamente conservado entre las diferentes especies, encontrándose las desde levaduras hasta la especie humana (150), incluyendo a los protozoos kinetoplástidos como *T. brucei* (156), *L. donovani* (160) o *L. major* (161). A dichas proteínas se les han atribuido funciones biológicas diferentes y procesos patológicos desde la inflamación (211), el envejecimiento (212), el desarrollo y proliferación de tumores (213), la estabilización de las membranas mitocondriales (151) o participando en la inducción de la apoptosis (214).

A pesar de haberseles atribuido esta variedad de funciones, su papel biológico exacto aún no está del todo claro, si bien podría considerarse que poseen una funcionalidad pleiotrópica. Se las ha descrito con una localización mitocondrial predominante, actuando a modo de chaperonas unidas a las membranas mitocondriales, formando complejos que permiten la estabilización de las membranas del orgánulo (157). Además, se las ha descrito en el núcleo y en la membrana plasmática (138,145,155). Las prohibitinas que se encuentran en membranas se las ha relacionado con la regulación de la señalización celular de los diferentes transportadores de membranas; las que se encuentran en el núcleo podrían controlar la activación de la transcripción y el ciclo celular, mientras que las descritas que tienen una localización mitocondrial, además de la estabilización de las membranas

mitocondriales, podrían formar complejos con el ADN mitocondrial estabilizándolo y modulando la dinámica, la morfología, y biogénesis mitocondrial, así como la vía apoptótica intrínseca de las mitocondrias (150,151,185,215). Se ha descrito cómo estas proteínas cambian su localización, desplazándose al núcleo desde las mitocondrias (155,216), o a las membranas celulares, fenómeno descrito por nuestro grupo de investigación en *L. major* al someter a los protozoos a un estrés oxidativo (161).

Si bien se han estudiado las prohibitinas en otros tripanosomátidos, no existían hasta este momento referencias de la presencia de dichas proteínas en *T. cruzi*. El estudio de su presencia y funcionalidad en este kinetoplástido ha sido el objeto del presente trabajo de Tesis Doctoral. El estudio bioinformático realizado con las secuencias de ambas PHB mostró que la proteína PHB1 en *T. cruzi* es una proteína de 30.9 kDa, codificada por un ORF de 819 pb que posee un segmento transmembrana entre los aminoácidos 9 y 27, que carece de péptido señal y de sitio de unión a GPI, tal y como estaba descrito para la PHB1 en *L. donovani* (160). Por otro lado, la proteína PHB2 es un polipéptido de 33.2 kDa, codificado por una ORF de 921 pb que tiene un dominio transmembrana entre los aminoácidos 27 y 44. Ambas proteínas poseen el extremo N-terminal dirigido hacia en el citoplasma celular, mientras el extremo C-terminar se dirige al espacio extracelular al igual que fue descrito en las PHBs de levaduras (157) y en las PHBs humanas (143). De forma esquemática ambas proteínas tendrían un modelo topológico en las membranas celulares (**Figura 4.2**), donde la parte hidrofóbica de la proteína se insertaría entre la bicapa lipídica de las membranas.

El estudio de las secuencias y en particular el estudio tanto de los sitios de unión a Fe^{3+} , así como de las modificaciones postraduccionales, evidenciaron que los residuos aminoacídicos E199 y Q202 de la PHB1 de *T. cruzi* son capaces de ligar el catión. Esta proteína, posee 2 sitios de miristilación, 1 de

palmitoilación, 14 lugares de fosforilación y 2 potenciales sitios de glicosilación, y que al compararse con la PHB1 humana, muestra como ambas poseen igual número de sitios de miristilación y glicosilación y un lugar más de fosforilación, no apreciándose ningún sitio de palmitoilación a diferencia de la PHB1 del parásito. No obstante, en la PHB1 humana se aprecian 4 posibles sitios de unión al hierro.

La PHB2 del parásito, posee dos posibles sitios de unión a Fe^{3+} en los motivos E134-E137 y E222-E225, a diferencia de la PHB2 humana que posee tan solo uno. En la PHB2 de *T. cruzi* se observan 6 sitios de miristilación, 17 de fosforilación (uno de ellos en una tirosina próxima al lugar de fijación del metal, lugar interesante dado que pudiera tener importantes implicaciones funcionales al fosforilarse), 2 de glicosilación, igual que en la humana, mientras que en la PHB2 humana se observan 3 sitios de miristilación, 16 de fosforilación (1 de ellos próximo también al lugar de fijación del catión) y 2 de glicosilación, pero solo un sitio de unión a hierro. Cabe destacar por lo tanto, que los sitios de las modificaciones postranscripcionales son en su mayoría distintos entre las PHBs de *T. cruzi* y las PHBs humanas.

La palmitoilación como modificación postranscripcional, es un mecanismo importante para regular la localización subcelular de las proteínas, la estabilidad, el tráfico, la translocación a las balsas de lipídicas. La palmitoilación hace que las proteínas se agreguen a la membrana con el grupo acilo hacia la cara citoplasmática, facilitando tanto la agregación como la interacción con efectores y otros aspectos funcionales de las proteínas (217). De igual forma que la miristilación, la palmitoilación podría participar en la localización subcelular de las proteínas, facilitando las interacciones proteína-membrana, especialmente en el Retículo Endoplasmático (RE) o en el núcleo y participando en las interacciones proteína-proteína como se encuentra descrito la formación de complejos entre las PHBs (218).

Respecto al posible papel de la fosforilación de las PHBs por parte de las quinasas (PKC y PKA), su papel en la funcionalidad, así como las enzimas involucradas, por el momento siguen sin estar del todo claras. Se ha sugerido que la fosforilación de las PHBs es uno de los mecanismos potenciales para la regulación de sus funciones (219). La posibilidad de la fosforilación, explicaría que las PHBs tengan funciones fuera de la mitocondria y puedan actuar como una proteína multifuncional al activar el PI3K/Akt y el Ras/MAPK/ERK, como vías de señalización intracelular importantes en la regulación del ciclo celular (220). Recientemente se ha publicado que cuando la ArK fosforila la PHB1, se promueve la diseminación por metástasis de tumores de próstata y vejiga urinaria (221). Por todo ello las PHBs podrían participar en las cascadas de señalización en procesos versátiles, que divergirían en el lugar de la fosforilación en la secuencia por parte de la tirosina quinasa, por lo que estarían involucradas en el metabolismo, la proliferación y el desarrollo tumoral (222). De igual manera se ha sugerido que la fosforilación de la PHB2 es necesaria para la actividad biológica en esta proteína (223) participando incluso en la anulación de la transcripción en los ciclos circadianos de las células, por su interacción con la caseína quinasa 1 (224).

Los lugares de actuación y los mecanismos biológicos en los que están involucradas las PHBs son diversos, se ha propuesto y a modo de ejemplo, como la ubiquitinación de las PHBs en los espermatozoides, es uno de los mecanismos reconocibles por la maquinaria del proteosoma del ovocito fecundado dependiente de ubiquitina-proteasoma para la eliminación de las mitocondrias paternas, y así promover la herencia única del ADN mitocondrial de origen materno (225).

La localización y la participación de las PHBs a nivel celular, constituye un tema de gran interés, dadas las controversias existentes en la bibliografía en base a su localización. Mientras, que para algunos autores, son proteínas

exclusivamente mitocondriales, en especial la PHB2 (226), otros autores las han descrito como proteínas capaces de translocarse al núcleo (161), actuar como receptor de estrógenos (227), participar en el control transcripcional (152,216,228), inducir apoptosis (229,230), participar en la senescencia celular al disminuir su contenido y alterar la morfología y funcionalidad de la mitocondria (212,231), así como en la biogénesis de dichos orgánulos (137,157,158,232–235) o incluso migrar al nucléolo, como recientemente se ha descrito, para permitir mantener su estructura y regular la expresión de los ARNm (236). Respecto a la PHB1 la mayor parte de los trabajos la sitúan con una localización mitocondrial, participando igualmente en la biogénesis y funcionalidad de la mitocondria tanto en levaduras (24) como en *Caenorhabditis elegans* (234). En células de mamíferos se la considera reguladora de la angiogénesis y de la senescencia (237).

La formación de complejos entre PHB1 y PHB2 ha sido descrito en *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans* y en las células humanas, ensamblándose ambas proteínas en un complejo en forma de anillo de 20 a 25 nm, en la membrana interna de la mitocondria (141,151). La falta de una de las prohibitinas conlleva a la no formación del complejo (94,137,212,238,239) provocando una alteración de la morfología de la doble membrana mitocondrial y de las crestas mitocondriales (151). El anillo que forman las PHBs se une a la proteasa m-AAA, por lo que se vincula dicho anillo con la función de estas proteínas en el recambio de proteínas de membrana interna mitocondrial, lo que haría que las PHBs actuaran como una chaperona (157,240).

Con todo ello, y a fin de poder estudiar la localización de las PHBs en *T. cruzi*, así como los niveles de expresión en los diferentes estadios del ciclo biológico del tripanosomátido, fue necesario obtener anticuerpos altamente específicos que nos permitieran poder llevar a cabo los estudios de localización y expresión de estas proteínas en el parásito.

En base a los resultados del estudio comparativo del genoma en los tripanosomátidos (*T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*) en el proyecto Tritryp y la publicación del primer genoma secuenciado de *T. cruzi* (37), se pudieron conocer los genes ortólogos y los altamente específicos existentes en los tres tripanosomátidos y crear con ello, una base de datos de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

El análisis del genoma de las secuencias en los organismos modelo permitió corroborar el contenido de genes y la arquitectura del genoma de las tres especies. Los tres genomas muestran una notable sintenia de aproximadamente 6.200 genes, de los cuales el 94% están dispuestos en grupos sinténicos direccionales. Dentro de dichos genes sinténicos se encuentran los genes *phb* correspondientes a las Prohibitinas. Las secuencias de dichos genes nos permitieron diseñar los cebadores para poder llevar a cabo las amplificaciones necesarias para la clonación y expresión de los genes de ambas proteínas.

El gen *phb1* de *T. cruzi* fue clonado en los vectores de expresión pQE30-Xa y pET-41c mientras que el gen *phb2* de *T. cruzi* fue clonado solo en el vector de expresión pQE30-Xa, tal como se detalla en el apartado 4.1.2 de Resultados. En el vector pQE30, las proteínas recombinantes se expresarían como una proteína de fusión conteniendo un *tag* de 6 Histidinas, que permitiría su purificación en una columna de Ni²⁺, mientras que en el segundo la proteína recombinante se expresaría como proteína de fusión a la GST de 220 aa, también purificable mediante una matriz cromatografica conteniendo en este caso glutatión ligado a la sefarosa. Ambas estrategias de expresión fueron llevadas a cabo con éxito como se muestra en los Western blots de la **Figura 4.29** del apartado de Resultados. Tras la inducción de la expresión de la proteína recombinante con IPTG, se comprobó cómo la solubilización con 6 M de Urea de los cuerpos de inclusión procedentes de la transformación

bacteriana con el vector pQE30-Xa, permitía la purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad en las columnas de Níquel pero no se consiguió obtener fracciones puras de la proteínas de interés. Por ello, se procedió a una purificación mediante electroforesis para posteriormente eluir las bandas de ~33 kDa y de ~35 kDa correspondientes a la PHB1 y PHB2 respectivamente, con las que se inmunizaron diferentes animales. Transcurrido el tiempo de inmunización y comprobado el título de anticuerpos se determinó, mediante ELISA e Inmunoblots, que el título de los sueros obtenidos en ratas fue de 1:6.500 para el inmunosero anti-PHB1 y de 1:17.000 para el obtenido para la PHB2 y que el suero obtenido en ratones fue de 1:6.500 para la anti-PHB2, títulos de anticuerpos específicos suficientemente elevados como para poder llevar a cabo los experimentos programados.

El posterior Western blot usando dichos anticuerpos para comprobar la especificidad de los anticuerpos obtenidos, se muestra en la **Figura 4.16** de Resultados, donde se comprueba la ausencia de reconocimiento de otras proteínas del protozoo, lo que nos permitió continuar con los experimentos de expresión e inmunolocalización previstos.

Los ensayos llevados a cabo para ver la especificidad de los anticuerpos obtenidos, enfrentándolos a las PHBs de otros tripanosomátidos o de las células de mamífero, permitió comprobar que el anticuerpo frente a la PHB1 recombinante reconoció a la PHB1 nativa de *T. brucei* y a la de *L. major*, pero no se visualizó reacción cruzada con los extractos de las proteínas totales en células Vero. Por el contrario, los anticuerpos obtenidos frente a la PHB2 reconocieron a la PBH2 de *T. brucei*, pero no a la PHB de *L. major* o de las células de mamífero. Hay que hacer constar que el reconocimiento de una sola banda de los dos inmunoseros, descarta el reconocimiento de las otras proteínas de la familia PHB o superfamilia SPFH que comparten el dominio conservado PHB/Band7/SPFH, donde se incluyen como se ha mencionado

antes a la Estomatina, Flotillin , Erlina, HfIK/C o Podocina, además de las propias prohibitinas. Todas ellas son proteínas ancestrales, muy conservadas en la escala evolutiva (132,142,154) y se encuentran presentes en todas las células. Esto implica que dicho motivo, no debe ser considerado como “extraño” por parte del sistema inmune, lo cual explicaría la falta de reconocimiento antigénico y la razón por la que no levanta respuesta inmune.

Por otra parte, la alta identidad en las secuencias de las PHBs encontrada en los análisis *in silico*, entre los diferentes tripanosomátidos, donde la PHB1 de *T. cruzi* posee un 84% de identidad con la PHB1 de *T. brucei* y 80-81% con las PHB1 de las especies del género *Leishmania* estudiadas (161), y la alta identidad de la PHB2 de *T. cruzi* que comparte el 83% con la PHB2 de *T. brucei*, pero sólo el 74% con la de *Leishmania*, podría explicar el comportamiento en el reconocimiento con los anticuerpos obtenidos frente a las dos proteínas recombinantes de *T. cruzi*. Sin embargo, la identidad de la PHB1 de *T. cruzi* con la PHB1 humana fue de tan sólo del 48% y del 47% para la PHB2, lo que hace suponer que los anticuerpos generados, aun siendo policlonales, están dirigidos a epítomos no comunes de las PHBs de ambas especies.

La antigenicidad de la PHB2 recombinante procedente de *T. cruzi*, frente a los sueros de pacientes, fue demostrada cuando dicha proteína se enfrentó a sueros de pacientes chagásicos con patología cardíaca, comprobándose cómo todos los sueros de los pacientes reconocieron a dicha proteína. En todos los casos se obtuvieron valores de absorbancia superiores a los valores de corte obtenidos con los sueros de individuos no chagásicos. Dicho antígeno dió unos valores de sensibilidad del 93.3% y una especificidad de 92.3% para la prueba de ELISA. Es por ello que quizás las PHBs de *T. cruzi*, podrían tener un valor diagnóstico similar al descrito por Días, D., et al. (2018) (241) para la leishmaniasis visceral. Estos autores, en lugar de usar la PHB2, como ha sido nuestro caso, usaron la PHB1 recombinante procedente de *L. infantum* en el

diagnóstico inmunológico para la leishmaniosis visceral canina y humana, y propusieron a esta proteína como buena candidata para el desarrollo de vacunas frente a *Leishmania*.

