



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA FACTOR
ACELERADOR DEL DECAIMIENTO DE TRIPOMASTIGOTES DE
Trypanosoma cruzi RECOMBINANTE (sT-DAF)**

Bastían Nicolás Elgueta Reyes

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: GALIA RAMIREZ TOLOZA
Universidad de Chile

Proyectos FIV- 12101701-9102-181 y URC-024/16

SANTIAGO, CHILE
2021



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA FACTOR
ACELERADOR DEL DECAIMIENTO DE TRIPOMASTIGOTES DE
Trypanosoma cruzi RECOMBINANTE (sT-DAF)**

BASTIÁN NICOLÁS ELGUETA REYES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA: GALIA RAMÍREZ

PROFESOR CORRECTOR: GONZALO CABRERA

PROFESOR CORRECTOR: ALEJANDRO ESCOBAR

SANTIAGO, CHILE

2021

MEMORIA DE TÍTULO

“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA FACTOR ACELERADOR DEL DECAIMIENTO DE TRIPOMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* RECOMBINANTE (sT-DAF)”

“FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT DECAY ACCELERATING FACTOR (ST-DAF) OF *Trypanosoma cruzi* TRYPOMASTIGOTES”

Bastían Nicolás Elgueta Reyes*

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que hicieron posible directamente la realización de esta Memoria, a la Dra. Galia Ramírez que tuvo la más grandes de las paciencias en enseñarme y en esperar cada uno de mis avances que tomaban años, y que junto a Raúl me aconsejaban en todo. Al Dr. Gonzalo Cabrera, quien me enseñó todo lo que tuve que aprender en esta etapa y quien tuvo que soportarme en el laboratorio y lidiar con cada uno de mis errores. A la Dra. Lucía Valenzuela, quien prestó todo su apoyo y su consejo en cada uno de los pasos que enfrenté en el laboratorio. Y no menos importantes, a mis amigos del “club del Cataneo” quienes siempre estuvieron ahí para ayudarme a corregir mis presentaciones y fueron un gran apoyo para ordenar mis ideas.

Y en mayor medida, agradecer a mis padres, que sin ellos no hubiera tenido oportunidad de estar acá. Que, con todo su cansancio y esfuerzo lograron entregarnos a mí y a mis hermanos todas las herramientas necesarias para cumplir nuestros sueños, sacrificando su vida para darnos una a nosotros. Los que dicen que están orgullosos de nosotros, pero no tienen idea que nosotros estamos más orgullosos de ellos. Gracias a mis padrinos, mi tía Cesi y mi tío Titín, mis otros papás, que siempre estuvieron para nosotros para lo que necesitáramos y que, sin ellos no hubiese sido lo mismo. Gracias también a mis suegros, que cumplieron el rol de mis papas mientras estuve lejos. Gracias a Mayra, la compañera de mi vida, que me apoya en todo y que, simplemente sin ella no lo hubiera logrado. Esta vez ya podremos seguir avanzando, perdón la demora.

Dejo un agradecimiento especial a todos los funcionarios y funcionarias de la universidad, los últimos de la lista siempre. Quienes resuelven nuestros problemas, nos apoyan en todo, limpian nuestros desastres y hacen posible que nosotros tengamos el tiempo para dedicarnos a hacer lo que hacemos. Sé que agradecerles no mejora sus vidas, pero no sería lo mismo si no les agradeciera por lo que hacen, ya que es en ellos en donde encontré a la cara más humana de la universidad, y con quienes tuve el agrado de compartir más tiempo.

Bastían E.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario y es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Su ciclo de vida, transcurre entre un vector invertebrado y un hospedero vertebrado. Dentro de este último, *T. cruzi* se convierte en un blanco del sistema de complemento, el cual es parte de la inmunidad innata y cuenta con tres vías de activación; la vía clásica, alterna y de las lectinas. Los tripomastigotes de *T. cruzi* son altamente resistentes a la acción del complemento, no así otros estadios, como los epimastigotes, que son lisados. Esta resistencia se debe a diferentes proteínas presentes en tripomastigotes, que tienen acción reguladora del complemento. Entre estas se encuentra la proteína T-DAF la cual es capaz de inhibir la acción del complemento, en sus tres vías de activación, al evitar la formación y acelerar el decaimiento de las convertasas de C3 del complemento. En una Memoria de Título anterior se generó una proteína T-DAF recombinante, pero de menor tamaño molecular que fue denominada sT-DAF, la cual no fue caracterizada funcionalmente. En esta Memoria se produjo esta misma proteína en condiciones nativas de purificación por medio de bacterias *E. coli*. Realizando un ensayo de inhibición de la lisis mediada por el complemento en epimastigotes, se logró determinar una acción inhibidora del complemento por parte de sT-DAF, al aumentar la supervivencia parasitaria de epimastigotes enfrentados a suero normal humano como fuente del complemento. Queda pendiente evaluar este rol inhibidor en cada una de las vías de activación del complemento. Sin embargo, estos resultados son interesantes, considerando las importantes diferencias que existen entre sT-DAF y la proteína T-DAF original, y considerando las desventajas al utilizar procariontes como fuentes de proteínas recombinantes de eucariontes, debido a las modificaciones postraduccionales, la actividad de sT-DAF era cuestionable. Por ser altamente antigénica, T-DAF puede ser un blanco de diagnóstico y terapéutico, por lo tanto, contar con una proteína recombinante puede facilitar futuros estudios enfocados en esa dirección y permitir el entendimiento sobre otras proteínas reguladoras del complemento de *T. cruzi*.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, complemento, proteína recombinante, T-DAF, regulación.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite and it is the causative agent of Chagas disease. In its life cycle participates an invertebrate vector and a vertebrate host. Within the latter, *T. cruzi* becomes a target of the complement system, which is part of innate immunity and has three activation pathways; the classical, alternate and lectin pathway. Trypomastigotes of *T. cruzi* are highly resistant to the action of complement, but another stages, such as epimastigotes, are lysed. This resistance is due to different proteins present in trypomastigotes, which have a complement regulatory action. Among these, it is the protein T-DAF which is capable to inhibit the action of complement in its three activation pathways by preventing the formation and accelerating the decay of C3 convertases of complement system. In a previous Undergraduate Thesis, a recombinant T-DAF protein was generated, but with a smaller molecular size, which was called sT-DAF. However, this small protein was not functionally characterized. In this Undergraduate Thesis, this protein was produced under native conditions of purification by means of *E. coli* bacteria. Carrying out a complement-mediated lysis inhibition test in epimastigotes, it was possible to determine a complement inhibitory action of sT-DAF by increasing the parasitic survival of epimastigotes confronted with normal human serum as a source of complement. It remains to evaluate this inhibitory role in each of complement activation pathways. However, these results are interesting considering the important differences detected between sT-DAF and the original T-DAF protein, and considering the disadvantages when using prokaryotes as sources of recombinant eukaryotic proteins, due to post-translational modifications, the activity of sT-DAF was questionable. Because T-DAF is highly antigenic, it can be a diagnostic and therapeutic target, therefore, a recombinant protein can facilitate future studies focused in to understand *T. cruzi* complement regulatory proteins.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, complement, recombinant protein, T-DAF, regulation.

INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana (TA) o enfermedad de Chagas (EC) es una enfermedad endémica en todos los países de Sur, Centro y parte de Norteamérica (Antinori *et al.*, 2017), producida por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. La EC se caracteriza por cursar con una fase aguda comúnmente asintomática, y una fase crónica que, entre el 40-50 % de los casos, produce una cardiomiopatía progresiva y/o una alteración en la motilidad de esófago y colon (Rassi *et al.*, 2010). Se estima que entre 6-8 millones de personas se encuentran infectadas con el parásito en todo el mundo (Alvarez *et al.*, 2016), causando 7 mil muertes al año. La EC es la mayor causa de muerte por enfermedad parasitaria en Latinoamérica, además de la causa más común de cardiomiopatía infecciosa a nivel mundial (Chatelain, 2017). El mundo globalizado y la migración humana han hecho que la distribución de la EC, tanto en países endémicos como no endémicos haya cambiado, aumentando los casos de infección en países donde está el vector y expandiendo la distribución geográfica en países no endémicos. Dado este escenario, se ha llegado a clasificar a la enfermedad como reemergente y como una de las enfermedades tropicales desatendidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Connors *et al.*, 2016).

Trypanosoma cruzi es un protozoo parásito del orden Kinetoplastida y de la familia Trypanosomatidae. Como otros kinetoplastidos, contiene ADN mitocondrial dentro de un kinetoplasto, que es un organelo de importante valor diagnóstico, visible en organismos teñidos, vistos al microscopio óptico (Souza, *et al.*, 2010). El parásito cuenta con un complejo ciclo de vida, que normalmente transcurre entre un hospedero vertebrado y otro vector invertebrado, sometiéndose a una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en ambos (Osorio *et al.*, 2012). El vector es un insecto hematófago del orden Hemiptera, de la familia Reduviidae y subfamilia Triatominae (Rassi *et al.*, 2012). Este comienza el ciclo de vida del parásito al consumir sangre de un hospedero vertebrado con tripomastigotes, los cuales, una vez dentro del vector, sufren una transformación a epimastigotes, forma replicativa y no infectante. En el tracto final del intestino del vector, ocurre un proceso de metacicloogénesis, del cual resulta un tripomastigote metacíclico, que es capaz de infectar a un nuevo hospedero vertebrado (Osorio *et al.*, 2012). La transmisión efectiva a un nuevo hospedero se realiza cuando el insecto defeca sobre el mismo, al momento de succionar su

sangre, y estas heces con una carga determinada de tripomastigotes metacíclicos, entran en contacto con las membranas mucosas del vertebrado o con la herida misma por la cual se alimentó el vector. Posteriormente, el parásito ingresa a las células del hospedero, transformándose en un amastigote que, por fisión binaria, es capaz de multiplicarse de manera intracelular, para finalmente salir de las células en una última transformación hacia un tripomastigote circulante (Souza *et al.*, 2010).

Dentro del hospedero vertebrado, *T. cruzi* induce una compleja respuesta inmune debido a la presencia simultánea tanto de los tripomastigotes extracelulares, que circulan por el organismo a través de los fluidos biológicos, como también de los amastigotes intracelulares, que se multiplican en el citoplasma de diferentes tipos celulares (Truyens y Carlier, 2017). *T. cruzi* activa tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa, involucrando citoquinas pro inflamatorias, la activación de linfocitos T CD8+, CD4+, linfocitos B, células *natural killer*, macrófagos, y la activación del sistema del complemento (C) (Ramírez-Tolosa y Ferreira, 2017). Luego de la primera ronda de replicación intracelular, *T. cruzi* escapa al torrente sanguíneo convirtiéndose en un blanco del C (Cardoso *et al.*, 2016). El C es un importante componente del sistema inmune innato (SII), que funciona principalmente como primera línea de defensa contra microorganismos patógenos. Está compuesto por cerca de 30 proteínas, tanto séricas como de membrana (Korbelik y Cecic, 2008), ampliamente distribuidos en la sangre y en los tejidos, donde ellas son sintetizadas y secretadas bajo estímulos específicos, como por ejemplo hormonas y citoquinas. A pesar de la inespecificidad que caracteriza al SII, el C reconoce selectivamente patógenos foráneos y células propias dañadas, utilizando moléculas de reconocimiento en sus 3 vías de activación: clásica, de las lectinas y alterna (Noris y Remuzzi, 2013). La vía clásica (VC) es activada por la unión del complejo C1 (C1q, 2C1r, 2C1s) a varios tipos de activadores que incluyen los complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) que contengan IgM e IgG, proteína C-reactiva, células apoptóticas, entre otras estructuras (Barnum y Schein, 2018). La activación de la vía de las lectinas (VL) comienza con la lectina de unión a manosa (MBL, por sus siglas en inglés Mannose - Binding Lectin), o con ficolinas/colectinas que pueden reconocer patrones de carbohidratos de diferentes microorganismos, como N-acetil-D-glucosamina o D-manosa, logrando activar MBLs asociadas a las serino-proteasas, MASP-1, MASP-2 y MASP-3 (Noris y Remuzzi,

2013). Tanto el complejo C1 de la VC, como las MASP de la VL, participan en la formación de la convertasa de C3 (C4bC2a) al escindir las proteínas del C C4 y C2; esta convertasa continúa la cascada de reacciones al escindir C3 en C3a, que media procesos pro y antiinflamatorios, y C3b, que se une al complejo de convertasa C3, para formar la convertasa de C5, C4bC2aC3b, que escinde C5 en C5a y C5b (Barnum y Schein, 2018). La vía alterna (VA) es diferente a las anteriores, ya que a pesar de que es activada por carbohidratos, lípidos y proteínas ajenas a las propias, en esencia se encuentra siempre activa a niveles bajos (Sarma y Ward, 2011). En esta vía, la proteína C3 es hidrolizada cambiando su conformación, permitiéndole unirse al Factor B, que posteriormente es escindido, formándose así la convertasa C3 de iniciación C3(H₂O)Bb que permite escindir a C3 en C3a y C3b. C3b luego se une al Factor B, en un proceso similar al anterior, que da como resultado la formación de la denominada convertasa de C3 de la VA, C3bBb. Las moléculas de C3b que se forman bajo este sistema, participan así en lo que se denomina un *loop* de amplificación, generándose cientos de C3b que, además se unen a la convertasa de C3 de la VA para formar la convertasa de C5 de la VA, C3bBb3b (Barnum y Schein, 2018). En cualquiera de las 3 vías de activación del C, la formación de una convertasa C5, da por resultado la escisión de C5 en C5a y C5b, llevando a la formación del Complejo de Ataque a Membrana (MAC, por sus siglas en inglés Membrane Attack Complex) al unirse C5b con C6, C7, C8 y varias moléculas de C9 polimerizadas; de esta forma el C tiene una función de lisis de microorganismos patógenos (Noris y Remuzzi, 2013). En el Anexo 3 se muestra un esquema general de las vías de activación del C. El C está altamente regulado, tanto en tiempo como espacio, dejando un muy breve periodo a sus intermediarios para encontrar una partícula aceptora antes de su inactivación (Naik *et al.*, 2013).

El sistema es controlado en diferentes puntos por un número de proteínas reguladoras, que reducen la producción en exceso de mediadores de la inflamación (Barnum, 2016). Dado su considerable potencial tóxico, es necesario proteger al hospedero ante errores en el ataque del C. Para ello, en humanos la activación del C es controlada en primera instancia, por 3 proteínas reguladoras especie-específicas del C, que se encuentran unidas a membranas (mCRPs, por sus siglas en inglés membrane Complement Regulatory Proteins), entre las cuales se encuentra la proteína DAF (del inglés Decay Accelerating Factor) o también conocida como CD55 (Korbelik y Cecic, 2008). DAF es una glicoproteína de 75

kDa de peso molecular, cuya función es proteger al hospedero ante un ataque autólogo del C, evitando la formación de las convertasas de C3 y C5, tanto de la VC como de la VA, inhibiendo la ruptura de C3 y C5 (Christy *et al.*, 2018).

Es sabido que los epimastigotes de *T. cruzi* son lisados rápidamente al ser enfrentados a suero humano no inmunizado, debido a la rápida activación de la VL y VA del C (Lidani *et al.*, 2017). Sin embargo, tanto los tripomastigotes de cultivos celulares, como los tripomastigotes metacíclicos, son capaces de inhibir la lisis mediada por el C (Joiner *et al.*, 1988), reportándose una dificultad en la formación de la convertasa C3, lo que sugeriría la existencia de una molécula que acelere el decaimiento de la convertasa (Krettli y Pontes de Carvalho, 1985; Joiner *et al.*, 1986). Esta molécula fue descrita y caracterizada como una glicoproteína de 87-93 kDa de peso molecular, con un funcionamiento análogo a la proteína DAF humana, al evitar la formación de la convertasa de C3 y acelerar su decaimiento, tanto de la VC como de la VA, proponiéndose además su potencial rol como mediadora de inmunidad protectora (Joiner *et al.*, 1988). Dada sus funciones en la aceleración del decaimiento de la convertasa, se denominó como DAF de tripomastigotes (T-DAF). No obstante, a la fecha se han descrito y revisado varias proteínas y/o mecanismos utilizados por *T. cruzi* para evadir la respuesta del C (Cardoso *et al.*, 2016; Lidani *et al.*, 2017; Ramírez-Tolosa y Ferreira, 2017; Osorio *et al.*, 2012). En el anexo 4 se muestra una tabla resumen con cada una de estas moléculas implicadas en la evasión del C. De estas, es importante destacar que la acción reguladora del C es parcial en cuanto a las vías de activación involucradas; por ejemplo, la proteína gp58/68 descrita por Fischer *et al.* (1988) inhibe solo la VA del C. Otro ejemplo es la proteína calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) la que bloquea la activación de la VC y la VL. Por otro lado, T-DAF es capaz de participar en la inhibición de todas las vías del C, al igual que la proteína reguladora del complemento de *T. cruzi* (TcCRP). Es por esto que es necesario evaluar la importancia de esta proteína en la capacidad que tiene el parásito para evadir la acción del C y sobrevivir a su lisis.

El año 2016 en una Memoria de Título anterior se generó una proteína T-DAF recombinante utilizando como hospederos bacterias *E. coli* (Mendel, 2016). Se reconoció la secuencia completa de T-DAF en bases de datos en la cepa Dm28c (*GeneBank accession* AYLP01000365.1) a partir de una secuencia de cDNA parcial aislado de una biblioteca de

expresión por Tambourgi *et al.* (1993). Se desarrollaron oligonucleótidos partidores con los que se amplificó esta secuencia mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde DNA genómico de *T. cruzi* Dm28c, y se insertó en un vector de expresión pGEM-T con el que se transformaron bacterias *E. coli* electroquimiocompetentes. Sin embargo, al comparar la secuencia resultante de la amplificación y la secuencia escrita en bases de datos, se reconocieron importantes diferencias entre estas, incluso se identificó la carencia de una base nitrogenada en la secuencia amplificada que corría todo el marco de lectura de la proteína generando un codón de término a mitad de la secuencia. Debido a esto se generaron oligonucleótidos partidores que amplificaban la secuencia de T-DAF a partir del siguiente codón de inicio que se encontraba río abajo de la base nitrogenada faltante. De esta forma, finalmente, la proteína recombinante resultante en dicha ocasión, correspondió a una proteína de menor tamaño que la proteína original, teniendo una masa molecular estimada de 34,45 kDa. No obstante, esta proteína no fue caracterizada funcionalmente, por lo que se desconoce si conserva el sitio catalítico que es capaz de inhibir el C. En consiguiente, el objetivo de esta Memoria de Título fue caracterizar funcionalmente una proteína Aceleradora del Decaimiento de Tripomastigote (T-DAF) recombinante, generada siguiendo el procedimiento de la Memoria de Título de Mendel, determinando su capacidad de permitir la supervivencia parasitaria en epimastigotes sometidos a lisis mediada por C (ver objetivos en anexo 1).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Bioseguridad

Para el trabajo con epimastigotes de *T. cruzi*, el uso de delantal, guantes de látex y antiparras fue obligatorio. Se utilizaron desinfectantes químicos como hipoclorito de sodio, tanto en pisos como mesones. Wang *et al.*, 2008 recomiendan usar etanol al 70% o hipoclorito de sodio al 1% como desinfectante para trabajar con tripanosomátidos, aunque estas concentraciones son 4 y 20 veces más activas que las concentraciones recomendadas. Para manipular los parásitos se utilizó gabinete de bioseguridad clase II. Después de la inmersión en la solución desinfectante, todo el material desechable contaminado se colocó en bolsas para autoclave, se autoclavó y eliminó en los contenedores de desechos. Todo material no desechable siguió el mismo procedimiento, pero una vez autoclavado, se lavó y autoclavó nuevamente como material limpio. Este proyecto cuenta con un certificado de bioseguridad aprobado (anexo 2).

2. Generación de proteína sT-DAF en condiciones nativas

Para la generación de la proteína sT-DAF se dispuso de un plasmidio construido en una Memoria de Título anterior (Mendel, 2016) y de bacterias *Escherichia coli* de la cepa JM109 Promega®. La transformación de las bacterias competentes y la generación de la proteína recombinante se basa en el protocolo realizado en la Memoria de Título de Mendel (2016).

2.1 Transformación de bacterias *E. coli* JM 109

Mediante electroporación se transformaron bacterias *E. coli* JM109 con una construcción pQE80L-sT-DAF. Para ello se mezcló una alícuota de bacterias electrocompetentes con 5 µL de DNA de la construcción en cubetas de electroporación de 0,1 mm de distancia de los electrodos (BioRad). Se aplicó un pulso de 1,8 volts a la reacción utilizando un electroporador Micropulser® (BioRad). Posteriormente, las bacterias fueron incubadas en 750 µL de medio LB (Luria-Bertani) durante 1 hora a 37°C con

agitación. En forma paralela, se prepararon placas de medio LB agar sólido con 120 µg/mL de ampicilina, las cuales se utilizaron para sembrar las bacterias electroporadas, usando un volumen de 50 y 100 µL por placa. Estos cultivos se mantuvieron en estufa de incubación durante toda la noche a 37°C.