Los niveles de expresión de ambas proteínas en las diferentes formas del ciclo biológico del parásito, mostraron que las formas **epimastigotas** fueron las que presentaron mayores niveles de expresión y los **amastigotes**, las formas donde se obtuvieron los menores niveles de síntesis de ambas proteínas. Los niveles de expresión para la PHB1 fueron mayores en todos los casos que los que se obtuvieron para la PHB2.

Las diferencias de expresión entre las diferentes formas del ciclo biológico del parásito podría explicarse en función de lo descrito en mamíferos, donde existen niveles de expresión diferente de las dos prohibitinas, dependiendo de la capacidad de multiplicación, actividad celular del tejido y del tipo celular (17,42), lo que daría sentido a los diferentes niveles de expresión que se obtuvieron entre las diferentes formas del parásito.

Es conocido que la regulación transcripcional en tripanosomátidos es diferente a la que ocurre en eucariotas superiores. Debido a que su genoma se transcribe constitutivamente en transcripciones primarias policistrónicas largas, los ARNm para genes codificantes de proteínas deben procesarse a través de *trans-splicing* y poliadenilación. Los ARNm también deben interactuar con diferentes factores proteicos en una compleja maquinaria reguladora post-transcripcional, que determina los niveles del producto proteico final, de acuerdo con las demandas celulares del parásito en las diferentes fases de su ciclo de vida. Así como mediante la estabilidad del ARNm, al interaccionar con las proteínas que se unen a elementos en *cis* en las regiones 5' y 3' del ARNm o por la eficiencia de la traducción cuando éste se encuentra en los ribosomas (242). Por Todo ello se considera que la regulación génica en *T. cruzi* es post-transcripcional (243).

Con objeto de complementar y corroborar la información obtenida sobre la expresión de las PHBs a nivel de proteína, entre las formas **epimastigotas** y **tripomastigotas**, se realizaron estudios de la expresión de los genes *phb1* y *phb2* mediante la técnica RT-qPCR, usando la amplificación del ADN copia (ADNc) generado a partir de los ARNm. Dicho estudio confirmó que los niveles de expresión de los ARNm para la PHB1 y PHB2 fueron similares en cada una de las dos formas analizadas, pero la síntesis del ARNm fue como tres veces mayor en las formas **epimastigotas** que en las **tripomastigotas**, semejante a los diferentes niveles de expresión que se observan entre las diferentes células de mamíferos correspondientes a distintos tejidos.

Sin embargo cuando se estudiaron los niveles de expresión a nivel de proteínas de las PHBs, mediante el reconocimiento con los anticuerpos, la aparente homogeneidad de la cuantificación encontrada en los ARNm específicos para las dos prohibitinas desaparece, mostrando que los niveles funcionales de expresión para ambas proteínas en cada una de las formas del parásito. Lo que entendemos constituyen modificaciones postranscripcionales de las proteínas.

T. cruzi posee una gran diversidad genética que en la actualidad se divide en seis Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) (TcI-TcVI), clasificados en función de su estructura poblacional, diferencias biológicas más relevantes y marcadores moleculares (45). Con objeto de obtener información sobre la expresión de las PHB1 y PHB2 en los diferentes DTUs de *T. cruzi* se analizó la expresión de la PHB1 y PHB2 en las formas **epimastigotas** de diferentes DTUs, usándose como control, los niveles de expresión para la tubulina (*housekeeping*). Entre las distintas DTUs se pudieron observar diferencias relativas en la expresión de la PHB1, pero sin embargo dichas diferencias no mostraron valores de expresión estadísticamente significativos (**Figura 4.19**). Sin embargo, la cuantificación relativa de la expresión de la PHB2 (**Figura**

4.20) mostró una mayor expresión en la cepa Y (DTU II) con respecto al resto de DTUs.

Diferencias en los niveles de expresión entre cepas para una proteína o la existencia de un perfil proteico diferente entre las diferentes DTUs ha sido descrito recientemente (244). Estas diferencias de expresión también se encuentran entre clones de *T. cruzi* originarios de una misma cepa, donde incluso se observan estas diferencias en los niveles de expresión entre las proteínas de una misma familia proteica como ocurre con las proteínas MASP (245), lo que viene a demostrar un elevado polimorfismo en la expresión del material genético que las formas **epimastigotas** poseen (246) y que probaría un mecanismo adaptativo a las diferentes y cambiantes condiciones físico químicas y fisiológicas a las que se debe enfrentar el parásito a lo largo de su ciclo biológico, como un potencial mecanismo de supervivencia.

Las PHBs, se las ha relacionado, como antes se ha descrito, con la morfogénesis de la mitocondria (151) al igual que en el control de la proliferación celular (214,247). Diferencias en las tasas de multiplicación y del metabolismo en general han sido también descritas entre las diferentes DTUs, habiendo sido uno de los motivos biológicos por lo que se intentó clasificar y diferenciar genéticamente a las diferentes cepas del parásito (248,249). Týč, J. et al. (2010) (156) demostraron que líneas de *T. brucei* deficientes en PHB1, mostraban alteraciones mitocondriales. Esto sugiere, que al menos en *T. brucei*, esta proteína también formaría parte de la maquinaria necesaria la división del protozoo. En el caso de *T. cruzi* son las formas **epimastigotas** las formas del parásito donde la mitocondria posee una mayor actividad y junto a los **amastigotes** intracelulares constituyen las fases de multiplicación del parásito. Las formas **tripomastigotas** carecen de capacidad de multiplicación, y poseen un metabolismo mitocondrial más reducido, cuando se las compara con las formas **epimastigotas**, quizás por estar condicionadas a encontrarse en su medio natural, la sangre, rica en

glucosa, lo que no ocurre en el intestino medio y posterior del insecto, donde se desarrollan las formas **epimastigotas** y donde los niveles glucosa se agotan rápidamente (250).

Si bien todas las formas del parásito poseen las enzimas del ciclo de Krebs, lo que probaría una mitocondria al menos potencialmente funcional (251) y con un metabolismo energético adaptado a las condiciones metabólicas de cada una de las formas del ciclo de vida del flagelado (251,252). La glucosa se metaboliza en *T. cruzi*, originando por la vía glucolítica la excreción de succinato y L-alanina, incluso en presencia de oxígeno (253); las primeras enzimas de la ruta glucolítica están localizadas en un orgánulo propio de los kinetoplástidos rodeado por una membrana lipídica al que se denomina glicosoma (254). Todas las enzimas de la vía de las pentosas fosfato están presentes en las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito, así como las enzimas gluconeogénicas como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la fructosa-1,6-bifosfatasa, pero si bien están presentes, en todas las formas, no hay polisacáridos de reserva, lo que le obliga al flagelado a la captación y consumo continuo de nutrientes (255).

A pesar de la funcionalidad mitocondrial en las formas **amastigotas** intracelulares, y en las **tripomastigotas**, la morfología mitocondrial varía con respecto a las **epimastigotas**, denotando una menor actividad y debiendo participar en estos cambios morfológicos las chaperonas mitocondriales y porque no las PHBs (256). Es por lo que quizás los niveles de expresión de las PHBs, se encuentren más elevados en las formas **epimastigotas** capaces de soportar un mayor nivel de actividad mitocondrial y proliferativo.

A pesar de los datos anteriormente aportados, pruebas de diferencias de la funcionalidad mitocondrial entre las diferentes DTUs, han sido publicados por Kalem, M., et al. (2018) (249) donde dependiendo del DTU, difieren en los productos catabólicos excretados, el potencial de membrana mitocondrial, en

la diferente morfología mitocondrial entre las DTUs, lo que nuevamente explicaría las diferencias en los niveles de expresión para las PHBs mostradas en nuestros resultados entre las diferentes DTUs. El requerimiento de iones Hierro (Fe) en el medio de cultivo de los tripanosomátidos, y curiosamente en aquellos protozoos carentes de endosimbiontes, ya fue descrito por Chang, K.P. & Trager, W. (1974) (257–259).

Se conoce que las mitocondrias desempeñan un papel clave en la homeostasis del hierro gran parte del cual, va destinado a la síntesis del grupo de Hemo (260). Sin embargo, y a pesar de estar anotadas en la base de datos TritrypDB, muchas de las enzimas que participan en la biosíntesis de esta protoporfirina, tanto *T. cruzi* como *Leishmania* carecen de algunas de las enzimas necesarias para completar dicha síntesis, obligando al parásito a tomarlo desde el medio ambiente donde se desarrolla (261). El grupo Hemo juega un papel fundamental en muchos procesos celulares. Como el transporte de electrones a nivel mitocondrial (Complejo II-IV), la funcionalidad y síntesis de citocromos, la transducción de señales, la transcripción y regulación de enzimas antioxidantes (262). Todo ello obliga a la captación del grupo Hemo por parte del flagelado, como se ha indicado anteriormente, como fuente de hierro, tanto en su hábitat natural como desde el medio de cultivo (263,264). El grupo Hemo, en el caso de *T. cruzi*, activa el enzima Calcio/calmodulina quinasa, miembro de las serina /treonina Quinasas que participa en la multiplicación celular del protozoo (265). La relación de la proteína quinasa IV dependiente del calcio/calmodulina (CaMKIV) con las PHBs, se estableció cuando se determinó que es el enzima que fosforila a la PHB2 en los miocitos (223). Sin embargo a pesar de depender para su crecimiento del grupo Hemo, esta Fe-protoporfirina es capaz de inducir radicales superóxido que van afectar los lípidos de membranas, al ADN y a las proteínas (266).

La inducción de expresión de las PHBs por la presencia del ion Fe^{3+} en el medio de cultivo en células de hepatoma o células epiteliales intestinales, fue

descrito por Ande & Mishra (2011) (267) y recientemente en *L. major* por Cruz-Bustos, T., et al. (2018) (13), donde se comprobó cómo con el Fe^{3+} se induce la síntesis de ARNm de las PHBs, cuando se suplementa el medio con concentraciones crecientes del catión. En el caso de *T. cruzi*, hemos comprobado que la expresión de la PHB1 y PHB2 es igualmente dependiente de la presencia de Fe^{3+} y al igual que lo descrito para *L. major*, los niveles de expresión para la PHB1 fueron menores en presencia del Hierro, que los de la PHB2. Por esta razón podemos considerar que las PHBs de *T. cruzi*, al igual que ocurre en Leishmania y en las células humanas, son proteínas inducibles por el ion, lo que sugiere que las PHBs en el caso de *T. cruzi*, al igual que en los otros modelos biológicos, pueden jugar un papel en la homeostasis y regulación intracelular del metal.

Las PHBs, como hemos comentado anteriormente, en general tienen 4 sitios potenciales de unión al hierro (267–269), mientras que *L. major* (161) al igual que *T. cruzi* tiene solo un dominio capaz de ligar dicho metal. Para el caso de la PHB2, tanto humanos como Leishmania, posee un solo dominio de unión, mientras que en *T. cruzi* en su secuencia muestra dos sitios de unión al Fe. Los motivos de las PHB para ligar el catión (E-D-x-D-E) están presentes en todas aquellas proteínas de bacterias o animales superiores susceptibles de ligar hierro (267–269), si bien el resto de sus secuencias poseen baja o nula homología a las de las PHBs (267,268). La capacidad funcional de las PHBs de unirse al Fe^{3+} ya fue descrita previamente en células hepáticas e intestinales (267) así como en el caso de *L. major* (161).

En las PHBs humanas, al igual que en la PHB2 de *T. cruzi* (**Figura 4.3.**) el dominio de unión a hierro podría ser susceptible de fosforilación. La presencia de potenciales sitios de fosforilación en el dominio de unión de hierro de la PHB2 de *T. cruzi*, sugiere que la proteína puede estar relacionada con procesos de señalización celular. En particular, la potencial fosforilación del residuo de tirosina dentro del lugar de unión al metal podría afectar a la

capacidad para unirse al hierro, regulando así el tráfico intracelular del catión (267). La comprobación experimental de la capacidad de ligar hierro por parte de las PHBs de *T. cruzi*, de forma natural, se llevó a cabo mediante el éxito de la purificación de las PHBs nativas a través de cromatografía de afinidad donde a la matriz cromatografica se le ligó Fe^{3+} . En las purificaciones mostradas en las **Figuras 4.33 y 4.34** de Resultados, se comprueba la presencia mediante Western blots de dichas proteínas en el eluido resultante.

La funcionalidad de las PHBs, especialmente su capacidad de unión al Fe, fue sugerida por Theiss, A., et al. (2007) (270) para la PHB1 y podría estar ligada a la eliminación de los radicales ROS en las células intestinales y en los cardiomiocitos (271), protegiendo a las células del estrés oxidativo. Posteriormente otros autores confirmaron este hecho en otros tipos celulares (159), lo que apoyaría el papel del complejo de las PHBs como un tipo de chaperona tipo holdasa que actuaría en situaciones de estrés mitocondrial en las células de animales superiores (138,231,272). Se considera la reacción de Fenton-Haber-Weiss al proceso mediado por Fe, que convierte el H_2O_2 , producido en el metabolismo normal de la mitocondria, en radicales Hidroxilos altamente tóxicos capaces de alterar las membranas, los ácidos nucleicos e incluso proteínas (273). La participación en dicha reacción de metales como el hierro y el cobre, haría, en el caso del hierro, que este pasara de Fe^{3+} a hierro (II) (Fe^{2+}), formándose especies reactivas que directamente actuarían sobre el material biológico, o en el caso de Fe^{2+} en presencia de H_2O_2 , pasaría a Fe^{3+} más hidroxilos y especies reactivas: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{OH}^-$; $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HOO}\cdot + \text{H}^+$; $\text{OH}\cdot + \text{DNA} \rightarrow \text{H}_2\text{O} +$ rotura de las cadenas (274,275). En este sentido, el efecto protector frente al envejecimiento (234,276) o frente a los radicales superóxido (SO) que ha sido descrito en las PHBs (277), vendría determinado por su capacidad de ligar el metal, secuestrándolo e impidiendo de esta forma su reacción con los peróxidos generados en el metabolismo. Siguiendo la metodología descrita por Cruz-Bustos, T. et al. (2018) (161), y donde en lugar de usar DTT como

donador de iones hidroxilos se usó H_2O_2 , determinando que ambas PHBs protegen del daño ejercido por los radicales libres en el ADN, si bien la PHB2 parece protegerlo en menor medida de lo que lo hace la PHB1. Hay que recordar que la cantidad de iones Fe^{3+} capaces de unirse a la proteína PHB2, es mayor que la que es capaz de ser ligada por la PHB1, con lo que las proteínas actuarían como un “quelante” del metal libre impidiendo su reacción con el H_2O_2 generado en la mitocondria.