2.2 Obtención de la proteína recombinante sT-DAF en condiciones nativas

Para la obtención de la proteína recombinante sT-DAF en condiciones nativas, una colonia de bacterias *E. coli* JM109 transfectada con la construcción pQE80L-sT-DAF fue incubada en 10 mL de medio líquido LB con ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente se adicionaron 3 mL de este preinóculo a un matraz con 250 mL de medio LB líquido, el cual se incubó posteriormente en agitación orbital a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,6 a 0,8 medida a 595 nm. Alcanzada esa DO, se agregó Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,5 mM como inductor de expresión de la proteína recombinante y se realizó una nueva incubación en agitación orbital durante toda la noche a 37°C. Transcurrido este lapso, el cultivo inducido se centrifugó por 20 min a 5000 rpm y el pellet obtenido se diluyó en 10 mL de buffer A (TRIS 50 mM pH 8,0; NaCl 300 mM; Imidazol 20 mM pH 8,0; Tritón x-100 1%; Glicerol 10%) siendo incubado durante 30 min con agitación a 4°C. A continuación, se sonicó la muestra por 3 min en hielo y se centrifugó por 20 min a 8000 rpm a 4°C. El sobrenadante resultante se aplicó sobre una columna Ni-NTA (Invitrogen), previamente equilibrada con buffer A. La resina de Ni-NTA conteniendo la proteína de interés se lavó con buffer de lavado (TRIS 50 mM pH 8,0; NaCl 200 mM; Imidazol 40mM pH 8,0; Tritón X-100 1%; Glicerol 10%). Finalmente, la proteína sT-DAF recombinante se recuperó utilizando un buffer de elución (TRIS 50 mM pH 8,0; NaCl 200 mM; Imidazol 300 mM pH 8,0; Tritón 1%; Glicerol 10%). Alícuotas de proteína recombinante purificada fueron separadas mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Los geles se fijaron y tiñeron con una solución de metanol al 50% v/v, ácido acético al 10% v/v y azul de Coomassie al 1%, a temperatura ambiente por 2 h. Al mismo tiempo, en otro gel idéntico, se separaron alícuotas de proteína recombinante purificada mediante electroforesis en geles SDS-PAGE, las que se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Trans Blot Transfer Medium*® (BioRad). La identificación de la proteína

recombinante se llevó a cabo mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-histidina (Clontech), en una dilución 1:5000 v/v en PBS (*phosphate buffered saline*)-Tween 0,05%. Posterior a esto, fue agregado el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:10000 v/v en PBS Tween 0,05%. El revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL *Western blotting detection reagents and analysis system*® (Amersham), según indicaciones del fabricante.

3. Determinación de la capacidad de la proteína sT-DAF para inhibir la lisis mediada por C en *T. cruzi*.

3.1 Mantención de epimastigotes de *T. cruzi*

Epimastigotes derivados de tripomastigotes de la cepa Dm28c, donados por el Dr. Norbel Galanti, fueron mantenidos en cultivos axénicos en medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964; Cestari *et al.*, 2009), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), inactivado por calor y Penicilina-Estreptomicina (100 U/mL) a 28°C durante 7 días en una incubadora de cultivo celular. Un mL de epimastigotes fueron cosechados en fase exponencial de crecimiento y llevados a una nueva botella de cultivo con 9 mL de medio LIT suplementado fresco, semanalmente.

3.2 Ensayo de lisis mediada por complemento en epimastigotes de *T. cruzi*

3.2.1. Estandarización de la concentración de suero necesaria para lisar el 50% de los epimastigotes de *T. cruzi*

Este ensayo es una adaptación del protocolo realizado por Cestari y Ramírez (2010), en donde se midió el porcentaje de supervivencia parasitaria de epimastigotes, a través de conteo directo, luego de ser enfrentados a Suero Normal Humano (NHS, por su sigla del inglés *Normal Human Serum*) como fuente de C. El NHS fue comercial (Comptech, USA) u obtenido de dadores sanos, alicuotado y almacenado a -20°C. Se utilizaron epimastigotes a una concentración de 5×10^5 parásitos en 100 μ L de medio LIT, los cuales fueron incubados con concentraciones crecientes de NHS (0-60%) por 30 minutos a 37°C. La

reacción fue detenida añadiendo 800 μL de medio LIT frío. Además, con el objetivo de bloquear la VC y la VL del C y dejar activa solo la VA, un grupo de epimastigotes, a una concentración de 5×10^5 parásitos en 100 μL de medio de cultivo, fueron incubados de la misma manera con NHS en presencia de 10 mM de ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA, por sus siglas en inglés)/7 mM de MgCl_2 por 30 minutos a 37°C . Finalizada la incubación, la reacción fue detenida, añadiendo 800 μL de medio LIT frío. Como control se utilizó NHS inactivado por calor (Hi-NHS): 56°C por 30 minutos).

La supervivencia parasitaria de cada grupo fue cuantificada por medio de la técnica de *Alamar Blue*®, la cual es una adaptación del protocolo propuesto por Ormeño *et al.* (2016). Cada tubo fue lavado con PBS y resuspendido en medio LIT fresco. Alícuotas de 100 μL obtenidas de cada tubo, fueron incubadas junto a 10 μL del reactivo *Alamar Blue*® por 4 horas a 37°C en una placa de fondo blanco. Por último, la fluorescencia fue medida a una longitud de onda de 560/590 nm excitación/emisión (*Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Scientific*). La viabilidad o supervivencia parasitaria se expresó como porcentaje de los tubos control (tubos sin NHS) y blanco según corresponda. Se seleccionó la concentración de NHS que permitió el 50% de supervivencia parasitaria para el ensayo siguiente.

3.2.2 Ensayo de lisis mediada por complemento en epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de sT-DAF

Para este ensayo se necesitaron epimastigotes a una concentración de 5×10^5 parásitos en 100 μL de medio LIT. Los parásitos fueron incubados con la concentración de NHS definida en el punto anterior y concentraciones crecientes de la proteína sT-DAF (3 concentraciones diferentes). Para dar tiempo a que sT-DAF actúe, y evitar así la lisis mediada por el C, el NHS se integró en último lugar, previa incubación a 28°C por 30 minutos de epimastigotes y sT-DAF. Se utilizaron como controles muestras sin NHS y otras con NHS inactivado por calor (descrito anteriormente), además de la incorporación de una muestra blanco con epimastigotes en medio de cultivo. Los epimastigotes en sus respectivos medios y reactivos, luego de añadido el NHS, fueron incubados a 37°C por 30 minutos. Finalizada la incubación, la reacción fue detenida, añadiendo 800 μL de medio

LIT frío. La supervivencia parasitaria se cuantificó por medio de la técnica de *Alamar Blue*® como se describió anteriormente.

De esta forma, si sT-DAF es funcionalmente activa, se esperaba que los epimastigotes, naturalmente sensibles a la acción del C, en presencia de esta proteína se tornen resistente, sobreviviendo en mayor número a su acción.

4. Análisis de resultados

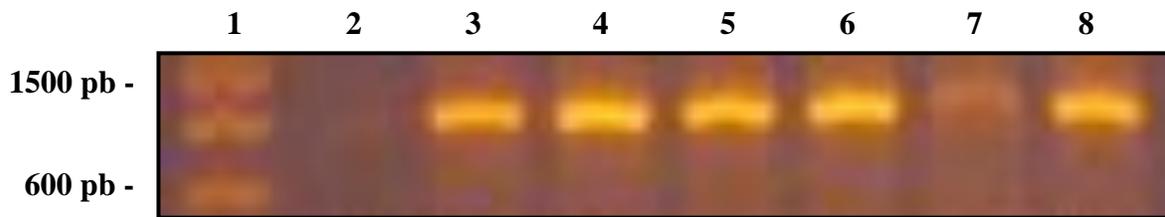
Todos los datos fueron obtenidos de ensayos realizados en triplicado y expresados como promedio con su respectiva desviación estándar. Para los ensayos de lisis se ocupó un diseño experimental de tipo factorial, por lo que los resultados obtenidos con los distintos tratamientos fueron comparados por análisis ANOVA y Bonferroni post-test, utilizando el *software GraphPad Prism 8 (Graph Pad Software, San Diego, CA)*.

RESULTADOS

1. Producción de proteína sT-DAF en condiciones nativas

1.1. Presencia de plasmidio y transformación bacterias

Mediante la técnica de PCR se confirmó la presencia de la secuencia codificante para sT-DAF en el constructo pQE-80L-sT-DAF generado por Mendel (2016) en una Memoria de Título anterior. Para ello se purificaron 5 plasmidios recombinantes desde bacterias transformadas, almacenadas a -80°C , identificadas como G, Y, PQE col 2, Col 2 y Col 11. Estos vectores fueron utilizados como DNA molde para la amplificación por PCR de la secuencia codificante para sT-DAF. En la Figura 1 se pueden apreciar las bandas resultantes de la amplificación de las secuencias, a partir de los DNA plasmidiales luego de ser sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidas con GelRed®.



sT-DAF: 963

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de secuencias nucleotídicas de sT-DAF insertas en constructo pQE-80L-sT-DAF desarrollado por Mendel (2016), y purificados de bacterias *E. coli* transformadas y almacenadas a -80°C , identificadas como G, Y, PQE col 2, Col 2 y Col 11. Carril 1, marcador de tamaño y masa molecular; carril 2, control negativo sin ADN molde; carril 3, control positivo con ADN genómico de *T. cruzi* como molde; carril 4, muestra almacenada G; carril 5, muestra almacenada Y; carril 6, muestra almacenada pQE col 2; carril 7, muestra almacenada Col 2; carril 8, muestra almacenada Col 11.

De las muestras amplificadas, solamente la presente en el carril 7, que corresponde a la etiquetada como Col 2, no presentó una banda muy marcada en relación a las demás, evidenciando una inadecuada amplificación de la secuencia. A partir de estos resultados, las

muestras que presentaron el plasmidio fueron utilizadas indistintamente para transformar bacterias electroquimiocompetentes *E. coli* de la cepa JM109, con el objetivo de producir la proteína recombinante sT-DAF en cantidades suficientes para realizar ensayos de funcionalidad.