En aquellos ensayos en que usamos clones de *T. cruzi* transfectados con los genes de la *phb1* y/o *phb2* y que sobreexpresan dichas proteínas, pudimos comprobar que la fluorescencia generada por la sonda DCFDA (2',7'-Dichlorodihidrofluorescein di-acetato), marcador que queda atrapado en el interior del citoplasma por la acción de las esterasas y que en presencia de H_2O_2 fluoresce (85), fue menor que en las cepas salvajes. Por el contrario, en la cepa donde se redujo la expresión mediante el sistema CRISPR/Cas9 del gen *phb1*, la fluorescencia generada por el oxidante fue aproximadamente el doble de la que produce la línea transfectada con el vector vacío considerada control. Este mecanismo de eliminación de ROS a través de las PHBs, podría ser uno de los mecanismos biológicos esenciales de las PHBs en *T. cruzi*.

T. cruzi carece de enzimas como la catalasa (118) y la glutatión peroxidasa (93), enzimas que son capaces de metabolizar altos niveles de peróxido de hidrógeno y son importantes en las células de eucariotas superiores para hacer frente a los radicales ROS. No obstante, *T. cruzi* posee otras herramientas para eliminar las especies reactivas como son las peroxidases cTXNPx, mTXNPx, la tripanoredoxina peroxidasa (118,278), las super óxido dismutasas (SOD) de las que se han caracterizado tres de localización citosólica y la SOD IV a nivel mitocondrial (279). Todas estas enzimas, actualmente se les considera blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad (280,281). Estas enzimas, junto a las proteínas capaces de secuestrar hierro, constituirían el arsenal del que dispone el parásito tanto para protegerse de los ROS generados por el

metabolismo intracelular como en el ambiente del insecto donde dichos radicales pueden constituir mecanismos de selección o incluso de diferenciación.

La posible participación de la PHB1 en *Leishmania* en el proceso de la infección e interacción parásito-hospedador fue descrito por Jain et al. (2010) (160), basada en la localización de la proteína en el lugar de contacto e interacción con el macrófago como célula hospedadora. Sin embargo en nuestro caso, cuando se estudió la capacidad de infección y multiplicación de las formas **tripomastigotas** procedentes de los clones transfectados con los genes de la *phb1* y *phb2* (pTAPHB1 y pTAPHB2) y los obtenidos de la transfección con el pTAP vacío, como control, se pudo comprobar que los niveles de infectividad no variaron. Lo que induce a pensar que aparentemente, no debe haber una participación de estas proteínas en el proceso de interacción y entrada en la célula hospedadora, a pesar de la localización mayoritaria de las PHBs en las membranas de las formas infectantes del parásito. Pero como se aprecia en la **Figura 4.49**, se observó cómo en las cepas transfectadas se produce un aumento significativo del número de **amastigotes** por célula, especialmente en el clon pTAPHB1, lo que parece indicar que la sobreexpresión de estas proteínas, favorece la capacidad de multiplicación intracelular de *T. cruzi*, facilitando la división intracelular de los **amastigotes**. El mecanismo por el cual se induce el aumento de multiplicación de las formas intracelulares, podría estar relacionado con lo previamente descrito en la bibliografía, donde aquellos parásitos que no pueden eliminar de forma efectiva los radicales superóxido o son incapaces de reparar el daño oxidativo, se aprecia una disminución en la capacidad infectiva (93,118,129), mientras que en aquellos parásitos que fueron transfectados y sobreexpresan algunas de las enzimas vinculadas con la eliminación de los ROS, o con el enzima que hidroliza el 8-oxo-dGTP generado tras la acción de los oxidantes en el ADN, y por tanto capaces de manera eficiente de reparar los daños causados en el ADN, se produce un

aumento de la carga parasitaria con respecto a las cepas silvestres no transfectadas (118,126,127). Por lo que las PHBs, al ser capaces de disminuir los radicales ROS generados en la célula hospedadora, favorecerían las tasas de multiplicación intracelular de los **amastigotes** de *T. cruzi*, semejante a lo que ocurre en las cepas transfectadas con las PHBs.

Sin embargo, el incremento de expresión de las PHBs en las formas **epimastigotas** del parásito parecen no desempeñar ningún papel en la capacidad de multiplicación del flagelado, ya que tanto los clones transfectados con las PHBs como el control, no mostraron diferencias en las tasas de crecimiento a lo largo de los días de cultivo. Sin embargo, aunque la sobreexpresión de PHB1 y PHB2 no influyó en la tasa de división, sí se encontraron diferencias y de forma notable, en el proceso de la inducción de la metacicloogénesis, donde las formas **epimastigotas** se diferencian a **tripomastigotas metacíclicos**. Los **epimastigotes** que sobreexpresaron la PHB1 mostraron porcentajes de diferenciación mayores en relación a los que sobreexpresaron la PHB2, si bien ambas cepas transfectadas, lograron porcentajes de metacicloogénesis muy superiores a los mostrados por el control como se aprecia en la **Figura 4.47**.

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de diferenciación de *T. cruzi* tiene lugar en el recto y ampolla rectal del insecto vector. Un ambiente pobre en glucosa, con altas concentraciones iónicas, con derivados de la hemoglobina y catabólicos procedentes del metabolismo de proteínas como los hemo, hemozoína, uratos y amonio que hacen de él un hábitat pobre en nutrientes, lo que induce en el parásito un aumento en la concentración de AMPc consecuencia de la escasez de nutrientes y que ha sido empleado como método directos o indirectos de inducción de la diferenciación de los **epimastigotas** a formas **metacíclicas** (282,283). Por otra parte los parásitos, en el proceso de metacicloogénesis, sufren una serie de cambios bioquímicos relacionados con la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo

energético (251,252), con la inducción de autofagia y excreción de amonio (284) o poliaminas, procedentes del catabolismo de los aminoácidos y que actuarían como inductores de la diferenciación a formas infectantes (285). Por otra parte, en el ambiente de la parte final del intestino del insecto, se ha evidenciado la producción de especies reactivas de oxígeno que aparentemente, estarían involucrados en la defensa del insecto frente a los parásitos (112). La importancia de dichos radicales ROS, se ha puesto de manifiesto en un estudio con moscas tse-tse, donde se demostró la existencia de una relación entre la capacidad proliferativa de las formas de *T. brucei* en el intestino de la mosca y la adición de antioxidantes en la sangre con la que se alimentaba el insecto (286). De forma semejante Nogueira, N., et al. 2015 (287) alimentando los triatomíneos con el antioxidante N-acetil cisteína observaron que, a nivel del hábitat de la ampolla rectal intestinal, las ROS pueden representar una adaptación importante del parásito para desencadenar las transformaciones morfológicas y bioquímicas durante el ciclo de vida del parásito, influyendo tanto en las tasas de multiplicación, en este caso negativamente o de diferenciación a formas **metacíclicas**.

De esta forma, los oxidantes favorecerían la proliferación de los **epimastigotes**, mientras que los antioxidantes inducirían la metacicloogénesis. La mayor diferenciación a formas **metacíclicas** obtenidas con los parásitos que sobreexpresaron las PHBs estarían en relación con la mayor capacidad de captación de ROS por parte de las proheptinas de los parásitos. La mayor tasa de diferenciación obtenida con los parásitos fue la línea *T. cruzi* (pTAPHB1) con respecto a los transfectados *T. cruzi* (pTAPHB2), este hecho podría determinarse por los niveles de expresión total de las PHBs que producen ambas líneas. Los clones sobreexpresaron mayor cantidad de PHB1 que la PHB2, que provendría tanto de la PHB recombinante como de la PHB endógena (**Figuras 4.43 y 4.44**).

Los ensayos de localización permitieron tanto por microscopía confocal como mediante microscopía electrónica localizar y situar en la cepa salvaje no transfectada ambas proteínas.

La ausencia en la secuencia de las PHBs de lugares de unión a GPI, lugar por donde muchas proteínas se secretan y posteriormente se anclan a los dominios Rafts de las membranas celulares (288) y la ausencia de péptido señal, en las PHBs de *T. cruzi*, a diferencia de lo que ocurre en *L. major* y *L. donovani* (156,161), indican un mecanismo de secreción e inserción en las membranas “peculiar”. Dado que en *T. cruzi*, solo una pequeña fracción de aproximadamente el 9% de las proteínas del secretoma contienen un péptido señal, sugiere que únicamente una pequeña fracción de proteínas son secretadas por esta vía considerada como la vía clásica de secreción proteica.

En el caso de *T. cruzi*, si bien aparece en la base de datos TritypDB como que la proteína PHB1 posee péptido señal comprendido entre los aminoácidos 1 a 32, cuando se utilizó el algoritmo de los programas SignalBlast y SignalIP 4.1, que distingue entre el péptido señal y los segmentos transmembrana, no se detectó el péptido señal en ninguna de las dos PHBs, pero si se distinguen regiones transmembrana, que situarían a dichas proteínas insertadas en las membranas citoplasmáticas e intracelulares del protozoo, posiblemente en los dominios Rafts de la membrana citoplasmática y en la cara interna de las membranas mitocondriales como han sido descritas en la bibliografía en otros organismos y tipos celulares (151).

La presencia en la secuencia de la PHB1 contiene de 2 sitios de miristilación y 1 de palmitoilación, para la PHB2 6 sitios de miristilación, haciendo que estas proteínas sean consideradas como proteínas aciladas, con fuertes componentes hidrofóbicos, lo que les permitiría insertarse entre los fosfolípidos que constituyen la bicapa de las membranas.

La palmitoilación como modificación postranscripcional, proporciona un mecanismo importante para regular la localización subcelular de proteínas, la estabilidad, el tráfico, la translocación a las balsas lipídicas, la agregación y la interacción con efectores (217). La modificación postranscripcional de palmitoilación se realiza enzimáticamente mediante palmitoil transferasas localizadas en las células eucariotas en el aparato de Golgi (289). La miristilación podría participar en la localización subcelular de proteínas, facilitando las interacciones proteína-membrana, así como las interacciones proteína-proteína (218). Su ausencia en las proteínas mitocondriales, consecuencia de mutaciones en los aminoácidos donde se inserta, produce alteraciones morfológicas en el orgánulo, lo que indica que este grupo acilo participa en la estabilización de dichas membranas (290). Cuando la N-miristilación y la palmitoilación coinciden en el extremo N-terminal de una proteína, la miristilación se considera irreversible, mientras que la palmitoilación, es reversible y modulada, por lo que podría regular la función y localización de las PHBs, y como hemos discutido anteriormente ocurre en las proteínas objeto de este estudio (217). Esto corroboraría que si bien la miristilación de las proteínas aumenta su hidrofobicidad, esta modificación por sí sola al parecer no es suficiente para promover la asociación a las membranas celulares (291,292). Tanto la presencia de miristoil transferasa (293) como de palmitoil transferasa, ha sido identificada en las tres formas del *T. cruzi*, localizándose mediante microscopia confocal en el aparato de Golgi (294).

Los estudios llevados a cabo con microscopia confocal nos permitieron comprobar cómo la PHB1 en las formas **epimastigotas** se sitúan bordeando la mitocondria, en las proximidades de la bolsa del flagelo y en la región aflagelar, y en ocasiones agrupada en las proximidades del núcleo en lo que podría considerarse, aunque sin suficiente resolución, el aparato de Golgi. La PHB2 presentó una distribución similar, pero también se la observó en algunas zonas de la superficie del parásito. En las formas **tripomastigotas**,

ambas proteínas mostraron fluorescencia a lo largo de las membranas del flagelado y en las proximidades de la bolsa flagelar. Mientras que en las formas **amastigotas** se observa claramente y de forma llamativa, en las membranas rodeando al parásito.

Cuando la localización se realizó mediante inmunocitoquímica bajo microscopía electrónica, a fin de precisar mejor su localización, se pudo comprobar cómo la PHB1 se localiza en los **epimastigotes** en las proximidades del Kinetoplasto, la bolsa flagelar y la vaina flagelar y la cara interna de vesículas que podrían corresponder con cisternas del aparato de Golgi y en las proximidades de la cara externa de la membrana mitocondrial. Por su lado, la PHB2 se situaría más dispersa pero fundamentalmente en las membranas, la bolsa flagelar, vaina del flagelo y mitocondrias.

Al objeto de estudiar la colocación de las PHBs en el estadio de **tripomastigotes**, como consecuencia de los complejos descritos que forman, y empleando un doble marcaje, ambas proteínas se localizan fundamentalmente en las membranas y bolsa del flagelo lo que hace suponer que la visualización conjunta implicaría la formación del complejo proteico, pero a diferencia de lo descrito en la mitocondria, en este caso se sitúa en las membranas citoplasmáticas, formando parte de las mismas. La PHB1 se pudo localizar en lo que posiblemente sean cisternas del aparato de Golgi y en exovesículas, de tamaño relativamente grande, segregadas por los parásitos desde las membranas citoplasmáticas, lo que podríamos considerar por su origen a partir de las membranas, en ectosomas.

La presencia de las PHBs mediante inmunolocalización se ha llevado a cabo en diferentes tripanosomátidos. En la forma procíclica de *T. brucei*, la PHB1 está descrita como una proteína de la membrana mitocondrial, proponiéndose un papel en la estabilización de las proteínas sintetizadas *de novo* en esta organela (156). En los promastigotes de *L. donovani* la PHB1 se describió

como una proteína de la superficie, especialmente concentrada en el polo aflagellar y la bolsa del flagelo, proponiéndose que favorece la interacción parásito-macrófago del hospedador como ya hemos mencionado (160). En *L. major*, la PHB1 la localizamos en la membrana del parásito y próximas a las mitocondrias, mientras que la PHB2 se la localizó principalmente en la mitocondria y en la membrana nuclear. Mientras que en condiciones de estrés oxidativo, las PHBs de *L. major*, cambian su localización inicial para translocarse una a la superficie del promastigotes, en el caso de la PHB1, o al núcleo para la PHB2 formando “cluster” claramente visibles (161). Esta translocación por parte de la PHB2 en las formas procíclicas, es similar a la observada en células cancerígenas (155,216). De manera similar a lo encontrado en el presente trabajo, la PHB1 también fue detectada en *L. major* en ectosomas cuando las formas promastigotas de *Leishmania* fueron sometidas a estrés oxidativo.

La presencia de las PHBs en la bolsa del flagelo podría indicar la secreción de estas proteínas mediante fenómenos conocidos como de “*capping*” similar a la secreción de las VSG de *T. brucei* donde el parásito renueva a través de la bolsa del flagelo los antígenos de superficie y con ellos los que constituyen los de las variaciones antigénicas (295). Este fenómeno de renovación de los componentes de superficie del parásito ya fue descrito en *T. cruzi* por Schmuñis, G. A., et al. (1978) (296) cuando observaron que los anticuerpos frente al parásito generaban el desplazamiento de los componentes de la superficie a los que se ligaban los anticuerpos. Dicho desplazamiento tenía lugar desde la bolsa del flagelo hasta la región opuesta al flagelo libre, y sería por la bolsa del flagelo por donde se liberarían al medio externo. Quizás este mecanismo sea la razón por la cual Jain, R. et al. (2010) (160) encontraron la PHB1 en *L. donovani* en la zona aflagelar de los promastigotes.

Respecto a *T. cruzi*, Gonçalves, et al. (1991) (297) encontraron cómo las formas **tripomastigotas** de *T. cruzi*, liberaban antígenos en forma de vesículas

de 20 a 80 nm al medio, renovando de esta forma los componentes de superficie del parásito (297). La presencia de PHB1 en vesículas aparentemente generadas desde la membrana celular, podrían corresponder al igual que describimos ya en *Leishmania*, a la liberación de ectosomas semejantes a las vesículas encontradas por dicho autor, y constituiría, junto al secretoma vertido a través de la bolsa del flagelo, mecanismos del parásito para protegerse en el medio extracelular y así contrarrestar, las PHBs, el estrés oxidativo y proteger de forma “externa” a las membranas citoplasmáticas.

Como ya hemos indicado anteriormente, las proteínas secretadas que no contienen el péptido señal se secretan fuera de la membrana plasmática utilizando vías secretoras no clásicas que incluyen vesículas extracelulares (EVs) generadas desde la membrana, como son los ectosomas y los exosomas vertidos desde el retículo a través de los cuerpos multivesiculares (MVB) (298,299). En *T. cruzi*, dichas vesículas están siendo motivo de numerosos estudios, identificándose los componentes que transportan, así como como su papel en la infección (299–301).

Las Evs son pequeñas vesículas de membrana, que se clasifican en función de su tamaño, biogénesis y composición, en exosomas y microvesículas (MVs) o ectosomas. Los exosomas, de un tamaño de 30 a 100 nm, son de origen endocítico, presentan una bicapa lipídica y son liberados al medio a través de la fusión del cuerpo multivesicular (MVB) a través de la membrana plasmática de la célula, como ya se ha indicado (302). Por su parte, las MVs son más heterogéneas en forma, pudiendo tener entre 200 y 300 nm de diámetro, se liberan como consecuencia de la evaginación hacia el espacio extracelular de la membrana plasmática. Las EVs no sólo difieren entre ellas en origen y tamaño, sino también en la composición lipídica y proteica (303). La presencia de EVs en *T. cruzi* fue descrita por primera vez en 1979 por Da Silveira, et al. (1979) (304). Estas EVs participan en la biología general tanto de organismos superiores como de protozoos e incluso bacterias y virus,

jugando un papel de comunicadores intercelulares, mecanismos de evasión de respuesta inmune y generadores del nicho de la migración celular, o facilitadores en general de la supervivencia de los organismos patógenos que los generan. En el caso del papel que juegan en la enfermedad de Chagas las EVs procedentes del parásito, una revisión sobre su origen y funcionalidad ha sido recientemente publicada por nuestro grupo y donde se describe el papel que las EVs juegan en la modulación de la enfermedad (305). Las EVs, pueden por tanto ser consideradas a modo de “carga” de información y modulación dado que contienen proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN de diferentes tamaños) aparte de los lípidos que constituyen sus membranas (300). Se ha descrito cómo los exosomas de las formas del parásito están presentes en el torrente circulatorio de los pacientes chagásicos, portando entre otras, proteínas inmaduras, no procesadas por el proteosoma del RE y que contienen los grupos N-terminal y C-terminal de proteínas del parásito, en concreto de las MASP (301). Este hecho prueba que el origen de las exovesículas es el RE y aparato de Golgi, donde tiene lugar la maduración de las proteínas sintetizadas y donde dichos exosomas han sido generados con la participación de las membranas del lugar donde se forman, el RE lugar donde vimos tenía lugar la miristilación y palmitoilación de las PHBs (217).

Cuando ensayamos la presencia de las PHBs mediante Western blots, en exosomas o ectosomas aislados de diferentes DTUs, se pudo comprobar como la PHB1 aparece tanto en los ectosomas como en los exosomas procedentes de las formas **epimastigotas** y **tripomastigotes** de las cepas ensayadas (CL Brener, DM28c y Pan4), mientras que la PHB2 apareció en los ectosomas de las 4 DTUs pero solo apareció en los exosomas de la cepa Pan 4. El diferente origen celular de las exovesículas, podría quizás explicar las diferencias encontradas, ya que la PHB1, como se observó por microscopía electrónica, en las formas **epimastigotas**, aparece en el interior de cisternas que pueden corresponder al complejo Golgi- RE al igual que la bolsa del flagelo y membranas. En las formas **tripomastigotas** se encuentra de forma masiva

asociada a dicha membrana, en la bolsa del flagelo y minoritariamente en las cisternas citosólica. Para el caso de la PHB2 apareció en los **epimastigotes** ligada a membranas y bolsa de flagelo al igual que los **tripomastigotes**. Hay que resaltar que la PHB1, se la localizó en los **tripomastigotes** asociada a exovesículas que por su tamaño y por encontrarse próximas a las membranas debería corresponder con ectosomas.

A fin de poder disponer de líneas donde se consiguiera delecionar la expresión de las proteínas objeto de estudio y dado que *T. cruzi* carece del complejo de las proteínas Argonauta (AGO) a diferencia de lo que ocurre en *Leishmania brasiliensis* y en *T. brucei*, que posee dichas enzimas, necesarias para llevar a cabo el silenciamiento génico mediante ARN de interferencia (88,89), debimos recurrir al sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 puesto a punto en *T. cruzi* por Lander, N., et al. (2015) (83).

Durante muchos años, la mayor parte de las modificaciones llevadas a cabo en el genoma se basaron con enfoques aleatorios, por lo que los genes se integrarían al azar en el genoma de la especie transfectada. Las primeras evidencias encontradas en el genoma de bacterias previamente infectadas por bacteriófagos, de secuencias denominadas como CRISPR como medio de anulación del genoma viral fue publicado por Mujica, F., et al. (2000) (306), determinándose cómo dichos motivos repetidos en el genoma, determinaban los blancos genéticos de nucleasas que eran capaces de eliminar los genes insertados procedentes de la infección por los virus, una especie de “sistema inmunológico” a nivel de las bacterias, donde el ADN aparecía marcado por dichas secuencias (74,307,308). Este sistema se ha encontrado en numerosas cepas y especies de bacterias extremófilas, y ha sido corroborado en todas las procariotas tras la infección con bacteriófagos (309). Su utilización como sistema de silenciamiento génico en procariotas vino tras la publicación Gasiunas, G., et al. en 2102 (310) donde comprobaron las observaciones

anteriores y que posteriormente fueron corroboradas experimentalmente en células de mamífero (311).

Los primeros intentos de aplicar la tecnología CRISPR a *T. cruzi*, resultó ser tóxico para el parásito (134). Sin embargo Lander, N. et al. (2015) (83) consiguieron con éxito en *T. cruzi* un sistema de edición de genes endógenos mediante las secuencias CRISPR y la nucleasa Cas9 (CRISPR/Cas9) sin mostrar los flagelados una toxicidad detectable con la endonucleasa Cas9, por lo que consiguieron silenciamiento con éxito de los genes *pfr1* y *pfr2* y describiendo los detalles de la metodología a emplear (174). Recientemente se ha usado esta metodología en el silenciamiento de otras proteínas de *T. cruzi* dirigiendo el silenciamiento a la región C-terminal de un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de las TRP mucolipinas/TRP polycystina, ligadas a membranas de los lisosomas, e involucradas en los canales iónicos intracelulares, y en especial en la salida de Fe desde dichos orgánulos en *T. cruzi* (84).

En un intento de conocer la funcionalidad de las PHBs, y de acuerdo a como se describe en Material y Métodos y en la sección de Resultados se transfectaron los parásitos en un solo paso con los ADN guías 1sgPHB2 y 2sgPHB2 y una co-transfección con el fragmento lineal FRL2. En teoría, este fragmento, a través de la recombinación homóloga se integraría en el locus del gen *phb2*, permitiendo una selección de los parásitos transfectados en menor tiempo al existir la posibilidad de la selección doble gracias al gen de resistencia a la blasticidina, *bsd*.

La tecnología CRISPR/Cas9 nos ha permitido la construcción en este trabajo de una línea de *T. cruzi* con una expresión disminuida de la proteína PHB1, gracias a la edición del gen *phb1*. Como ya hemos indicado, cuando los individuos obtenidos del clon seleccionado donde se consiguió disminuir aproximadamente un 37% la expresión de la PHB1, fueron sometidos a estrés

oxidativo con H₂O₂, la fluorescencia generada por la sonda fluorescente DCF, sensible a los radicales libres, era sensiblemente menor a la generada por la línea de parásitos control. Al contrario de los que sucedió con la cepa pTAPHB1, a la cual se transfectó con el gen *phb1*.

El análisis del gen *phb1* de aquellos clones transfectados con el sistema CRISPR/Cas9, no mostró mutaciones que indicaran que la diferencia de expresión fuese debida a mutaciones, aunque fuesen puntuales en la secuencia de dicho gen. Lander, N. et al. (2015) (174) silenciando los genes, mediante la metodología CRISPR/Cas9, *prf1* y *pfr2* observaron el descenso en la expresión de las proteínas PFR1 y PFR2 y un claro efecto fenotípico relacionado con su silenciamiento, el desprendimiento del flagelo del protozoo.

La disminución en los niveles de expresión, tampoco, al igual que en nuestro caso, se debió a mutaciones en la secuencia de dichos genes que explicaran la falta de expresión de las proteínas. Sin embargo, estos autores encontraron reordenamientos cromosómicos considerables en el genoma del parásito, considerando que esta reorganización, permitía que las copias de los genes bajo estudio se ubicaran en lugares donde la endonucleasa Cas9 tenía mayor dificultad para acceder, lo que permitía una reducción en la expresión de la proteína blanco. Aunque en nuestro estudio no se determinó este potencial reordenamiento, es bastante probable que así haya ocurrido, dando lugar a una línea de *T. cruzi* que no tiene completamente eliminado el producto del gen *phb1*, lo que la convierte a una línea *Knockdown* con una reducción en los niveles de expresión de aproximadamente del 42%.

La estrategia de reemplazar el gen *phb2* por el marcador de resistencia a la blasticidina resultó letal, a pesar que las cepas donde se llevó a cabo dicho reemplazamiento sobrevivieron por un corto periodo de tiempo. A pesar de ello, las observaciones bajo microscopía electrónica nos permitieron

comprobar cómo en los **epimastigotes** que fueron sometidos al reemplazamiento génico, aparecían una serie de alteraciones a nivel de la membrana mitocondrial, con relajaciones y herniaciones a nivel de la misma y en especial en las membranas que rodean el kinetoplasto. De igual manera el citoplasma aparece fuertemente vacuolado posiblemente por relajación de las membranas de retículo endoplasmático y de las cisternas del aparato de Golgi, así como la aparición de espacios lagunares rodeando al núcleo también como consecuencia de una ausencia de la estructura funcional de la membrana nuclear. Daños que prueban la letalidad de los efectos al anular la expresión del gen de la *phb2*.

Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos en otros organismos donde se ha descrito que las PHBs forman complejos en las membranas mitocondriales, estabilizando las mismas y la falta de una de ellas, conlleva a la no formación del complejo (94,137,212,238,239) con una alteración de la morfología de la doble membrana mitocondrial y de las crestas mitocondriales (151). El fenómeno descrito es parecido a lo que nos ha ocurrido en los flagelados transfectados (1sgCas9PHB2) donde la pérdida de estabilidad de las membranas es notable. En otros tripanosomátidos como es el caso de *T. brucei* se ha descrito que la pérdida de la PHB1 y/o PHB1 y PHB2 en conjunto, lo que es letal para el parásito. Sin embargo la represión de PHB1 no produjo una pérdida detectable de actividad ATPasa mitocondrial ni en los complejos respiratorios (156). La importancia de las PHBs en la supervivencia celular de los organismos ha sido anteriormente descrita en base a los trabajos con otros organismos como en *C. elegans* donde la falta de estas proteínas causaron un acortamiento de la vida útil del nematode como consecuencia de las alteraciones mitocondriales que se inducen.

El silenciamiento de las PHBs en el nematode, da como resultado una biogénesis mitocondrial

alterada en las células musculares de la pared del cuerpo durante en desarrollo embrionario, favoreciendo en envejecimiento prematuro de los nematodos (234). Asimismo, en levaduras como *S. cerevisiae* se ha descrito cómo la interrupción del complejo PHB a nivel mitocondrial causa un acortamiento en el ciclo de vida, lo cual va acompañado de cambios morfológicos característicos del envejecimiento celular (233). La delección de los genes *phb* no altera la capacidad reproductiva de las levaduras y solo se observó un acortamiento del ciclo de vida, sin embargo, los mutantes nulos en fase estacionaria, mostraron una menor capacidad respiratoria debido a las delecciones del genoma mitocondrial (ADNmt) (215) conduciendo a la muerte de la levaduras, resultados similares a los resultados obtenidos en la cepa *T. cruzi* (1sgPHB2), donde el efecto letal fue observado cuando los parásitos llegaron a la fase estacionaria. Este efecto podría ser debido a la acumulación de ROS como consecuencia de la mayor demanda de glucosa por parte de los flagelados durante la fase exponencial de crecimiento (312).

Por todo lo expuesto podemos aseverar que las PHBs son proteínas esenciales para la supervivencia de *T. cruzi*, participando en el andamiaje proteico a las membranas celulares y participando en la eliminación de los ROS como consecuencia del Fe^{3+} que acomplejan con la consiguiente influencia en la supervivencia del protozoo tanto a nivel extracelular como en el ambiente intracelular donde se va a desarrollar en el hospedador vertebrado. Por todo ello deberían ser consideradas las Prohibitinas como potenciales blancos terapéuticos frente a la enfermedad que causa este parásito.

6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

1. Se describe por primera vez la presencia de la Prohibitina 1 (PHB1) y Prohibitina 2 (PHB2) en *T. cruzi*. La Prohibitina 1 de *T. cruzi*, codificada por un ORF de 819 pb, es una proteína de 30.9 kDa, que posee un segmento transmembrana entre los aminoácidos 9 y 27, que carece de péptido señal, y de sitio de unión a GPI. La Prohibitina 2, codificada por un ORF de 921 pb, es una proteína de 33.2 kDa que presenta un dominio transmembrana entre los aminoácidos 27 y 44. Ambas proteínas son proteínas de membrana, al quedar insertadas en la bicapa lipídica a través de una región hidrofóbica, orientando el extremo N-terminal hacia el citoplasma celular, mientras que el extremo C-terminal se dirige al espacio extracelular, al igual que ocurre en otras prohibitinas descritas en la bibliografía. La identidad en secuencia de las prohibitinas de *T. cruzi* varía entre el 48% con las prohibitinas humanas, el 80% con el género *Leishmania* y el 84% con las de *T. brucei*.

2. El estudio de la secuencia de PHB1 y PHB2 de *T. cruzi* muestra la existencia de dominios capaces para ligar Fe^{3+} . La PHB1 posee 1 dominio de unión, mientras que la PHB2 posee dos dominios. La capacidad de estas proteínas de unión a Fe^{3+} permitió la purificación de ambas proteínas nativas mediante cromatografía de afinidad, usando matrices ligadas a este metal.

3. La clonación efectiva de los genes *phb1* y *phb2* de *T. cruzi* en el vector de expresión pQE30-Xa condujo a la expresión de ambas proteínas recombinantes unidas a un *tag* de Histidina, obteniendo proteínas con una masa molecular relativa de 33 kDa y de 35 kDa respectivamente. La inmunización con dichas proteínas recombinantes ha permitido obtener inmunosueros con anticuerpos específicos frente a ellas, que reconocieron respectivamente una sola banda en los extractos de las formas de *T. cruzi* con masas moleculares correspondientes a ambas proteínas. Este hecho descarta el reconocimiento de las otras proteínas de la familia SPFH, que sugiere que los dominios comunes de las PHBs presentes en toda la familia y altamente

conservados, no son inmunogénicos, quizás por haber sido expuestos al sistema inmune antes de la maduración del mismo.