Las bacterias transformadas fueron incubadas y procesadas, según se indica en materiales y métodos, hasta finalmente proceder a la purificación de la proteína sT-DAF recombinante por medio de cromatografía de afinidad en columna de níquel. El eluido de la proteína sT-DAF unido a la resina de Ni-NTA resultante de la cromatografía, fue recolectado en tubos de microcentrífuga de 500 μ L, obteniendo un total de 12 de estos tubos (enumerados del 1-12). La comprobación de la presencia de la proteína recombinante sT-DAF en este eluido se llevó a cabo mediante ensayo de *Western blot* transfiriendo a una membrana de nitrocelulosa las muestras proteicas obtenidas en un SDS-PAGE, previamente realizado. Se muestrearon 6 de estos tubos (1, 3, 5, 7, 9 y 11), y se reconoció la presencia de sT-DAF mediante la incubación con un anticuerpo de ratón anti-histidina. Los resultados del SDS-PAGE y del *Western blot* son mostrados en la figura 2 A y B.

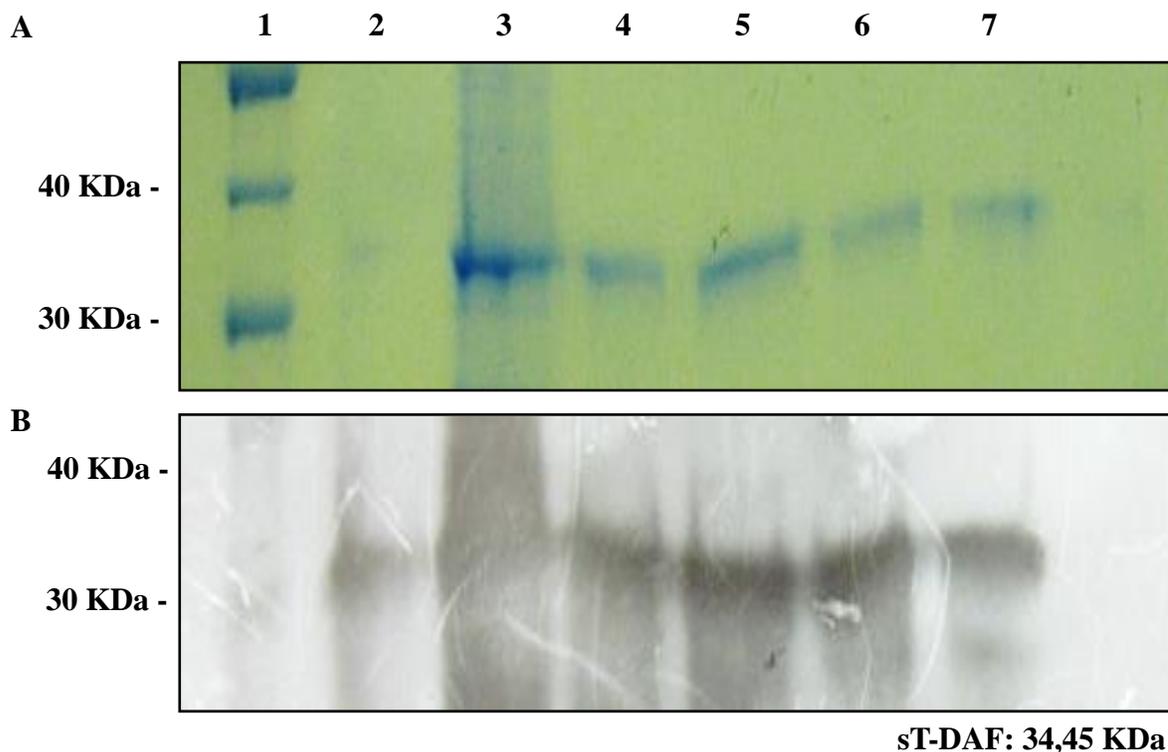
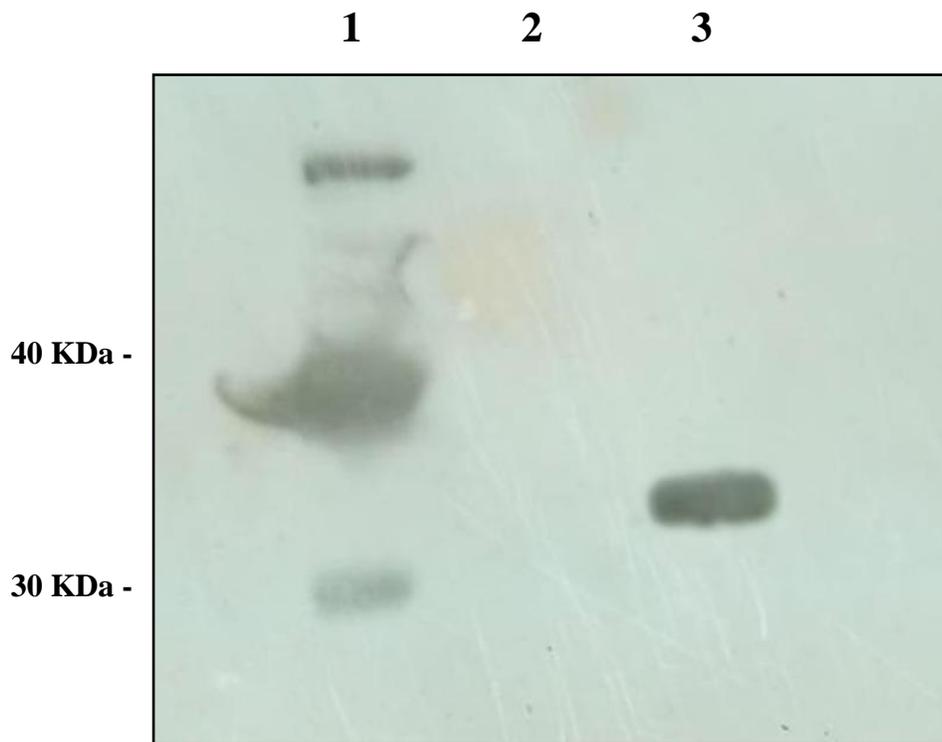


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (A) y *Western blot* en membrana de nitrocelulosa (B) incubada con anticuerpos anti-histidina de muestras obtenidas de eluidos de la proteína sT-DAF. Durante el proceso de eluido de la proteína sT-DAF, esta fue recolectada en 12 tubos 500 μ L enumerados del 1 al 12, de los cuales se muestrearon 6 tubos (1, 3, 5, 7, 9 y 11). Carril 1: marcador de masa molecular; carriles 2-7: tubos 1, 3, 5, 7, 9 y 11, respectivamente.

Una vez determinada la producción de la proteína sT-DAF, se unificaron todos los eluidos mencionados anteriormente. Posterior a esto se procedió con la diálisis y concentración de la muestra unificada utilizando tubos filtradores de centrifuga Amicon®, revisado en materiales y métodos. En la figura 3 se muestra el resultado del *Western blot* realizado desde el SDS-PAGE efectuado a una muestra de la solución final dializada y concentrada del eluido de la cromatografía por afinidad en columna de níquel. La presencia de una marcada banda en el tercer carril entre los 40 y los 30 kDa, según el marcador de masa molecular, confirma la correcta generación de la proteína sT-DAF en condiciones nativas de purificación y correcta diálisis. Posterior a esta corroboración se midió la concentración de la proteína, como se indicó anteriormente, dando por resultado una concentración de 52 mg/ μ L. Finalmente, esta proteína resultante fue utilizada para los posteriores ensayos de inhibición de la lisis celular mediada por el C.



w

sT-DAF: 32,45

Figura 3. *Western blot* realizado a muestra de dializado y concentrado de eluido de cromatografía por afinidad en columna de níquel luego de someterla a SDS-PAGE. Carril 3 muestra la presencia de una banda entre los 40 y 30 kDa, según marcador de masa molecular en carril 1.

2. Determinación de la capacidad de la proteína sT-DAF para inhibir la lisis mediada por complemento en *T. cruzi*.

Una vez que se logró la purificación de la proteína sT-DAF en condiciones nativas, se verificó la capacidad de esta misma de inhibir la lisis celular mediada por C en epimastigotes de *T. cruzi*, de manera similar a lo descrito por Joiner *et al.* (1988). Se utilizó como fuente de C, NHS para enfrentar a epimastigotes de la cepa Dm28c, susceptibles a la lisis mediada por el C. Se utilizó una concentración de NHS del 20% para el ensayo final.

Esta concentración fue definida por ensayos previos de estandarización de NHS capaz de lisar el 50% de epimastigotes (datos no mostrados).

Para el ensayo, se dispusieron de 4 grupos experimentales y un grupo control. El grupo control se utilizó para medir la supervivencia parasitaria de epimastigotes sometidos a la acción del C inactivado. Esta supervivencia fue evaluada mediante la medición de la fluorescencia emitida por el reactivo *Alamar Blue*® en células viables con metabolismo activo. Así, todos los resultados de los grupos experimentales se expresaron como porcentaje de supervivencia de los epimastigotes en función del grupo control de NHS inactivado por calor (Hi-NHS). En el primer grupo experimental se usó una concentración de 140 nM de la proteína sT-DAF generada. En los dos restantes grupos se emplearon concentraciones menores de 70 nM y 7nM respectivamente. En la figura 4 se muestra un gráfico con los resultados en cada grupo experimental, más el grupo control con Hi-NHS, también se incluye un grupo tratado solo con NHS al 20% evidenciando la lisis de epimastigotes producida a dicha concentración.

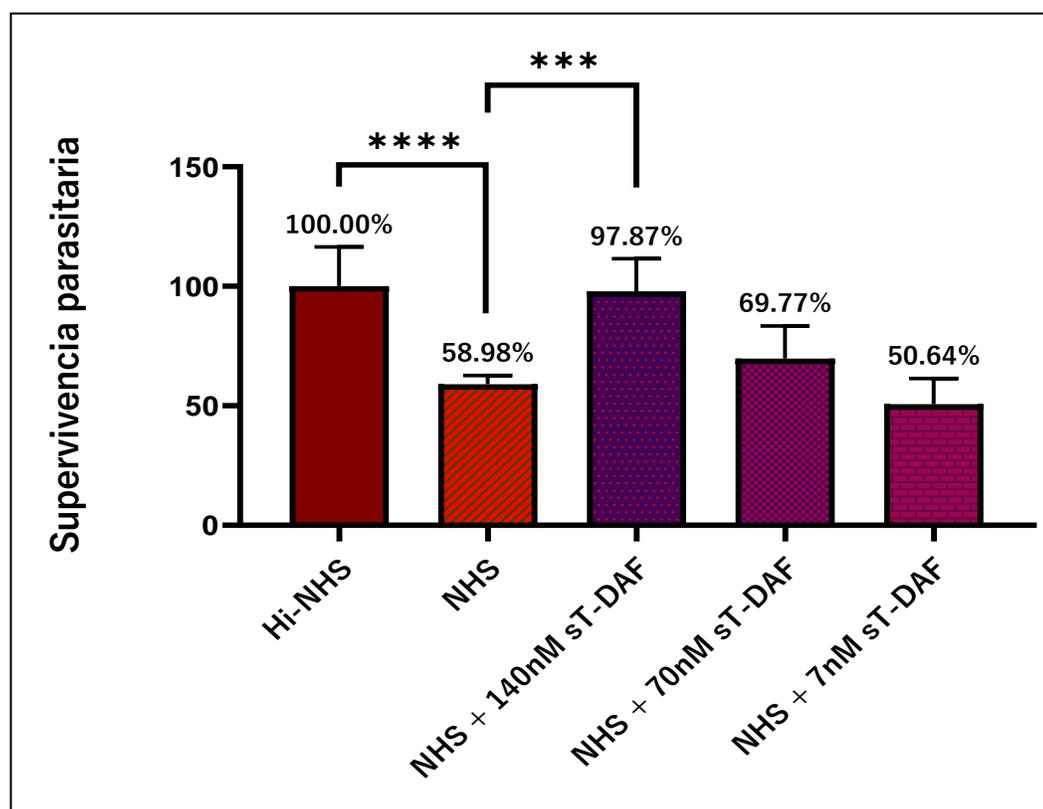


Figura 4. Ensayo de inhibición de la lisis celular mediada por el complemento. Todos los grupos representan epimastigotes a una concentración de 5×10^5 en 100 μ L enfrentados a una concentración del 20 % de suero normal humano (NHS). Adicionalmente, el tercero, cuarto y quinto grupo fueron incubados con 140, 70 y 7 nM de la proteína sT-DAF respectivamente. El segundo grupo corresponde solo a epimastigotes enfrentados a NHS al 20 % definida como la CL_{50} . Los porcentajes de cada grupo son expresiones del porcentaje de supervivencia parasitaria promedio en función del grupo control (primera barra) con NHS inactivado por calor (Hi-NHS) \pm SD (líneas verticales). Los grupos fueron comparados usando ANOVA y la prueba de Bonferroni. ****: p value $< 0,0001$; ***: p value = 0,0001.

Como se muestra, la media del grupo control positivo (Hi-NHS) tiene una diferencia significativa comprada con la del grupo control negativo (NHS). Solo el 58, 96% de los epimastigotes incubados con 20% de suero NHS sobrevivieron. Al contrario, el grupo incubado con la proteína sT-DAF a altas concentraciones (sT-DAF 140nM), mostró una supervivencia parasitaria (97. 87%) similar a la vista en parásitos incubados con suero inactivado, así como una diferencia significativa con el grupo incubado únicamente con NHS. Aquellos epimastigotes incubados con concentraciones menores de sT-DAF (sT-DAF 70nM), presentaron menores niveles de supervivencia parasitaria, hasta alcanzar niveles esperados para la CI_{50} de NHS (sT-DAF 7nM). A la luz de estos resultados, podemos sugerir que existe un rol inhibitor por parte de la proteína sT-DAF, de la lisis de epimastigotes mediada por C.

DISCUSIÓN

Mediante el uso de cromatoenfoco (*chromatofocusing* en inglés), una técnica cromatográfica, en 1988 Joiner *et al.* purificó la proteína T-DAF a partir del sobrenadante de cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi*, pudiendo así describirla bioquímica y funcionalmente, asociando de esta forma su actividad inhibidora del C, homóloga a la proteína DAF de humanos (HuDAF). Se describió como una glicoproteína de 87-93 KDa, la cual fue capaz de inhibir la formación y acelerar el decaimiento tanto de la convertasa de C3 de la VC y de la VA del C ensambladas en eritrocitos (EAC14b2a y EAC3bBb respectivamente). A partir de este mismo proceso se desarrollaron anticuerpos poli y monoclonales líticos específicos para T-DAF en 1993, los cuales fueron aprovechados para aislar un ADN codificante (cDNA) parcial de esta proteína a partir de una librería de expresión. En ese instante, al comparar el fragmento de cDNA de 285 pb de longitud con la secuencia nucleotídica codificante de HuDAF, se determinó que existía una identidad del 40 % con un segmento nucleotídico codificante de HuDAF que iba desde la base nitrogenada 237 hasta la 521. Sin embargo, al intentar replicar este resultado, no se halló tal similitud al alinear estas secuencias utilizando las herramientas bioinformáticas actuales disponibles (datos no mostrados). No obstante, hay que agregar que esta proteína no puede ser inmunoprecipitada utilizando anticuerpos específicos en contra de ninguna de las proteínas reguladoras del C pertenecientes a la superfamilia de proteínas de unión a C3b/C4b en humanos (factor B, H, DAF, C2, CR1 y C4BP) (Joiner *et al.*, 1988). Norris *et al.* en 1991 caracterizó una proteína de 160 KDa de unión al componente C3 del C que demostró tener similitudes funcionales y genéticas con la proteína reguladora del complemento HuDAF. Esta proteína, como las proteínas reguladoras del complemento, presentó afinidad por los componentes C3b y C4b, aunque no se detectó actividad de cofactor enzimático para el clivaje de estos componentes mediado por el factor I. Según Tamburgui *et al.* (1993) T-DAF parece ser diferente bioquímica y funcionalmente a esta y otras proteínas reguladoras del C de *T. cruzi*, incluyendo a la proteína de 58/68 KDa aislada por Fischer *et al.* en 1988. Sin embargo, menciona que la relación que hay entre estas debe ser estudiada.

El año 2016, en una Memoria de Título anterior, se utilizó la secuencia aminoacídica deducida del cDNA de la proteína T-DAF reconocido por Tambourgi *et al.* (1993), para buscar la secuencia aminoacídica completa de la proteína T-DAF registrada en bases de datos. Así se utilizó la secuencia nucleotídica codificante para la proteína T-DAF reconocida en el genoma de *T. cruzi* de la cepa Dm28c (*GeneBank accession* ESS60956.1) para generar oligonucleótidos partidores que permitieron amplificar por PCR dicha secuencia e insertarla en un vector de expresión con el fin de generar una proteína T-DAF recombinante. Interesantemente, al comparar la secuencia nucleotídica anotada en las bases de datos, y la secuencia resultante de la amplificación por PCR, se comprobaron importantes diferencias entre ambas, siendo la más importante, la carencia de una base nitrogenada en la secuencia amplificada que modificaba todo el marco de lectura posterior a esta, generando incluso un codón de término en medio de la secuencia. La solución a este problema fue generar nuevos partidores para una nueva amplificación, pero a partir del siguiente codón de inicio, que correspondía al correcto marco de lectura de la proteína. Esto dio como resultado una nueva proteína, que fue denominada sT-DAF, y que es de menor masa molecular que la original, que debía generarse por la secuencia anotada en las bases de datos. Si bien es posible que estas diferencias que fueron evidenciadas, se deban a mutaciones o alteraciones propias del parásito, esto parece más improbable cuando se revisan las nuevas secuencias disponibles en las diferentes bases de datos. La secuencia nucleotídica de *T. cruzi* (Dm28c) utilizada en la Memoria de Título del 2016 para generar los primeros oligonucleótidos partidores fue la publicada el 2014 por Grisard *et al.* (*GeneBank accession* AYL01000365.1). Actualmente, en las bases de datos VEuPathDB (*Eukaryotic Pathogen, Vector and Host Informatics Resource*) y Uniprot (colaboración entre *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI), el SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*) y *Protein Information Resource* (PIR)) se encuentran secuencias actualizadas para esta misma cepa, siendo la última del año 2018 (*accession* C4B63_16g176). El gen putativo utilizado para generar sT-DAF el año 2016, daba por resultado una proteína de 443 aminoácidos y una masa molecular estimada de 48, 31 kDa, lo que evidentemente no corresponde a los 87 a 93 kDa de masa molecular estimada para la proteína T-DAF descrita por Joiner *et al.* (1988). Más aún, el hecho de que existieran diferencias notables entre la secuencia descrita en bases de datos y la secuencia obtenida

por amplificación por PCR directamente del genoma de *T. cruzi*, sugiere un posible error de anotación en las bases de datos. De acuerdo con esto, la carencia de una base nitrogenada (posterior a los 60 pb) en la secuencia amplificada por PCR, en comparación con la de las bases de datos, también se replica al comparar esta última con la secuencia nucleotídica de *T. cruzi* (Dm28c) en bases de datos actualizadas del año 2018 mencionada anteriormente (datos no mostrados). Además, la secuencia nucleotídica amplificada por PCR a partir del genoma de *T. cruzi* (Dm28c) realizada por Mendel (2016) se alinea con una identidad del 99%, difiriendo solo en una base nitrogenada, con la secuencia nucleotídica de esta misma cepa del año 2018 registrada en bases de datos. Sumando, está el hecho de que la proteína T-DAF deducida que se genera con la secuencia nucleotídica del 2018, tiene un total de 833 aminoácidos y una masa molecular estimada de 90, 35 KDa, que sí podría concordar con lo descrito en 1988 por Joiner *et al.* Lamentablemente estas secuencias no tienen un respaldo documentado, ya que en estas bases de datos se suelen registrar muchas secuencias de forma independiente, sin una investigación que avale su precisión. Por esto, son necesarias nuevas investigaciones utilizando estas secuencias como base para evaluar su veracidad, ya que esto abriría las puertas a la generación de una proteína T-DAF recombinante de tamaño completo.