4. Los anticuerpos obtenidos frente a la PHB1 recombinante mostraron reacciones cruzadas con las proteínas homologas de otros tripanosomátidos pero no con la proteína de mamíferos. Por el contrario, los anticuerpos obtenidos frente a la PHB2 recombinante solo produjo reacciones cruzadas con las proteínas de *T. brucei*, pero no frente a la PHB2 de *Leishmania* o a las de las células de homínido usadas en los ensayos.

5. La proteína PHB2 recombinante, al ser usada como antígeno y enfrentarla a los sueros de individuos chagásicos en test inmunoenzimáticos (ELISA) permitió detectar en los enfermos anticuerpos capaces de reconocer al antígeno con unos niveles de sensibilidad del 93.3% y especificidad del 92.3%, por lo que dicha proteína recombinante podría constituir un buen candidato para ser usado como antígeno diagnóstico para la enfermedad de Chagas.

6. El nivel de expresión de la PHB1 fue en todos los casos superior a la expresión de la PHB2, siendo las formas epimastigotas las formas del parásito donde existe un mayor nivel de expresión. Los niveles de expresión de ambas proteínas, cuantificado por la producción de los ARN mensajeros, si bien mostró diferencias significativas entre ambas proteínas, no mostró diferencias entre las diferentes formas del parásito, lo que no se corresponde con los valores de expresión obtenidos a nivel de proteína. Esto sugiere la existencia de una regulación postranscripcional en la síntesis de ambas proteínas. La expresión de la PHB1 entre las formas epimastigotas de diferentes DTUs del parásito, no mostró diferencias significativas, cosa que no ocurrió cuando se valoraron los niveles de expresión de la PHB2, donde en la cepa usada correspondiente al DTUII, mostró valores significativamente mayores de expresión respecto al resto de las cepas ensayadas.

7. La expresión de estas proteínas es Fe^{3+} dependiente, dado que las concentraciones crecientes del metal en el medio de cultivo incrementan los niveles de expresión de ambas proteínas, siendo los niveles de expresión de la PHB2 superiores. El mayor incremento en la síntesis de la PHB2 se logra a concentraciones mayores del catión cosa que no ocurrió para la PHB1, donde a concentraciones capaces de estimular la síntesis de la PHB2 inhibieron su producción.

8. La captación de Fe por parte de estas proteínas se encuentra relacionado con el papel protector que parecen jugar frente a los iones superóxido, dado que tanto la PHB1 como la PHB2 protegen al ADN de las especies reactivas de oxígeno, inhibiendo la reacción de Fenton. La PHB2 muestra un mayor poder antioxidante que la PHB1, quizás como consecuencia de la mayor capacidad de unión al metal por parte de la PHB2.

9. Las formas epimastigotas de *T. cruzi*, transfectadas con los genes de la *phb1* o *phb2*, que sobreexpresan dichas proteínas, sufren un menor estrés oxidativo que en las cepas salvajes no transfectadas. Por el contrario, en la cepa donde se redujo la expresión de la PHB1 mediante el sistema CRISPR/Cas9, los niveles de estrés oxidativo frente al peróxido de hidrógeno fue aproximadamente el doble del que se produce en la cepa control. El mecanismo de eliminación de las especies reactivas de oxígeno a través de estas proteínas, podría ser uno de los mecanismos biológicos esenciales de las PHBs en *T. cruzi*.

10. La sobreexpresión de ambas Prohibitinas en tripomastigotes no influyó en los niveles de la infectividad de las formas tripomastigotas, ni en la tasa de multiplicación de los epimastigotes que las sobreexpresan. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas tanto en las tasas de metaciclologénesis como en las de multiplicación intracelular de las formas amastigotas de las

cepas transfectadas, por lo que se deduce que tanto en la metacicloogénesis como en la división de las formas intracelulares las especies reactivas de oxígeno deben jugar un papel inhibitorio tanto de la morfogénesis como de la multiplicación de los amastigotes, y que al ser eliminados favorecen ambos procesos en el protozoo.

11. Los estudios de inmunolocalización tanto con microscopia confocal y microscopía electrónica de transmisión permitieron determinar que la localización de las PHBs son dependientes del estadio en el cual el parásito se encuentre. La PHB1 en las formas epimastigotas se localiza bordeando la mitocondria y las proximidades de la bolsa flagelar. Mientras que la PHB2, en la misma forma, se sitúa en las proximidades del Kinetoplasto, en forma de gránulos dispersos en el citosol y en las membranas citoplasmáticas próximas a la bolsa del flagelo y vaina flagelar. De los experimentos donde la PHB2 fue silenciada mediante la metodología CRISPR/Cas9 se deduce que es una proteína esencial para mantener la integridad de las membranas de los orgánulos citosólico, (mitocondrias, kinetoplasto, retículo y núcleo) dadas las alteraciones degenerativas que se observan en dichos organismos que conducen a la muerte del protozoo.

En las formas tripomastigotas, ambas proteínas se sitúan a lo largo de las membranas del flagelado, formando “complejos” visibles tras el doble marcaje. Dichos complejos PHB1-PHB2 se sitúan a lo largo de la membrana citoplasmática, en especial en las proximidades de la bolsa del flagelo y en las paredes de cisternas y vacuolas donde principalmente se observan las marcas correspondientes a la PHB2.

En las formas intracelulares amastigotas ambas prohibitinas se sitúan en las membranas rodeando a la forma intracelular del parásito.

12. La búsqueda de ambas proteínas en exovesículas en las distintas DTUs del parásito usadas en este trabajo nos ha permitido comprobar cómo la PHB1 aparece en los ectosomas y exosomas de todas las cepas y formas ensayadas, mientras que la PHB2 se encuentra en los ectosomas de las cepas analizadas y sólo en los exosomas de la cepa DTU I, Pan 4. La presencia de dichas proteínas en el secretoma del parásito podría constituir un posible mecanismo de defensa frente a las agresiones oxidativas del medio externo contribuyendo a la supervivencia del parásito.

Conclusión general

En base a i) su capacidad de captar y eliminar especies reactivas de oxígeno, ii) constituir proteínas esenciales para formar parte de las membranas y de los orgánulos intracelulares, iii) dado que su ausencia conduce a la degeneración y muerte de los parásitos, iv) su participación en la capacidad de multiplicación de las formas intracelulares del parásito, y v) en base de su antigenicidad, las Prohibitinas, y en especial la PHB2, podrían ser consideradas como potenciales blancos terapéuticos o inmunoprolifáctico frente a la enfermedad que causa este parásito.

1. For the first time, the proteins prohibitin 1 (PHB1) and prohibitin 2 (PHB2) have been described in *Trypanosoma cruzi*. Prohibitin 1 encoded by an ORF 819 bp, is a 30.9 kDa protein, which has a transmembrane segment between amino acids 9 and 27. It lacks a signal peptide and a GPI binding site. Prohibitin 2, encoded by an ORF of 921 bp, is a 33.2 kDa protein that has a transmembrane domain between amino acids 27 and 44. Both proteins are located in the membrane, being inserted into the lipid bilayer through a hydrophobic region, orienting the N-terminal towards the cellular cytoplasm, while the C-terminus is directed to the extracellular space, as happens with other prohibitins described in literature. The sequence identity of *T. cruzi* prohibitins are around 48% with human prohibitins, 80% with *Leishmania* genus and 84% with *Trypanosoma brucei*.

2. The study of the sequence of PHB1 and PHB2 of *T. cruzi* shows the existence of domains capable of binding Fe^{3+} . PHB1 has one binding domain, whereas PHB2 has two domains. The capacity of these proteins to bind to Fe^{3+} allowed the purification of the native proteins by affinity chromatography, using sepharose linked to this metal.

3. The effective cloning of *phb1* and *phb2* genes from *T. cruzi* in the pQE30-Xa expression vector led to the expression of both recombinant proteins bound to histidine tag, obtaining proteins with a molecular mass of 33 kDa and 35 kDa, respectively. Immunization with these recombinant proteins has allowed to obtain immune sera with specific antibodies against them. These immunosera recognized a single band in the extracts of the different stages of *T. cruzi* with molecular masses corresponding to both proteins. This fact dismisses the recognition of other proteins from the SPFH superfamily and suggests that the common domains of the PHBs present in the whole superfamily are highly conserved and not immunogenic, perhaps because they have been exposed to the immune system before their maturation.

4. The antibodies obtained against the recombinant PHB1 showed cross reactions with the homologous proteins of other trypanosomatids, but not with the mammalian protein. In contrast, the antibodies obtained against the recombinant PHB2 only cross-reacted with proteins of *T. brucei* but not against the PHB2 of *Leishmania* or those of the hominid cells used in the assays.

5. When the recombinant PHB2 protein was used as an antigen and confronted to the sera of chagasic individuals by immunoenzymatic tests (ELISA), it allowed the detection of the antibodies capable of recognizing the antigen, with sensitivity levels of 93.3% and specificity of 92.3%. This recombinant protein could be a good candidate to be used as a diagnostic antigen for Chagas disease.

6. The level of expression of PHB1 was in all cases higher than the expression of PHB2. The epimastigote stage has the highest level of expression. The expression levels of both proteins, quantified by the production of the mRNA, did not show differences between stages, which does not correspond to the expression values obtained at the protein level. This suggests the existence of a post-transcriptional regulation in the synthesis of both proteins. The expression of PHB1 in the epimastigotes forms among the different DTUs did not show any significant differences. On the contrary, PHB2 expression levels show a significant difference in the DTUII strain.

7. The expression of these proteins are Fe^{3+} dependant, since the increasing concentrations of the metal in the culture medium increase the expression levels of both proteins. The expression levels of the PHB2 were higher. The highest increase in the synthesis of PHB2 was achieved at higher concentrations of the cation; in contrast, higher concentrations of the ion inhibited the production of PHB1.

8. The uptake of Fe^{3+} by these proteins is related to the protective role they play against reactive oxygen species. PHB1 and PHB2 protected the DNA from the production of reactive oxygen species, inhibiting the Fenton reaction. PHB2 shows a greater antioxidant power than PHB1, perhaps as a consequence of the greater metal binding capacity of PHB2.

9. The epimastigote forms of *T. cruzi* transfected with the *phb1* or *phb2* genes suffered less oxidative stress than the wild-type strains. In contrast, in the strain where the expression of the PHB1 was reduced by the CRISPR/Cas9 system, the levels of oxidative stress against hydrogen peroxide approximately doubled the one of the control strain. The mechanism of the elimination of reactive oxygen species through these proteins could be one of the essential biological mechanisms of PHBs in *T. cruzi*.

10. The overexpression of both prohibitins in trypomastigotes did not influence the levels of infectivity of the trypomastigote form. Also, it did not affect the multiplication rate of the epimastigotes that overexpressed them. However, we observed highly significant differences in the metacyclogenesis rates and in the intracellular multiplication of the amastigote forms of the transfected strains. In addition, the reactive oxygen species could play an inhibitory role in the metacyclogenesis and in the division of the intracellular forms. The elimination of the reactive oxygen species favors both processes in the protozoan parasites.

11. The immunolocalization studies with confocal microscopy and electronic transmission microscopy determined that the location of the PHBs depends on the parasite stage. PHB1 in the epimastigote forms was located bordering the mitochondria and the vicinity of the flagellar pocket, while PHB2 in the same stage was located in the vicinity of the kinetoplast, in the form of clusters dispersed in the cytosol and in the cytoplasmic membranes close to the

flagellum and flagellar pocket. In the experiments where the PHB2 was silenced by the CRISPR/Cas9 methodology, it was determined that it is an essential protein that maintains the integrity of the membranes of the cytosolic organelles (mitochondria, kinetoplast, reticulum and nucleus). The degenerative alterations that were observed led to the death of the parasite.

In the trypomastigote forms, after a double labeling, both proteins were located along the membranes of the flagellate, forming visible "complexes". These PHB1-PHB2 complexes were located along the cytoplasmic membrane, especially in the vicinity of the flagellar pocket and in the walls of cisterns and vacuoles where the marks corresponding to PHB2 are mainly observed.

In the intracellular amastigote forms both prohibitins were located in the membranes surrounding the intracellular form of the parasite.

12. PHB1 and PHB2 were also located in the exovesicles secreted by different DTUs of the parasite. PHB1 was detected in the ectosomes and exosomes of all the strains and forms tested, while PHB2 was detected in the ectosomes of the strains analyzed and only in the exosomes of Pan 4 strain, DTU I. The presence of these proteins in the secretome of the parasite could constitute a possible defense mechanism against the oxidative aggressions of the external environment contributing to the survival of the parasite.

General conclusion

Due to i) their ability to capture and eliminate reactive oxygen species; ii) they constitute essential proteins of the membranes and the intracellular organelles; iii) their absence led to the degradation and death of the parasite; iv) they affect the capacity of multiplication of the intracellular forms of the parasite and; v) their antigenicity properties, prohibitins (especially PHB2)

could be considered as potential therapeutic or immunoprophylactic targets against Chagas disease.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. 2015.
2. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*. 2013 Apr;13(4):342–8.
3. Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease: Estimates and Challenges. *Glob Hear*. 2015 Sep;10(3):139–44.
4. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct;388(10053):1459–544.
5. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. *Lancet Infect Dis*. 2013 Apr;13(4):342–8.
6. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Aug;102(suppl 1):75–86.
7. Coura JR, Vias PA. Chagas disease: A new worldwide challenge. Vol. 465, *Nature*. 2010. p. S6–7.
8. Araujo-Jorge T, Telleria J, Dalenz JR. History of the discovery of the American Trypanosomiasis (Chagas disease). In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*. Elsevier; 2010. p. 1–22.
9. Hamilton PB, Stevens JR. Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*. Elsevier; 2010. p. 321–44.

10. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Arthropod Borne Diseases. Cham: Springer International Publishing; 2017. 1-844 p.
11. Rodrigues Coura J, Viñas PA, Junqueira AC, Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro. 2014 Nov;109(7):856–62.
12. WHO. WHO/PAHO Paraguay. OPS Paraguay. 2015.
13. Guhl F. Geographical distribution of Chagas disease. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition. Elsevier; 2010. p. 89–112.
14. Coura JR, Junqueira AC V, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 2002 Apr;18(4):171–6.
15. Guhl F. Chagas disease in pre-Colombian civilizations. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition. 2010. p. 23–46.
16. Brenière SF, Villacis A, Aznar C. Vector transmission: How it works, what transmits, where it occurs. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition. Elsevier; 2010. p. 497–515.
17. Schmunis G. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion. 1991 Jul;31(6):547–57.
18. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 2010;115(1–2):14–21.