La producción de proteínas recombinante se ha llevado a cabo por mucho tiempo y no cabe duda de que es una tecnología que ha revolucionado la ciencia. Rosano y Ceccarelli (2014) cuentan que, si bien la teoría es bastante sencilla, en la práctica hay docena de eventos que pueden salir mal al llevar a cabo este tipo de actividad. Como por ejemplo mencionan, el pobre crecimiento del hospedero utilizado, la generación de cuerpos de inclusión, la inactividad de la proteína, o incluso, no conseguir ninguna proteína. Las ventajas de utilizar *E. coli* como organismo hospedero es que este tiene una cinética de crecimiento incomparablemente rápida, se puede lograr una densidad celular de cultivo alta, se pueden crear medios de cultivo complejos enriquecidos con componentes de fácil disposición y baratos, y la transformación con ADN exógeno es rápida y fácil (Rosano y Ceccarelli, 2014). Por otro lado, las complicaciones del proceso, las dificultades y desventajas de este sistema de expresión están bien documentadas (Baneyx, 1999; Chen, 2011; Rosano *et al.*, 2019; Rosano y Ceccarelli, 2014; Demain y Vaishnav, 2009; Jaffé *et al.*, 2014). En cuanto a la proteína misma, en este sistema, como bien resumen Demain y

Vaishnav (2009), es usualmente difícil expresar proteínas con abundancia de puentes disulfuro, ya que son removidos por las bacterias, las proteínas generadas no se encuentran glicosiladas y generalmente, aquellas que se acumulan en cuerpos de inclusión, son normalmente inactivas y requieren un replegado. Aunque los cuerpos de inclusión generalmente simplifican la purificación de la proteína, esto no garantiza que se logre recuperar una gran cantidad de proteína biológicamente activa al momento de ser plegadas (Baneyx, 1999), estimándose incluso que cerca del 40 % y más de las proteínas generadas se encuentran en la forma insoluble, formando cuerpos de inclusión (Alves dos Santos *et al.*, 2014). Además, las modificaciones post traduccionales en los tripanosomátidos son muy importantes, ya que estas están relacionadas con la regulación de la expresión de las proteínas y como en cualquier eucarionte, estas modificaciones están implicadas en la estabilidad de la estructura terciaria, la función de las proteínas, entre otras (Torres-Gutiérrez *et al.*, 2019). Otra consideración importante es que generalmente proteínas de tamaños mayores a 100 kDa son mejor generadas en células eucariontes, mientras que proteínas menores a 30 kDa, principalmente en sistemas procariontes (Demain y Vaishnav, 2009). Frente a todo esto, y dado que T-DAF fue descrita como una glicoproteína, y que el sistema de expresión empleado en esta Memoria de Título fue esencialmente básico, y que no es el ideal para este tipo de proteínas, la probabilidad de que esta fuera biológicamente activa era cuestionable.

En la literatura podemos encontrar un gran número de proteína recombinantes de *T. cruzi*. El ejemplo más nuevo es la expresión de TcISP2, que es un inhibidor de serin proteasas similar a ecotin, presente en *E. coli* pero que en tripanosomátidos inhibe fuertemente la acción de proteasas provenientes del hospedero como tripsina, quimiotripsina, neutrófilo elastasa y factores de coagulación del plasma (Baena *et al.*, 2020). Esta proteína fue expresada en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) utilizando un vector de expresión pET28 y realizando la purificación mediante cromatografía por afinidad en columna de níquel, resultando una proteína totalmente funcional. Otros ejemplos de proteínas recombinantes de *T. cruzi* expresadas en hospederos bacterianos son: FCaBP, una proteína flagelar expresada en *E.coli* XL1-Blu mediante el vector pGEX-2TL (Godsel *et al.*, 1995; Pinto *et al.*, 2003); TcSSP4, es una proteína antigénica específica de amastigotes (Ramos-Ligonio *et al.*, 2004); ASP2, también una proteína de superficie antigénica

presente en amastigotes (Araújo *et al.*, 2005); TcENO, que fue generada de una forma similar a la implementada en esta Memoria de Título, mediante purificación por cromatografía de afinidad en Ni-NTA; sin embargo no fue caracterizada funcionalmente (Carabarin-Lima *et al.*, 2014); la proteína de superficie gp82 expresada en *E. coli* cepa DH5- α (Atayde *et al.*, 2008), así entre muchas otras. Varias de estas proteínas recombinantes fueron probadas como antígenos capaces de levantar una respuesta inmune suficientemente adecuada para postularlas como posible blanco diagnóstico. A su vez, el desarrollo de este tipo de proteínas podría facilitar su estudio, ya que en el caso de las proteínas de *T. cruzi* que tienen una acción reguladora del C, si bien su función es similar a las CRPs humanas, parecen haber diferencias genéticas y estructurales, por lo que su acción no estaría relacionada con los dominios CCPs conocidos para dichas proteínas (Beucher y Norreis, 2008), haciendo necesario su estudio en este sentido.

En esta Memoria de Título se buscó describir funcionalmente la proteína recombinante sT-DAF en su rol inhibidor de la lisis mediada por el C. Como ya se ha mencionado anteriormente, T-DAF es capaz de inhibir la formación y acelerar el decaimiento de la convertasa de C3 tanto de la VC como de la VA. Esto fue determinado por medio de un ensayo de aceleración del decaimiento específico para cada una de estas dos vías de activación (Joiner *et al.*, 1988). Se utilizaron eritrocitos de oveja recubiertos con anticuerpos IgG (EA) para evaluar la formación y el decaimiento de ambas convertasas. Ensayos similares se llevaron a cabo para evaluar esta capacidad en otras proteínas descritas para *T. cruzi* (Fischer *et al.*, 1988; Norris *et al.*, 1991). Por otro lado, ensayos de lisis de EA mediadas por el C han sido realizados comúnmente en otras investigaciones con el fin principalmente de evaluar la capacidad de inhibición de la misma por parte de diversos componentes (Inal y Sim, 2000; Harboe *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015). Para el objetivo de esta Memoria de Título se implementó un ensayo de lisis mediado por el C derivado del realizado por Cestari *et al.* (2009). Este ensayo se basa en la susceptibilidad antes mencionada de epimastigotes a la acción del C, mediante la cual es posible probar la supervivencia de estos ante cualquier componente que afecte negativamente a este sistema. Se utilizó NHS como fuente del C, el cual es usado ampliamente en este tipo de ensayos (Inal y Sim, 2000; Cestari *et al.*, 2008; Evans-Osses *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2020; Sánchez *et al.*, 2013; Simon *et al.*, 2013; Tirado *et al.*, 2021), y en la mayoría de estos

también se utilizó Hi-NHS como control. Desde 1899 se sabe que el C es un componente termolábil del plasma sanguíneo, y clásicamente se ha usado una temperatura de 56°C por 30 minutos para inactivarlo (Bradbury *et al.*, 1985). Los componentes del C que son inactivados por el calor son C2, que participa en la VC y VL, y fB que participa en VA (Kew, 2014). No fue posible en esta Memoria de Título diferenciar las vías del C a través de este ensayo, por lo que no se pudo demostrar el rol inhibitor del C de sT-DAF en cada una de las vías por separado. En la literatura principalmente se describe la utilización de ácido etilen glicol-bis(β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) +Mg²⁺ para unir el Ca²⁺ e inactivar la VC y la VL, y mantener activa la VA (Johnson, 2020). Cabe mencionar en este punto que, hasta antes o principios de los años 90s, no se evaluó la VL, como ocurrió con T-DAF, ya que esta fue descrita más tarde en esa década (Ferreira y Cortes, 2021). Sin embargo, dado que esta vía comparte la formación de las convertasa de C3 y de C5 de la VC, no hay motivos para suponer que no se verá implicada si lo hace la VC, siempre y cuando existan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que puedan ser reconocidos por las lectinas unidas a manosa (MBL) o ficolinas. En *T. cruzi* MBL, L-ficolinas y H-ficolinas, reconocen moléculas glicosiladas en la superficie de tripomastigotes metacíclicos, siendo muy importantes en el nivel de respuesta del C (Cestari *et al.*, 2013). Debido a que T-DAF es la única proteína descrita hasta el momento de *T. cruzi* que es capaz de inhibir todas las vías del C (Lidani *et al.*, 2017), es muy importante lograr describir el rol de sT-DAF en cada una de estas vías, mediante adaptaciones de este ensayo u algún otro más específico.

En el ensayo realizado se incluyó un grupo control positivo utilizando factor H (fH) como inhibidor de la lisis mediada por el complemento a una concentración equivalente a la media usada para sT-DAF de 70 nM (datos no mostrados). Factor H ya se ha utilizado en otros ensayos como control positivo de la actividad aceleradora del decaimiento al evaluar proteínas de *T. cruzi* (Beucher y Norris, 2008; Norris *et al.*, 1991). Sin embargo, a la concentración usada en este ensayo no se evidencio tal actividad, a pesar de que es una cantidad casi cinco veces superior a la utilizada por Norris (1991) de 16 nM. Por otro lado, Schenkman *et al.* (1986), utilizaron una concentración aproximada de 280 nM de fH para un ensayo de lisis de epimastigotes pero que se encontraban recubiertos con C3b. La proteína reguladora del complemento fH es una proteína aproximadamente de 155

KDa que se une principalmente al componente C3b del C, compitiendo de esta forma con fB en dicha unión, acelerando el decaimiento de las convertasas de C3 y C5 de la VA unidas principalmente a membranas celulares, más que en fase fluida, y también actuando como cofactor enzimático para el clivaje de C3b por fI (Moore *et al.*, 2021). Cabe destacar que fH tiene hasta 10 veces más afinidad por C3b al asociarse con ácido siálico presente en membranas celulares (Moore *et al.*, 2021). *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico, sin embargo, en el estadio de tripomastigotes, el parásito es capaz de unir ácido siálico, proveniente del hospedero, a su membrana celular por medio de enzimas miembros de la superfamilia de las transialidasas (TS), pero los epimastigotes no son capaces de expresar estas proteínas (Osorio *et al.*, 2012). Dadas estas características y teniendo en cuenta la naturaleza del ensayo desarrollado en esta Memoria de Título, en donde se evalúa principalmente la capacidad inhibidora del complemento en su fase fluida, es posible que fH haya fracasado por motivos de tiempo y espacio en la unión a C3b unido a la membrana de epimastigotes, teniendo una actividad aceleradora del decaimiento totalmente ineficiente.

La sobrevivencia parasitaria, o la viabilidad de las células puede ser medida de diferentes maneras, que van desde contar directamente células vivas o muertas, tinciones fluorescentes con posterior conteo, o ensayos fluorimétricos utilizando sales de tetrazolium o resazurin (*Alamar Blue*®), por ejemplo. Este último, es un reactivo que utiliza el componente no fluorescente rezaurin, el cual es reducido por medio del metabolismo de las células vivas generando un componente fluorescente denominado resorufin (Nakayama *et al.*, 1997). A pesar de que se han descrito algunas reacciones con medios de cultivo generando falsos positivos (Munshi *et al.*, 2014), esta técnica es utilizada comúnmente para evaluar la viabilidad celular en *T. cruzi* (Iten *et al.*, 1997; Ormeño *et al.*, 2016; Valenzuela *et al.*, 2017) y fue implementada en esta Memoria de Título como indicador de la supervivencia parasitaria. Sin embargo, una comparación de esta técnica con alguna otra con mayor sensibilidad queda pendiente.