19. Bittencourt AL. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992 Oct;34(5):403–8.
20. Carlier Y, Torrico F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 Dec;36(6):767–71.
21. Raimundo SM, Massad E, Yang HM. Modelling congenital transmission of Chagas' disease. *Biosystems*. 2010 Mar;99(3):215–22.
22. González-Tomé MI, García López-Hortelano M, Fregonese L. Luces y sombras en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas. *Anales de Pediatría*. 2018 Mar;119–21.
23. Paricio-Talayero JM, Benlloch-Muncharaz MJ, Ignacio Collar-del-Castillo J, Rubio-Soriano A, Serrat-Pérez C, Magraner-Egea J, et al. Vigilancia epidemiológica de la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas en tres maternidades de la Comunidad Valenciana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(10):609–13.
24. Pérez de Ayala Balzola A, Pérez-Molina JA, Navarro Beltrá M, Lopez-Velez R. Enfermedad de Chagas en personas procedentes de Latinoamérica residentes en España. Ministerio de Sanidad y Política Social. Madrid; 2009. 1-84 p.
25. Conselleria de Sanitat de la Comunidad Valenciana. Regulación del control de las infecciones congénitas y perinatales en la Comunidad Valenciana. *Circ 3/2007/8/1 la Cons Sanit*. 2007;16.
26. Dias JCP, Schofield CJ. Social and medical aspects on Chagas disease management and control. In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second*

- Edition. Elsevier; 2010. p. 47–57.
27. Moncayo, Silveira AC. Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: Epidemiology, surveillance, and health policies. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition. Elsevier; 2010. p. 59–88.
 28. Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010 May;201(9):1308–15.
 29. Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun.* 1996;
 30. Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984;79(4):513–5.
 31. Rodrigues J. Chagas disease: what is known and what is needed. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct;102(1):113–22.
 32. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997 Oct;114(2):103–10.
 33. Moncayo Á, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104(suppl 1):17–30.
 34. Rassi A, Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol.* 2000 Dec;23(12):883–9.

35. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Benedito, Maciel C, Simões M V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation*. 2007;115:1109–23.
36. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Aug;14(8):1045–9.
37. Oelemann WM, Teixeira MD, Veríssimo Da Costa GC, Borges-Pereira J, De Castro JA, Coura JR, et al. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 1998 Sep;36(9):2423–7.
38. Sosa-Estani S, Armenti A, Araujo G, Viotti R, Lococo B, Ruiz Vera B, et al. Artículo original. Tratamiento de la enfermedad de Chagas con benznidazol y ácido tióctico. *Medicina (B Aires)*. 2004;64:1–6.
39. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1979;4:389–96.
40. Apt W, Heitmann I, Jercic M, Jofré L, Muñoz P, Noemí I, et al. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Rev Chil Infectología*. 2008;25(5):384–9.
41. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015 Oct;373(14):1295–306.
42. Docampo R, Moreno SN. Free radical metabolism of

- antiparasitic agents. Fed Proc. 1986 Sep;45(10):2471–6.
43. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Sanchez G, Vargas SL, Rodriguez J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Jan;97(1):23–9.
 44. Docampo R, Moreno SNJ. Acidocalcisomes. Cell Calcium. 2011 Aug;50(2):113–9.
 45. de Lana M, de Menezes Machado EM. Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition. Elsevier; 2010. p. 345–69.
 46. De Pablos LM, Osuna A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. Infect Immun. 2012;80(7):2258–64.
 47. Jansen AM, Roque ALR, Xavier SCC. *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: General aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition. Elsevier; 2010. p. 265–82.
 48. Azambuja P, Ratcliffe NA, Garcia ES. Anais da Academia Brasileira de Ciências. An Acad Bras Cienc. 2005;77(3):397–404.
 49. Billingsley PF, Downe AE. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. Acta Trop. 1986 Dec;43(4):355–66.
 50. Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular

- epidemiology in guiding control strategies. *BMJ*. 2003 Jun;326(7404):1444–8.
51. De Pablos LM, Osuna A. Conserved regions as markers of different patterns of expression and distribution of the mucin-associated surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2012 Jan;80(1):169–74.
 52. Vazquez MP. The Genetics and Genomics of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biomed Pharm Sci*. 2007;1(1):1–11.
 53. Miles MA, Towe PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1977;71(3):217–25.
 54. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: Looking back and to the future. Vol. 136, *Parasitology*. 2009. p. 1509–28.
 55. Souza W de. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104(suppl 1):89–100.
 56. Vianna Martins A, Patrícia Gomes A, de Mendonça EG, Rangel Fietto JL, Alberto Santana L, de Almeida Oliveira MG, et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*. 2012 Mar;16(1):45–58.
 57. Solís-Oviedo RL, Monteon V, López R, Pech-Canul Á de la C. Biochemical, Cellular, and Immunologic Aspects during Early Interaction between *Trypanosoma cruzi* and Host Cell. In: *Chagas Disease - Basic Investigations and Challenges*. InTech; 2018. p. 64.

58. Souza W De. Electron microscopy of trypanosomes a historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(4):313–25.
59. de Souza W, de Carvalho TU, Barrias ES. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells. In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*. Elsevier; 2010. p. 401–27.
60. Zingales B, Pereira MES, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP, et al. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trop*. 1997 Nov;68(2):159–73.
61. Agüero F, Zheng W, Weatherly DB, Mendes P, Kissinger JC. TcruziDB: an integrated, post-genomics community resource for *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan;34(Database issue):D428-31.
62. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005 Jul;309(5733):409–15.
63. Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics*. 2009 Jun;10(1):255.
64. Lukeš J, Jirků M, Doležel D, Kral'ová I, Hollar L, Maslov DA. Analysis of Ribosomal RNA Genes Suggests That Trypanosomes Are Monophyletic. *J Mol Evol*. 1997 May;44(5):521–7.
65. Stevens JR, Gibson W, Stevens JR, Gibson W. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today*. 1999 Nov;15(11):432–7.

66. Wright A-DG, Li S, Feng S, Martin DS, Lynn DH. Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Mar;99(1):69–76.
67. De Pablos Torró LM. Análisis global de la familia multigénica masp (mucin associated surface proteins) de *Trypanosoma cruzi*. Universidad de Granada; 2010.
68. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. Vol. 117, *Biochimie.* 2015. p. 119–28.
69. Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of a Novel Family of Sequence Repeats among Prokaryotes. *Omi A J Integr Biol.* 2002 Jan;6(1):23–33.
70. Lander N, Chiurillo MA, Docampo R. Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2016 Sep 22;63(5):679–90.
71. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 2008 Jan;18(1):134–47.
72. Ma J-L, Kim EM, Haber JE, Lee SE. Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences. *Mol Cell Biol.* 2003;23(23):8820–8.
73. Sfeir A, Symington LS. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends Biochem Sci.* 2015;40:701–14.
74. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA,

- Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-). 2012 Aug 17;337(6096):816–21.
75. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 2014;159(3):647–61.
76. Liao H-K, Gu Y, Diaz A, Marlett J, Takahashi Y, Li M, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun*. 2015 Dec 10;6(1):6413.
77. Xiao B, Yin S, Hu Y, Sun M, Wei J, Huang Z, et al. Epigenetic editing by CRISPR/dCas9 in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci*. 2019 Jan 2;116(1):255–60.
78. Sidik SM, Hackett CG, Tran F, Westwood NJ, Lourido S. Efficient Genome Engineering of *Toxoplasma gondii* Using CRISPR / Cas9. 2014;9(6).
79. Beverley SM. CRISPR for Cryptosporidium HHS Public Access. *Nature*. 2015;523(7561):413–4.
80. Ishemgulova A, Hlaváčová J, Majerová K, Butenko A, Lukeš J, Votýpka J, et al. CRISPR/Cas9 in *Leishmania mexicana*: A case study of LmxBTN1. *PLoS One*. 2018;13(2).
81. Martel D, Beneke T, Gluenz E, Späth GF, Rachidi N. Characterisation of Casein Kinase 1.1 in *Leishmania donovani* Using the CRISPR Cas9 Toolkit. *Biomed Res Int*. 2017;2017.
82. Zhang C, Matlashewski W-W. CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. *MBio*. 2015;6(4):861–76.
83. Lander N, Li Z-H, Niyogi S, Docampo R. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes

- in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. MBio. 2015 Sep 1;6(4):1–15.
84. Cruz-Bustos T, Moreno SNJ, Docampo R. Detection of Weakly Expressed *Trypanosoma cruzi* Membrane Proteins Using High-Performance Probes. J Eukaryot Microbiol. 2018 Jul;65(5):722–8.
85. Al-Khuwaitir TS, Abdulwahab AA, El-Sharqawy TM, Cheryakkath AA, Sherbeeni SM. Actinomycotic liver abscess. Saudi Med J. 2000;21(8):771–4.
86. Minning TA, Weatherly DB, Atwood Iii J, Orlando R, Tarleton RL. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. 2009;
87. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. Nat Genet. 2007;39(7):839–47.
88. Padmanabhan PK, Dumas C, Samant M, Rochette A, Simard MJ, Papadopoulou B. Novel Features of a PIWI-Like Protein Homolog in the Parasitic Protozoan Leishmania. PLoS One. 2012;7(12).
89. Valencia-sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. 2006;515–24.
90. Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, Tarleton RL. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. MBio. 2015 Dec 30;6(1):1–11.
91. Glover L, Mcculloch R, Horn D. Sequence homology and

- microhomology dominate chromosomal double-strand break repair in African trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(8):2608–18.
92. Takagi YI, Akutsu YI, Doi MI, Furukawa KI. Utilization of proliferable extracellular amastigotes for transient gene expression, drug sensitivity assay, and CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Trypanosoma cruzi*. 2019;
93. Machado-Silva A, Cerqueira PG, Grazielle-Silva V, Gadelha FR, Peloso E de FE. FE de F, Teixeira SMR, et al. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2016;767:8–22.
94. Jian C, Xu F, Hou T, Sun T, Li J, Cheng H, et al. Deficiency of PHB complex impairs respiratory supercomplex formation and activates mitochondrial flashes. *J Cell Sci.* 2017;130(15):2620–30.
95. Eberhardt M. Reactive Oxygen Metabolites. 1st Editio. CRC Press, editor. CRC Press; 2000. 1-608 p.
96. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Vol. 58, *International Journal of Radiation Biology.* Oxford University Press; 1990. 725-725 p.
97. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. Vol. 552, *Journal of Physiology.* 2003. p. 335–44.
98. Gupta S, Wen J-J, Garg NJ. Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009;2009:1–8.
99. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. Vol. 43, *Cardiovascular Research.* 1999. p. 521–31.
100. Fenton HJH. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of

- iron. *J Chem Soc, Trans.* 1894;65:899–910.
101. Bautista P, Mohedano AF, Casas JA, Zazo JA, Rodriguez JJ. An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. Vol. 83, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2008. p. 1323–38.
 102. Koppenol WH, Nuell MJ, Stewart DA, Walker L, Friedman V, Wood CM, et al. The Haber-Weiss cycle – 70 years later. *Redox Rep.* 2001 Mar 19;6(4):229–34.
 103. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984;219(1):1–14.
 104. Cárdenas RN, Pedraza CJ. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educ Química.* 2005;12(2):164–73.
 105. Dres. Israel Korc M, Bidegain MM. Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. *Rev médica del Uruguay.* 1995;11:121–35.
 106. Schulz D, Zaringhalam M, Papavasiliou FN, Kim H-S. Base J and H3.V Regulate Transcriptional Termination in *Trypanosoma brucei*. 2016;
 107. Borst P, Sabatini R. Base J: Discovery, Biosynthesis, and Possible Functions. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62(1):235–51.
 108. Alvarez MN, Piacenza L, Irigoín F, Peluffo G, Radi R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys.* 2004 Dec;432(2):222–32.
 109. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-

- derived peroxyxynitrite. *Biochem J.* 2008 Mar;410(2):359–68.
110. Ursic-Bedoya RJ, Lowenberger CA. *Rhodnius prolixus*: Identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. *Dev Comp Immunol.* 2007;31(2):109–20.
111. Fung CP, Jang TN, Liu CY, Lau YJ, Liu YC, Chuang YC, et al. Antimicrobial susceptibility and β -lactamase production of *Moraxella catarrhalis* isolates in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 1995;94(9):548–54.
112. Beschin A, Van Den Abbeele J, De Baetselier P, Pays E. African trypanosome control in the insect vector and mammalian host. *Trends Parasitol.* 2014;30(11):538–47.
113. Coustou V, Besteiro S, Rivière L, Biran M, Biteau N, Franconi JM, et al. A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):16559–70.
114. Carlos Engel J, Franke De Cazzulo BM, Stoppani AOM, Cannata JJB, Cazzulo JJ. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes*. Vol. 26, *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1987.
115. Atwood JA, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, et al. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. *Science* (80-). 2005 Jul 15;309(5733):473–6.
116. Paes LS, Suárez Mantilla B, Zimbres FM, Pral EMF, Diogo de Melo P, Tahara EB, et al. Proline Dehydrogenase Regulates Redox State and Respiratory Metabolism in *Trypanosoma cruzi*.

- PLoS One. 2013;8(7).
117. Sayé M, Miranda MR, Di Girolamo F, De Los M, Cá M, Pereira CA. Proline Modulates the *Trypanosoma cruzi* Resistance to Reactive Oxygen Species and Drugs through a Novel D, L-Proline Transporter. PLoS One. 2014;9(3).
 118. Freire ACG, Alves CL, Goes GR, Resende BC, Moretti NS, Nunes VS, et al. Catalase expression impairs oxidative stress-mediated signalling in *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. 2017;144(11):1498–510.
 119. Piacenza L, Zago MP, Peluffo G, Alvarez MN, Basombrio MA, Radi R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. Int J Parasitol. 2009 Nov;39(13):1455–64.
 120. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martínez A, Radi R. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. Antioxid Redox Signal. 2013 Sep;19(7):723–34.
 121. de Figueiredo Peloso E, Vitor SC, Ribeiro LHG, Piñeyro MD, Robello C, Gadelha FR. Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. J Bioenerg Biomembr. 2011 Aug;43(4):419–24.
 122. Mateo H, Marín C, Pérez-Cordón G, Sánchez-Moreno M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008 May;103(3):271–6.
 123. Aguiar PHN, Furtado C, Repolês BM, Ribeiro GA, Mendes IC, Peloso EF, et al. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(6):e2279.

124. Goes GR, Rocha PS, Diniz ARS, Aguiar PHN, Machado CR, Vieira LQ. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Apr;10(4):e0004555.
125. Furtado C, Kunrath-Lima M, Rajão MA, Mendes IC, de Moura MB, Campos PC, et al. Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. PLoS One. 2012;7(8).
126. Aguiar PHN, Furtado C, Repolês BM, Ribeiro GA, Mendes IC. Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(6):2279.
127. Paiva CN, Medei E, Bozza MT. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. 2018;1–19.
128. Imlay JA. Oxidative Stress. EcoSal Plus. 2009;3(2).
129. Goes GR, Rocha PS, Diniz ARS, Aguiar PHN, Machado CR, Vieira LQ. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. Oliveira PL, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Apr 1;10(4):e0004555.
130. Paiva CN, Bozza MT. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? Antioxid Redox Signal. 2014;20(6):1000–37.
131. Paiva CN, Feijó DF, Dutra FF, Carneiro VC, Freitas GB, Alves LS, et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J Clin Invest. 2012;122(7):2531–42.
132. Browman DT. Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. J Cell Sci. 2006 Aug 1;119(15):3149–60.