CONCLUSIÓN

En esta Memoria de Título se logró determinar que la proteína recombinante sT-DAF generada por Mendel el 2016, en una Memoria de Título anterior, cuenta con un rol inhibitor del C, y que es capaz de aumentar la supervivencia parasitaria de epimastigotes enfrentados a la acción del mismo. Pese a las características de esta proteína y a las dificultades mencionadas en este documento, demostrar el rol inhibitor del C, por parte de sT-DAF es un gran avance para el estudio de las proteínas reguladoras del C de *T. cruzi*. Esto no solo debido a que la acción de estas proteínas sobre el complemento parece ser diferente al mecanismo implicado en proteínas reguladoras del C en humanos, sino que también debido a su importancia como factor de virulencia y a su capacidad antigénica. Es una herramienta útil contar con proteínas recombinante en post de mejorar el diagnóstico de la enfermedad causada por este parásito y avanzar hacia una posible herramienta terapéutica enfocada en estos factores.

BIBLIOGRAFÍA

- **ÁLVAREZ, D.; FRANYUTI, G.; DÍAZ, R.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, D.; VÁZQUEZ, R.** 2016. Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Rev Med Hosp Gen Méx.* 138:11 pp.
- **ALVES, M.; BRUGNERA, F.; TEIXEIRA, H.; AUD, A.; CASTRO, F.; MORDENTE, T.; BRIGIDO, P.; TAVARES, R.; PURCINO, C.; BARBOSA, R.; BAHIA, D.; ARRUDA, R.; MUNTE, C.; HORJALES, E.; VIEIRA, C.** A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. *Sci Rep.* 4: 4259.
- **ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; BIANCO, R.; GRANDE, R.; GALLI, M.; CORBELLINO, M.** 2017. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *Eur J Intern Med.* 43:6-15.
- **ARAÚJO, A.; DE ALENCAR, B.; VASCONCELOS, J.; HIYANE, M.; MARINHO, C.; PENIDO, M.; BOSCARDIN, S.; HOFT, D.; GAZZINELLI, R.; RODRÍGUEZ, M.** 2005. CD8⁺-T-Cell-Dependent Control of *Trypanosoma cruzi* Infection in a Highly Susceptible Mouse Strain after Immunization with Recombinant Proteins Based on Amastigote Surface Protein 2. *Infect Immun.* 73 (9): 6017 – 6025.
- **ARAYDE, V.; JASIULIONIS, M.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N.** 2008. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. *Melanoma Res.* 18: 172 – 183.
- **BAENA, F.; DINIZ, A.; FUHLENDORF, M.; FEITOSA, G.; VITORINO, J.; FERREIRA, G.; CARNEIRO, B.; MOREIRA, C.; PUZER, L.; DAISHI, S.; GARCÍA, W.; APARECIDA, M.** 2019. Functional and structural characterization of an ecotin-like serine protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biol Macromol.* 151 (2020): 459 – 466.
- **BANEYX, F.** 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 10: 411 – 421.
- **BARNUM, S.** 2016. Complement: A primer for the coming therapeutic revolution. *Pharmacol Ther.* 172:63-72.
- **BARNUM, S.; SCHEIN, T.** 2018. The Complement System. **In:** *The Complement FactsBook.* 2^{da} ed. Elsevier. Londres, Reino Unido. pp. 7-20.
- **BEUCHER, M.; MEIRA, W.; ZEGARRA, V.; GALVÃO, L.; CHIARI, E.; NORRIS, K.** 2003. Expression and the Peculiar Enzymatic Behavior of the *Trypanosoma cruzi* NTH1 DNA Glycosylase. *Prot Exp Purif.* 27 (2003): 19 – 26.

- **BEUCHER, M.; NORRIS, K.** 2008. Sequence Diversity of the *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein Family. *Infect Immun.* 76 (2): 750 – 758.
- **BRADBURY, K.; APARICIO, S.; SUMNER, D.; BIRD, C.** 1985. Role of Complement in Demyelination In Vitro by Multiple Sclerosis Serum and other Neurological Disease Sera. *J Neurol Sci.* 65: 293 – 305.
- **CAMARGO, E.** 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 6:93-100.
- **CARABARÍN-LIMA, A.; RODRÍGUEZ-MORALES, O.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, M.; BAYLÓN-PACHECO, L.; REYES, P.; ARCE-FONSECA, M.; ROSALES-ENCINA, J.** 2014. In silico approach for the identification of immunological properties of enolase from *Trypanosoma cruzi* and its possible usefulness as vaccine in Chagas disease. *Parasitol Res.* 113: 1029 – 1039.
- **CESTARI, I.; EVANS-OSES, I.; SCHLAPBACH, L.; MESSIAS-REASON, I.** 2013. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. *Mol Immunol.* 53 (2013): 328 – 334.
- **CESTARI, I.; KRARUP, A.; SIM, R.; INAL, J.; RAMIREZ, M.** 2009. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol.* 47:426-437.
- **CESTARI, I.; RAMÍREZ, M.** 2010. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *PLoS One.* 5(3): e9721.
- **CHATELAIN, E.** 2017. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Comput Struct Biotechnol J.* 15 (2017): 98–103.
- **CHEN, R.** 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv.* 30 (2012): 1102 – 1107.
- **CHRISTY, J.; TOOMEY, C.; CAUVI, D.; POLLARD, K.** 2018. Decay Accelerating Factor. **In:** Barnum, S.; Schein, T. (Eds.). *The Complement FactsBook.* 2^{da} ed. Elsevier. Londres, Reino Unido. pp. 261-270.
- **CONNERS, E.; VINETZ, J.; WEEKS, J.; BROUWER, K.** 2016. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. *Acta Trop.* 156 (2016): 68–78.
- **DA SILVEIRA, J.; SETSU, E.; OSTERMAYER, A.** 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasito.* 17 (6): 286 – 291.

- **DEMAIN, A.; VAISHNAV, P.** 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotech Adv.* 27 (2009): 297 – 306.
- **EVANS-OSSES, I.; MOJOLI, A.; HOLSBACH, M.; ENDO, D.; DUARTE, W.; VELAVAN, T.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ, M.** 2014. Differential ability to resist to complement lysis and invade host cells mediated by MBL in R4 and 860 strains of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 588 (2014): 956 – 961.
- **FERREIRA, V.; CORTES, C.** 2021. The Complement System. *Ency Inf Im.*
- **FISCHER, E.; OUAISSI, M.; VELGE, P.; CORNETTE, J.; KAZATCHKINE, M.** 1988. gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunol.* 65: 299 – 303.
- **FLÜCKIGER, R.; COCUZZI, E.; NAGARAJ, R.; SHOHAM, M.; KERN, T.** 2017. DAF in diabetic patients is subject to glycation/inactivation at its active site residues. *Mol Immunol.* 93:246–252.
- **GILEADI, O.** 2017. Recombinant Protein Expression in *E. coli*: A Historical Perspective. *Methods Mol Biol.* 1586: 3 – 10.
- **GODSEL, L.; TIBBETTS, S.; OLSON, C.; CHAUDOR, B.** 1995. Utility of Recombinant Flagellar Calcium-Binding Protein for Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Clin Microbiol.* 33 (8): 2082 – 2085.
- **HARBOE, M.; BILLMANN, E.; EIRIK, T.** 2011. Advances in assay of complement function and activation. *Adv Drug Deliv Rev.* 63 (2011): 976 – 987.
- **INAL, J.; SIM, R.** 2000. A *Schistosoma* protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Lett.* 470 (2000): 131 – 134.
- **JENSEN, T.; OPSTRUP, K.; CHRISTIANSEN, G.; RASMUSSEN, P.; THOMSEN, M.; JUSTESEN, D.; SCHØNHEYDER, H.; LAUSEN, M.** 2020. Original article Complement mediated *Klebsiella pneumoniae* capsule changes. *Microbes Infect.* 22 (2020): 19 – 20.
- **JOINER, K.; DIAS, W.; RIMOLDI, M.; HAMMER, C.; SHER, A.; KIPNIS, T.** 1988. Biochemical Characterization of a Factor Produced by Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* That Accelerates the Decay of Complement C3 Convertases. *J Biol Chem.* 263(23):11327-11335.
- **JOINER, K.; SHER, A.; GAITHER, T.; HAMMER, C.** 1986. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc Nati Acad Sci USA.* 83: 6593-6597.

- **KNEW, R.** 2014. The Complement System. *Path Hum Disease*. 231-243.
- **KORBELIK, M.; CECIC, I.** 2008. Complement activation cascade and its regulation: Relevance for the response of solid tumors to photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 93:53-59.
- **KRETTLI, A.; PNTES DE CARVALHO, L. C.** 1985. Binding of C3 fragments to the *Trypanosoma cruzi* surface in the absence of specific antibodies and without activation of the complement cascade. *Clin exp Immunol*. 62 (1985): 270-277.
- **LI, L.; LI, Y.; IJAZ, M.; SHAHBAZ, M.; LIAN, Q.; WANG, F.** 2015. Review on complement analysis method and the roles of glycosaminoglycans in the complement system. *Carbohydr Polym*. 134: 590 – 597.
- **LIDANI, K.; BAVIA, L.; AMBROSIO, A.; MESSIAS-REASON, I.** 2017. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol*. 8: 607.
- **MEHRING, N.; ERDMANN, N.; WALTHER, J.; STIEFELMAIER, J.; STRIETH, D.; ULBER, R.** 2021. A simple and low-cost resazurin assay for vitality assessment across species. *J Biotechnol*. 333: 63 -66.
- **MENDEL, Y.** 2016. Expresión y purificación del Factor Acelerador del Decaimiento de la Convertasa recombinante de *Trypanosoma cruzi*. Memoria Título Médico Veterinario. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. Departamento de Medicina Preventiva Animal 40 p.
- **MOORE, S.; MENON, S.; CORTES, C.; FERREIRA, V.** 2021. Hijacking Factor H for Complement Immune Evasion. *Front Immunol*. 12: 602277.
- **MUNSHI, S.; TWINING, R.; DAHL, R.** 2014. Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 70 (2): 195 – 198.
- **NAIK, A.; SHARMA, S.; QUIGG, R.** 2013. Complement Regulation in Renal Disease Models. *Semin Nephrol*. 33(6):575-585.
- **NAKAYAMA, G.; CATON, M.; NOVA, M.; PARANDOOSH, Z.** 1997. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods*. 204 (1997): 205 – 208.
- **NORIS, M.; REMUZZI, G.** 2013. Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol*. 33(6): 479-492.
- **ORMEÑO, F.; BARRIENTOS, C.; RAMIREZ, S.; PONCE, I.; VALENZUELA, L.; SEPÚLVEDA, S.; BITAR, M.; KEMMERLING, U.; MACHADO, C.; CABRERA,**