133. Tavernarakis N, Driscoll M, Kyripides NC. The SPFH domain: Implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. Vol. 24, Trends in Biochemical Sciences. 1999. p. 425–7.
134. Morrow IC, Parton RG. Flotillins and the PHB domain protein family: Rafts worms and anaesthetics. *Traffic*. 2005 Sep 1;6(9):725–40.
135. Rivera-Milla E, Stuermer CAO, Málaga-Trillo E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: Convergent evolution of the SPFH domain. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Feb 2;63(3):343–57.
136. Kihara A, Akiyama. Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(11):5544–9.
137. Steglich G, Neupert W, Langer T. Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Cell Biol*. 1999 May;19(5):3435–42.
138. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Oct 1;20(8):394–401.
139. Langhorst MF, Reuter A, Stuermer CAO. Scaffolding microdomains and beyond: The function of reggie/flotillin proteins. Vol. 62, Cellular and Molecular Life Sciences. 2005. p. 2228–40.
140. Di C, Xu W, Su Z, Yuan JS. Comparative genome analysis of PHB gene family reveals deep evolutionary origins and diverse gene function. *BMC Bioinformatics*. 2010 Oct 7;11 Suppl 6(Suppl 6):S22.

141. Tatsuta T, Model K, Langer T. Formation of Membrane-bound Ring Complexes by Prohibitins in Mitochondria. *Mol Biol Cell*. 2005;16:248–59.
142. Browman DT, Hoegg MB, Robbins SM. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol*. 2007;17(8):394–402.
143. Chowdhury I, Thompson WE, Thomas K. Prohibitins Role in Cellular Survival Through Ras-Raf-MEK-Erk Pathway. *J Cell Physiol*. 2015 Aug;229(8):998–1004.
144. Reuter AT, Stuermer CAO, Plattner H. Identification, localization, and functional implications of the microdomain-forming stomatin family in the ciliated protozoan *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryot Cell*. 2013;12(4):529–44.
145. Mishra S, Murphy LC, Nyomba BLLG, Murphy LJ. Prohibitin: A potential target for new therapeutics. Vol. 11, *Trends in Molecular Medicine*. 2005. p. 192–7.
146. Nagavi JB, Gurupadayya BM. Analytical method development and validation for evaluating the stability parameters for the simultaneous estimation of clopidogrel bisulphate and omeprazole using RP-HPLC. *Indian Drugs*. 2016;53(1):60–7.
147. McClung JK, Danner DB, Stewart DA, Smith JR, Schneider EL, Lumpkin CK, et al. Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Nov;164(3):1316–22.
148. Nuell MJ, Stewart DA, Walker L, Friedman V, Wood CM, Owens GA, et al. Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol Cell Biol*. 1991

- Mar;11(3):1372–81.
149. Chowdhury I, Thomas K, Thompson WE. Prohibitin (PHB) roles in granulosa cell physiology. *Cell Tissue Res.* 2016 Jan;363(1):19–29.
 150. Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med.* 2006;10(2):353–63.
 151. Merkwirth C, Langer T. Prohibitin function within mitochondria: Essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2009 Jan;1793(1):27–32.
 152. Terashima¹ M, Ng Kim² K-M, Adachi T, Nielsen PJ, Reth M, Kohler G, et al. The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. Vol. 13, *The EMBO Journal.* 1994.
 153. Gehl B, Sweetlove LJ. Mitochondrial Band-7 family proteins: scaffolds for respiratory chain assembly? *Front Plant Sci.* 2014;5:141.
 154. Hinderhofer M, Walker CA, Friemel A, Stuermer CA, Möller HM, Reuter A. Evolution of prokaryotic SPFH proteins. *BMC Evol Biol.* 2009;9(1).
 155. Chen YW, Chou HC, Lyu PC, Yin HS, Huang FL, Chang WSW, et al. Mitochondrial proteomics analysis of tumorigenic and metastatic breast cancer markers. *Funct Integr Genomics.* 2011 Jun 19;11(2):225–39.
 156. Týč J, Faktorová D, Kriegová E, Jirků M, Vávrová Z, Maslov DA, et al. Probing for primary functions of prohibitin in *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol.* 2010 Jan;40(1):73–83.
 157. Nijtmans LGJ, de Jong L, Artal Sanz M, Coates PJ, Berden JA, Back JW, et al. Prohibitins act as a membrane-bound chaperone

- for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* 2000 Jun 1;19(11):2444–51.
158. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Opposing function of mitochondrial prohibitin in aging. *Aging (Albany NY)*. 2010 Dec 16;2(12):1004–11.
159. Zhou P, Qian L, D'Aurelio M, Cho S, Wang G, Manfredi G, et al. Prohibitin Reduces Mitochondrial Free Radical Production and Protects Brain Cells from Different Injury Modalities. *J Neurosci.* 2012 Jan 11;32(2):583–92.
160. Jain R, Ghoshal A, Mandal C, Shaha C. Leishmania cell surface prohibitin: role in host-parasite interaction. *Cell Microbiol.* 2010 Apr;12(4):432–52.
161. Cruz-Bustos T, Ibarrola-Vannucci AK, Díaz-Lozano I, Ramírez JL, Osuna A. Characterization and functionality of two members of the SPFH protein superfamily, prohibitin 1 and 2 in *Leishmania major*. *Parasit Vectors.* 2018 Dec 4;11(1):622.
162. De Pablos LM, González GG, Parada JS, Hidalgo VS, Lozano IMD, Samblás MMG, et al. Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by *Trypanosoma cruzi*. Adams JH, editor. *Infect Immun.* 2011 Oct;79(10):3993–4001.
163. Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles M de N, et al. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988;83(1):123–33.
164. Bonaldo MC, Souto-Padron T, De Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J*

- Cell Biol. 1988;106(4):1349–58.
165. Osuna A, Ortega G, Gamarro F, Castanys S, Mascaro MC. Some factors affecting the in vitro invasion of HeLa cells by *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol. 1984;14(3):253–7.
 166. Marques A, Nakayasu E, Almeida I. Purification of extracellular and intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* from mammalian host-infected cells. Protoc Exch. 2014 Nov 8;1–8.
 167. Díaz Lozano IM, De Pablos LM, Longhi SA, Zago MP, Schijman AG, Osuna A. Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. Sci Rep. 2017;7(November 2016):1–14.
 168. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 1985;33(1985):103–19.
 169. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 1983 Jun;166(4):557–80.
 170. Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. J Mol Biol. 1992;226(3):735–45.
 171. Alonso VL, Ritagliati C, Cribb P, Serra EC. Construction of three new gateway® expression plasmids for *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(8):1081–5.
 172. Vazquez MP, Levin MJ. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. Gene. 1999;239(2):217–25.
 173. Lander N, Li ZH, Niyogi S, Docampo R. CRISPR/Cas9-induced

- disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *MBio*. 2015;6(4).
174. Lander N, Li ZH, Niyogi S, Docampo R, Beneke T, Madden R, et al. CRISPR/Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *J Biol Chem*. 2016;291(6):1–15.
175. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Vol. 72, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. 1976.
176. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.
177. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1852–8.
178. Zhou W, Merrick BA, Khaledi MG, Tomer KB. Detection and sequencing of phosphopeptides affinity bound to immobilized metal ion beads by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2000;11(4):273–82.
179. De Pablos LM, González GG, Parada JS, Hidalgo VS, Lozano IMD, Samblás MMG, et al. Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2011;79(10):3993–4001.
180. Jimenez-Ortiz A, Guevara DC, Osuna-Carrillo A, Alonso C. *Trypanosoma cruzi* induces changes in the nucleic acids content

- of host HeLa cells "in vitro". *Ann Parasitol Hum Comp.* 1984;59(6):573–81.
181. Ricardo Martínez Rodríguez. *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica* - Ricardo Martínez Rodríguez - Google Libros. 2008. 783 p.
 182. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado- Nilsson E, et al. The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods.* 2001;24(3):218–29.
 183. Tarleton R, Peng D. EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microb Genomics.* 2015;1(4):1–7.
 184. Lander N, Chiurillo MA, Storey M, Vercesi AE, Docampo R. CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal tagging of *Trypanosoma cruzi* genes reveals the acidocalcisome localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 2016;291(49):25505–15.
 185. Peng YT, Chen P, Ouyang RY, Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis.* 2015;20(9):1135–49.
 186. Aphasizhev R, Aphasizheva I, Simpson L. Multiple terminal uridylyltransferases of trypanosomes. *FEBS Lett.* 2004 Aug 13;572(1–3):15–8.
 187. Kang X, Falick AM, Nelson RE, Gao G, Rogers K, Aphasizhev R, et al. Disruption of the Zinc Finger Motifs in the *Leishmania tarentolae* LC-4 (=TbMP63) L-complex Editing Protein Affects the Stability of the L-complex. *J Biol Chem.* 2004;279(6):3893–9.

188. Martínez-Calvillo S, Saxena A, Green A, Leland A, Myler PJ. Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *Int J Parasitol*. 2007;37(5):491–502.
189. Zíková A, Panigrahi AK, Dalley RA, Acestor N, Anupama A, Ogata Y, et al. *Trypanosoma brucei* mitochondrial ribosomes: affinity purification and component identification by mass spectrometry Running Title: Proteomics of mitochondrial ribosomes as Manuscript M700490-MCP200 Downloaded from Downloaded from. Vol. 24, MCP Papers in Press. Published on March. 2008.
190. Dyer P, Dean S, Sunter J. High-throughput Gene Tagging in *Trypanosoma brucei*. *J Vis Exp*. 2016;(114):54342.
191. Cámara M de los M, Bouvier LA, Canepa GE, Miranda MR, Pereira CA. Molecular and Functional Characterization of a *Trypanosoma cruzi* Nuclear Adenylate Kinase Isoform. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2).
192. GE Healthcare. Purifying Challenging Proteins. *Gen Electr Co*. 2007;28-9095–31:1–107.
193. Docampo R. Molecular parasitology in the 21st Century. *Essays Biochem*. 2011;51:1–13.
194. Glover L, Jun J, Horn D. Microhomology-mediated deletion and gene conversion in African trypanosomes. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(4):1372–80.
195. Burton P, McBride DJ, Wilkes JM, Barry JD, McCulloch R. Ku Heterodimer-Independent End Joining in *Trypanosoma brucei* Cell Extracts Relies upon Sequence Microhomology. *Eukaryot Cell*. 2007;6(10):1773–81.
196. McVey M, Lee SE. MMEJ repair of double-strand breaks

- (director's cut): deleted sequences and alternative endings. Vol. 24, Trends in Genetics. 2008. p. 529–38.
197. Nussenzweig A, Nussenzweig MC. Leading Edge A Backup DNA Repair Pathway Moves to the Forefront. *Cell*. 2007;131.
198. Silvius JR. Role of cholesterol in lipid raft formation: Lessons from lipid model systems. Vol. 1610, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2003. p. 174–83.
199. Zhang K, Showalter M, Revollo J, Hsu FF, Turk J, Beverley SM. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*. *EMBO J*. 2003;22(22):6016–26.
200. De Almeida RFM, Loura LMS, Fedorov A, Prieto M. Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: A time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J Mol Biol*. 2005;346(4):1109–20.
201. Munro S. ScienceDirect - Cell : Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell*. 2003;115:377–88.
202. Di Vizio D, Steen H, Freeman MR, Yang W, Kirchner M. Proteome Scale Characterization of Human S -Acylated Proteins in Lipid Raft-enriched and Non-raft Membranes. *Mol Cell Proteomics*. 2009;9(1):54–70.
203. Levental I, Lingwood D, Grzybek M, Coskun U, Simons K. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(51):22050–4.
204. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RGW. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992 Feb 21;68(4):673–82.
205. Brown RF. Spontaneous lipid transfer between organized lipid assemblies. Vol. 1113, *BBA - Reviews on Biomembranes*.

- Elsevier; 1992. p. 375–89.
206. Anderson RGW. The calveolae membrane system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67(1):199–225.
207. Jupe ER, Liu XT, Kiehlbauch JL, McClung JK, Dell’Orco RT. Prohibitin in breast cancer cell lines: loss of antiproliferative activity is linked to 3’ untranslated region mutations. *Cell Growth Differ.* 1996 Jul;7(7):871–8.
208. Stewart GW, Argent AC, Dash BCJ. Stomatin: a putative cation transport regulator in the red cell membrane. Vol. 1225, *BBA - Molecular Basis of Disease.* 1993. p. 15–25.
209. Kihara A, Akiyama Y, Ito K. A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J.* 1996 Nov 15;15(22):6122–31.
210. Wienke D, Drengk A, Schmauch C, Jenne N, Maniak M. Vacuolin, a flotillin/reggie-related protein from *Dictyostelium* oligomerizes for endosome association. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(9–10):991–1000.
211. Sharma A, Qadri A. Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2004 Dec 14;101(50):17492–7.
212. Piper PW, Bringloe D. Loss of prohibitins, though it shortens the replicative life span of yeast cells undergoing division, does not shorten the chronological life span of G0-arrested cells. *Mech Ageing Dev.* 2002 Feb;123(4):287–95.
213. Mengwasser J, Piau A, Schlag P, Sleeman JP. Differential immunization identifies PHB1/PHB2 as blood-borne tumor

- antigens. *Oncogene*. 2004 Sep 2;23(44):7430–5.
214. Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Löwer B, Wunderlich FT, et al. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev*. 2008 Feb 15;22(4):476–88.
215. Osman C, Merkwirth C, Langer T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci*. 2009;122(21):3823–30.
216. Thompson WE, Asselin E, Branch A, Stiles JK, Sutovsky P, Lai L, et al. Regulation of Prohibitin Expression During Follicular Development and Atresia in the Mammalian Ovary1. *Biol Reprod*. 2004;71(1):282–90.
217. Aicart-Ramos C, Valero RA, Rodriguez-Crespo I. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. Vol. 1808, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2011. p. 2981–94.
218. Martin DDO, Beauchamp E, Berthiaume LG. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. Vol. 93, *Biochimie*. 2011. p. 18–31.
219. Ande SR, Gu Y, Nyomba BLG, Mishra S. Insulin induced phosphorylation of prohibitin at tyrosine114 recruits Shp1. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2009;1793(8):1372–8.
220. Mishra S, Ande SR, Nyomba BLG. The role of prohibitin in cell signaling. Vol. 277, *FEBS Journal*. 2010. p. 3937–46.
221. Jiang L, Dong P, Zhang Z, Li C, Li Y, Liao Y, et al. Akt phosphorylates Prohibitin 1 to mediate its mitochondrial localization and promote proliferation of bladder cancer cells. *Cell Death Dis*. 2015;6(2):1–13.

222. Ande SR, Xu YXZ, Mishra S. Prohibitin: a potential therapeutic target in tyrosine kinase signaling. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2(September):17059.
223. Sun L, Cao X, Liu B, Huang H, Wang X, Sui L, et al. CaMK IV phosphorylates prohibitin 2 and regulates prohibitin 2-mediated repression of MEF2 transcription. *Cell Signal.* 2011;23(10):1686–90.
224. Kategaya LS, Hilliard A, Zhang L, Asara JM, Ptáček LJ, Fu YH. Casein kinase 1 proteomics reveal prohibitin 2 function in molecular clock. *PLoS One.* 2012;7(2).
225. Thompson WE, Ramalho-Santos J, Sutovsky P. Ubiquitination of Prohibitin in Mammalian Sperm Mitochondria: Possible Roles in the Regulation of Mitochondrial Inheritance and Sperm Quality Control. *Biol Reprod.* 2003;69(1):254–60.
226. Ikonen E, Fiedler K, Parton RG, Simons K. Prohibitin, an antiproliferative protein, is localized to mitochondria. *FEBS Lett.* 1995;358(3):273–7.
227. Kasashima K, Ohta E, Kagawa Y, Endo H. Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *J Biol Chem.* 2006;281(47):36401–10.
228. Montano MM, Ekena K, Delage-Mourroux R, Chang W, Martini P, Katzenellenbogen BS. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens (tamoxifen dominant negative receptors breast cancer). Vol. 96, *Medical Sciences.* 1999.
229. Bauer DE, Vander Heiden MG, Thompson CB, Choy JS, VanderWeele DJ, Kron SJ, et al. Bcl-xL Complements

- Saccharomyces cerevisiae* Genes That Facilitate the Switch from Glycolytic to Oxidative Metabolism. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44870–6.
230. Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, Joshi B, Chellappan S. Prohibitin Induces the Transcriptional Activity of p53 and Is Exported from the Nucleus upon Apoptotic Signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(48):47853–61.
231. Nijtmans LGJ, Sanz MA, Grivell LA, Coates PJ. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly. *Cell Mol life Sci.* 2002;59:143–55.
232. Berger KH, Yaffe MP. Prohibitin family members interact genetically with mitochondrial inheritance components in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1998;18(7):4043–52.
233. Coates PJ, Jamieson DJ, Smart K, Prescott AR, Hall PA. The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr Biol.* 1997 Aug 1;7(8):607–10.
234. Sanz MA, Tsang WY, Willems EM, Grivell LA, Lemire BD, Van der Spek H, et al. The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 2003;278(34):32091–9.
235. Gatsi R, Schulze B, Rodríguez-Palero MJ, Hernando-Rodríguez B, Baumeister R, Artal-Sanz M. Prohibitin-Mediated lifespan and mitochondrial stress implicate SGK-1, insulin/IGF and mTORC2 in *C. elegans*. *PLoS One.* 2014;9(9).
236. Zhou Z, Ai H, Li K, Yao X, Zhu W, Liu L, et al. Prohibitin 2 localizes in nucleolus to regulate ribosomal RNA transcription and facilitate cell proliferation in RD cells. *Sci Rep.* 2018 Dec 24;8(1):1479.

237. Schleicher M, Shepherd BR, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, Pan Y, et al. Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *J Cell Biol.* 2008;180(1):101–12.
238. Brosson S, Fontaine F, Vermeersch M, Perez-Morga D, Pays E, Bousbata S, et al. Specific endocytosis blockade of *Trypanosoma cruzi* exposed to a poly-LAcNAc binding lectin suggests that lectin-sugar interactions participate to receptor-mediated endocytosis. *PLoS One.* 2016;11(9):1–27.
239. Ross JA, Robles-Escajeda E, Oaxaca DM, Padilla DL, Kirken RA. The prohibitin protein complex promotes mitochondrial stabilization and cell survival in hematologic malignancies. *Oncotarget.* 2017;8(39):65445–56.
240. Koppen M, Langer T. Protein degradation within mitochondria: Versatile activities of AAA proteases and other peptidases. Vol. 42, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2007. p. 221–42.
241. Dias DS, Ribeiro PAF, Martins VT, Lage DP, Ramos FF, Dias ALT, et al. Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. *Cell Immunol.* 2018 Jan;323(November 2017):59–69.
242. Araújo PR, Teixeira SM. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A review. Vol. 106, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2011. p. 257–66.
243. Martínez-Calvillo S, Vizuet-De-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. Gene expression

- in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010.
244. Oliveira MT De, Taciana K, Silva S, Neves LX, Jean M, Toledo DO, et al. Differential expression of proteins in genetically distinct *Trypanosoma cruzi* samples (TcI and TcII DTUs) isolated from chronic Chagas disease cardiac patients. *Parasit Vectors.* 2018;1:1–11.
245. Seco-Hidalgo V, De Pablos LM, Osuna A. Transcriptional and phenotypical heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* cell populations. *Open Biol.* 2015;5(12).
246. Villarreal D, Nirdé P, Hide M, Barnabé C, Tibayrenc M. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2701–9.
247. Park SS-E, Xu J, Frolova A, Liao L, Malley BWO, Katzenellenbogen BS, et al. Genetic deletion of the repressor of estrogen receptor activity (REA) enhances the response to estrogen in target tissues in vivo. *Mol Cell Biol.* 2005;25(5):1989–99.
248. Ribeiro AR, Lima L, De Almeida LA, Monteiro J, Moreno CJG, Nascimento JD, et al. Biological and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from four states of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(2):453–63.
249. Kalem MC, Gerasimov ES, Vu PK, Zimmer SL. Gene expression to mitochondrial metabolism: Variability among cultured *Trypanosoma cruzi* strains. *PLoS One.* 2018;13(5):1–22.
250. Gonçalves RLS, Menna Barreto RFS, Polycarpo CR, Gadelha FR, Castro SL, Oliveira MF. A comparative assessment of

- mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr. 2011;43(6):651–61.
251. Adroher FJ, Osuna A, Lupiáñez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II. Hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. Mol Cell Biochem. 1990;94(1):71–82.
252. Lupiáñez JA, Adroher FJ, Vargas AM, Osuna A. Differential behaviour of glucose 6-phosphate dehydrogenase in two morphological forms of *Trypanosoma cruzi*. Int J Biochem. 1987;19(11):1085–9.
253. Sanchez-moreno M, Fernandez-becerra MC, Castilla-calvente JJ, Osuna A. Metabolic studies by ¹H NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by “in vitro” culture. FEMS Microbiol Lett. 1995;133(1–2):119–25.
254. Michels PAM, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2006;1763(12):1463–77.
255. Adroher, F. J. & Osuna A. Fructose 1, 6-Bisphosphatase Activity in Two *Trypanosoma cruzi* Morphological Forms. Am Soc Parasitol Fruct. 1987;73(2):438–41.
256. Tyler KM, Olson CL, Engman DM. The Life Cycle Of *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol. 2003;31:1–11.
257. Chang KP, Trager W. Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates. Science (80-). 1974 Feb 8;183(4124):531–2.
258. Chang CS, Chang K-P. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana*

- amazonensis. *Mol Biochem Parasitol.* 1985;16(3):267–76.
259. Symbiote-free A. Nutritional Significance of Symbiotic Bacteria in Two Species of Hemoflagellates Cyclic Adenosine Monophosphate: Selective Increase in Caudate Nucleus after Administration of L-Dopa. *Science* (80-). 1974;531(16).
260. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2004 Apr 30;117(3):285–97.
261. Kořený L, Lukeš J, Oborník M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all? *Int J Parasitol.* 2010;40(2):149–56.
262. Tripodi KEJ, Menendez Bravo SM, Cricco JA. Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. *Enzyme Res.* 2011;2011(1).
263. Lombardo ME, Araujo LS, Batlle A. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(8):1263–71.
264. Lara FA, Sant’Anna C, Lemos D, Laranja GAT, Coelho MGP, Reis Salles I, et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(1):16–22.
265. Souza CF, Carneiro AB, Silveira AB, Laranja GAT, Silva-Neto MAC, Costa SCG da, et al. Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(3):541–6.
266. de Almeida Nogueira NP, de Souza CF, de Souza Saraiva FM, Sultano PE, Dalmau SR, Bruno RE, et al. Heme-Induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates Camkii-Like that triggers

- epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. *PLoS One*. 2011;6(10).
267. Ande SR, Mishra S. Nuclear coded mitochondrial protein prohibitin is an iron regulated iron binding protein. *Mitochondrion*. 2011 Jan 1;11(1):40–7.
268. Krewulak KD, Vogel HJ. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1778(9):1781–804.
269. Papinutto E, Dundon WG, Pitulis N, Battistutta R, Montecucco C, Zanotti G, et al. Structure of two iron-binding proteins from *Bacillus anthracis*. *J Biol Chem*. 2002 Apr 26;277(17):15093–8.
270. Theiss AL, Idell RD, Srinivasan S, Klapproth J-M, Jones DP, Merlin D, et al. Prohibitin protects against oxidative stress in intestinal epithelial cells. *FASEB J*. 2007 Jan;21(1):197–206.
271. Theiss AL, Sitaraman S V. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. Vol. 1813, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2011. p. 1137–43.
272. Kathiria AS, Butcher LD, Feagins LA, Souza RF, Boland CR, Theiss AL. Prohibitin 1 modulates mitochondrial stress-related autophagy in human colonic epithelial cells. *PLoS One*. 2012;7(2).
273. Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol*. 2014;10(1):9–17.
274. Mello Filho AC, Meneghini R. In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *BBA - Gene Struct Expr*. 1984;781(1–2):56–63.
275. JAMES A. IMIAY, SHERMAN M. CHIN SL. Toxic DNA Damage by Hydrogen Peroxide through the Fenton Reaction in

- vivo and in vitro. *Science* (80-). 1988;240(4852):640–2.
276. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature*. 2009;461(7265):793–7.
277. Signorile A, Sgaramella G, Bellomo F, De Rasmio D. Prohibitins: A Critical Role in Mitochondrial Functions and Implication in Diseases. *Cells*. 2019;8(1):71.
278. Piñeyro MD, Arcari T, Robello C, Radi R, Trujillo M. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: High efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Mar 15;507(2):287–95.
279. Mateo H, Marín C, Pérez-Cordón G, Sánchez-Moreno M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 May;103(3):271–6.
280. Temperton NJ, Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Mol Biochem Parasitol*. 1998;96(1–2):167–76.
281. Beltran-Hortelano I, Perez-Silanes S, Galiano S. Trypanothione Reductase and Superoxide Dismutase as Current Drug Targets for *Trypanosoma cruzi*: An Overview of Compounds with Activity against Chagas Disease. *Curr Med Chem*. 2017 May 31;24(11).
282. Osuna A, Adroher FJ, Lupiáñez JA. Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma*

- cruzi*. Cell Differ Dev. 1990 Jan;30(2):89–95.
283. Hamed A, Botelho L, Britto C, Fragoso SP, Umaki ACS, Goldenberg S, et al. In vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression. Mol Biochem Parasitol. 2015;200(1–2):9–18.
284. Adroher FJ, Osuna A, Lupiáñez JA. Struvite (MgNH₄PO₄·6H₂O) crystal formation by *Trypanosoma cruzi* in culture. Chemosphere. 1988;17(3):609–15.
285. Vanrell MC, Losinno AD, Cueto JA, Balcazar D, Fraccaroli LV, Carrillo C, et al. The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(11):1–23.
286. MacLeod ET, Maudlin I, Darby AC, Welburn SC. Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse. Parasitology. 2007;134(6):827–31.
287. Nogueira NP, Saraiva FMSS, Sultano PE, Cunha PRBBBB, Laranja GATT, Justo GAGA, et al. Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. Knight M, editor. PLoS One. 2015 Feb 11;10(2):e0116712.
288. Zurzolo C, Simons K. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: Membrane organization and transport. Biochim Biophys Acta - Biomembr. 2016;1858(4):632–9.
289. Salaun C, Greaves J, Chamberlain LH. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. J Cell Biol. 2010;191(7):1229–38.
290. Maeda A, Uchida M, Nishikawa S, Nishino T, Konishi H. Role

- of N-myristoylation in stability and subcellular localization of the CLPABP protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;495(1):1249–56.
291. Navarro-Lérida I, Alvarez-Barrientos A, Gavilanes F, Rodriguez-Crespo I. Distance-dependent cellular palmitoylation of de-novo-designed sequences and their translocation to plasma membrane subdomains. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 15):3119–30.
292. McCabe JB, Berthiaume LG. N-Terminal Protein Acylation Confers Localization to Cholesterol, Sphingolipid-enriched Membranes But Not to Lipid Rafts/Caveolae. *Mol Biol Cell.* 2001;12(11):3601–17.
293. Roberts AJ, Torrie LS, Wyllie S, Fairlamb AH. Biochemical and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* N - myristoyltransferase. *Biochem J.* 2014;459(2):323–32.
294. Batista CM, Kalb LC, Moreira CM do N, Batista GTH, Eger I, Soares MJ. Identification and subcellular localization of TcHIP, a putative Golgi zDHHC palmitoyl transferase of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2013;134(1):52–60.
295. Barry JD, Barry JD. Capping of Variable Antigen on *Trypanosoma Brucei*, and Its Immunological and Biological Significance. *J Cell Sci.* 1979;37:287–302.
296. Schmuñis GA, Szarfman A, Langembach T de SW. Induction of Capping in Blood-Stage Trypomastigotes of. *Infect Immun.* 1978;20(2):567–9.
297. Gonc, alves MF, Umezawa ES, Katzin AM, de Souza W, Alves MJM, et al. *Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol.* 1991;72(1):43–53.
298. Nickel W, Seedorf M. Unconventional Mechanisms of Protein

- Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells. 2008;
299. Watanabe Costa R, da Silveira JF, Bahia D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. Vol. 7, *Frontiers in Microbiology*. 2016.
300. Bayer-Santos E, Aguilar-Bonavides C, Rodrigues SP, Cordero EM, Marques AF, Varela-Ramirez A, et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J Proteome Res*. 2013 Feb 4;12(2):883–97.
301. Díaz Lozano IM, De Pablos LM, Longhi SA, Zago MP, Schijman AG, Osuna A. Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. *Sci Rep*. 2017 Mar 15;7:44451.
302. Antonov NS, Stulova OY. Respiratory damage in subjects who worked in the zone of radioactive contamination after the chernobyl accident. *Ter Arkh*. 1996;68(3).
303. Nakayasu ES, Torrecilhas ACT, Gozzo F, Nohara LL, Lamont D, Alves MJM, et al. The proteome of *Trypanosoma cruzi* shed vesicles involved in host immuno modulation and cell invasion. *Faseb J*. 2006;20(4):A514–A514.
304. Da Silveira JF, Abrahamsohn PA, Colli W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *BBA - Biomembr*. 1979;550(2):222–32.
305. de Pablos Torró LM, Retana Moreira L, Osuna A. Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease. *Front Microbiol*. 2018 Jun 1;9(JUN).
306. Regularly S, Repeats S, Srsrs T, Srsr V. Biological significance

- of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol.* 2000;36:244–6.
307. F. J. M. Mojica, C. Díez-Villaseñor JG-M and CA. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology.* 2009 Mar 1;155(3):733–40.
308. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science (80-).* 2010 Jan 8;327(5962):167–70.
309. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science (80-).* 2010 Jan 8;327(5962):167–70.
310. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnyš V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(39):E2579–86.
311. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (80-).* 2013 Feb 15;339(February):819–24.
312. Brand BT, Eleanor M, Rees DCW. Observations on the respiration of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J Gen Physiol.* 1946;(1929).