- G.; GALANTI, N.** 2016. Expression and the Peculiar Enzymatic Behavior of the *Trypanosoma cruzi* NTH1 DNA Glycosylase. PLoS ONE 11(6): e0157270. doi:10.1371/journal.pone.0157270.
- **OSORIO, L.; RÍOS, I.; GUTIÉRREZ, B.; GONZÁLEZ, J.** 2012. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? Microbes Infect. 14:1390-1402.
 - **PINTO, A.; CAMPANA, P.; BELTRAMINI, L.; SILBER, A.; ARAÚJO, A.** 2002. Structural characterization of a recombinant flagellar calcium-binding protein from *Trypanosoma cruzi*. Biochim Biophys Acta. 1652 (2003): 107 – 114.
 - **RAMÍREZ-TOLOSA, G.; FERREIRA, A.** 2017. *Trypanosoma cruzi* Evades the Complement System as an Efficient Strategy to Survive in the Mammalian Host: The Specific Roles of Host/Parasite Molecules and *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. Front Microbiol. 8: 1667.
 - **RAMOS-LOGONIO, A.; LÓPEZ-MONTEON, A.; TALAMÁS-ROHANA, P.; ROSALES-ENCINA, L.** 2004. Recombinant SSP4 protein from *Trypanosoma cruzi* amastigotes regulates nitric oxide production by macrophages. Parasite Immunol. 26: 409 – 418.
 - **RASSI, A; MARCONDES DE REZENDE, J; LUQUETTI, O.; RASSI JR, A.** 2010. Clinical phases and forms of Chagas disease. **In:** Telleria, J.; Tibayrenc, M. (Eds.). American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier. Jamestown Road, London. pp. 709-741.
 - **RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J.** 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infect Dis Clin N Am. 26 (2012): 275–291.
 - **RÄZ, B.; ITEN, M.; GREYER-BÜHLER, Y.; KAMINSKY, R.; BRUN, R.** 1997. The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) in vitro. Acta Trop. 68 (1997): 139 – 147.
 - **ROSANO, G.; CECCARELLI, E.** 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol. 5: 172.
 - **ROSANO, G.; MORALES, E.; CECCARELLI, E.** 2019. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. Protein Science. 28: 1412 – 1422.
 - **SÁNCHEZ, F.; PÉREZ, C.; ZAGO, M.; LABRIOLA, C.; FERREIRA, A.; BASOMBRÍO, M.** *Trypanosoma cruzi* carrying a monoallelic deletion of the calreticulin (TcCRT) gene are susceptible to complement mediated killing and defective in their metacyclogenesis. Mol Immunol. 53 (2013): 198 – 205.

- **SCHENKMAN, S.; GÜTHER, M.; YOSHIDA, N.** 1986. Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes: effect of specific monoclonal antibody. *J Immunol.* 137 (5): 1623 – 1628.
- **SARMA, J. V.; WARD, P.** 2011. The Complement System. *Cell Tissue Res.* 343(1):227-235.
- **SIMON, N.; LASONDER, E.; SCHEUERMAYER, M.; KUEHN, A.; TEWS, S.; FISCHER, R.** 2013. Malaria Parasites Co-opt Human Factor H to Prevent Complement-Mediated Lysis in the Mosquito Midgut. *Cell Host Microbe.* 13: 29 – 41.
- **SØRENSEN, P.; MORTENSEN, K.** 2004. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 115 (2005): 113 – 128.
- **SOUZA, W.; ULISSES DE CARVALHO, T.; SANTOS, E.** 2010. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells. **In:** Telleria, J.; Tibayrenc, M. (Eds.). *American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research.* Elsevier. Jamestown Road, London. pp. 393-432.
- **TIRADO, T.; BAVIA, L.; AMBROSIO, A.; CAMPOS, M.; DE ALMEIDA, M.; MESSIAS-REASON, I.; BORGES, F.** 2021. A comparative approach on the activation of the three complement system pathways in different hosts of Visceral Leishmaniasis after stimulation with *Leishmania infantum*. *Dev Comp Immunol.* 120 (2021): 104061.
- **TORRES-GUTIÉRREZ, E.; PÉREZ-CERVERA, Y.; CAMOIN, L.; ZENTENO, E.; AQUINO-GIL, M.; LEFEBVRE, T.; CABRERA-BRAVO, M.; REYNOSO-DUCOING, O.; BUCIO-TORRES, M.; SALAZAR-SCHETTINO, P.** 2019. Identification of O-GlcNacetylated Proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Front Endocrinol.* 10: 199.
- **VALENZUELA, L.; SEPÚLVEDA, S.; PONCE, I.; GALANTI, N.; CABRERA, G.** 2018. The overexpression of TcAP1 endonuclease confers resistance to infective *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes against oxidative DNA damage. *J Cell Biochem.* 2018: 1 – 11.
- **WANG, X.; BECKHAM, T.; MORRIS, J.; CHEN, F.; GANGEMI, J.** 2008. Bioactivities of Gossypol, 6-Methoxygossypol, and 6,6'-Dimethoxygossypol. *J Agric Food Chem.* 56(12): 4393 – 4398.

ANEXOS

Anexo 1. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar funcionalmente el rol inhibitorio de la proteína Factor Acelerador del decaimiento de tripomastigote de *T. cruzi* recombinante (sT-DAF) sobre el sistema del complemento.

Objetivo específicos

1. Generar proteína recombinante sT-DAF en condiciones nativas
2. Determinar la capacidad de la proteína sT-DAF de inhibir la lisis mediada por complemento en *T. cruzi*.

Anexo 2. Certificado de bioseguridad



CERTIFICADO N° 121

Santiago, 23, julio, 2018

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto de memoria de título, "Caracterización funcional del factor acelerador del decaimiento de trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi* recombinante (rt-DAF)" del alumno Sr. Bastián Elgueta, cuya Profesora Guía es la Dra. Galia Ramirez, académico de FAVET.

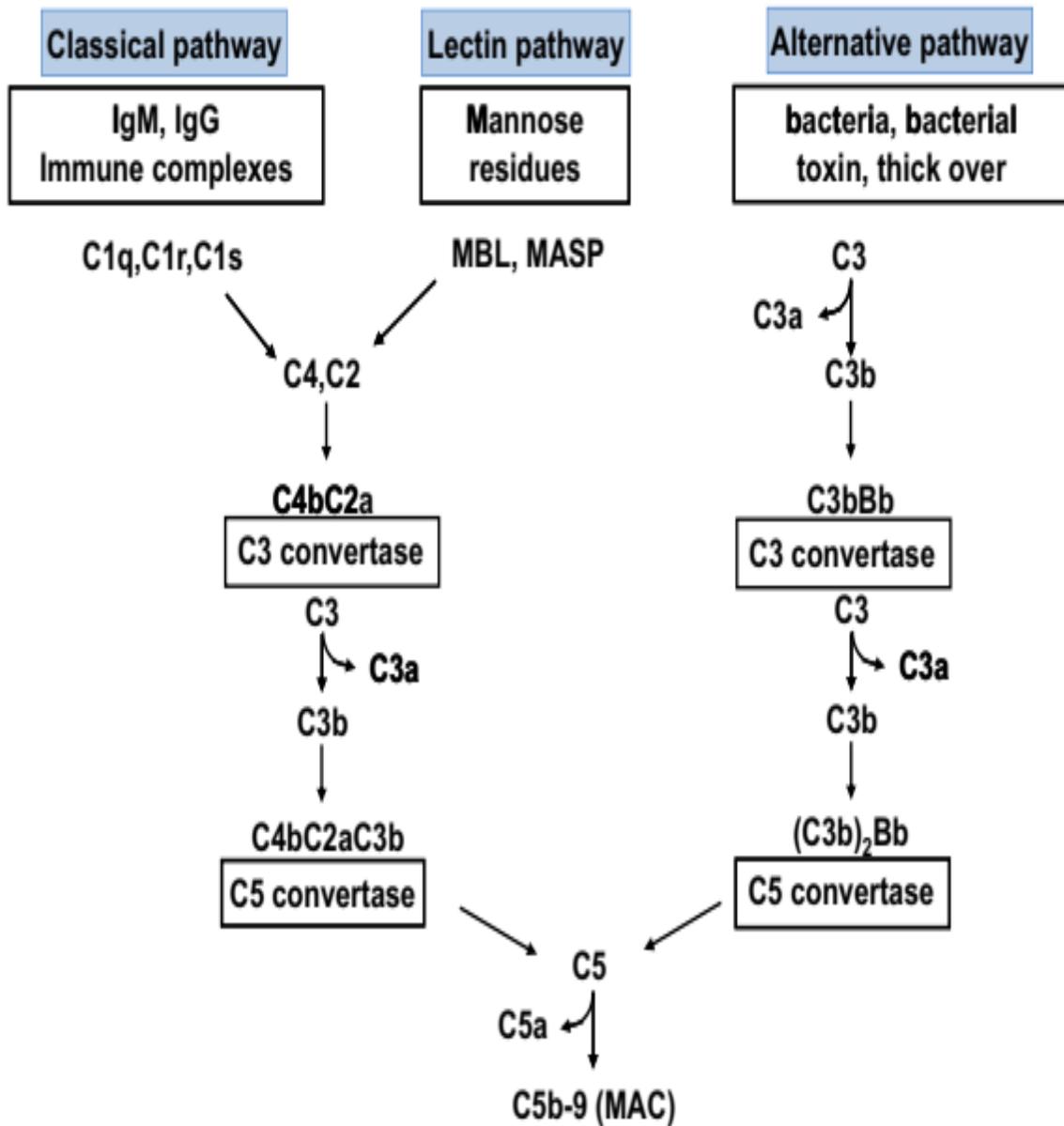
El proyecto de memoria de título cumple las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, y que son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y en el "Manual de Bioseguridad de Conicyt" (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.


DRA. LISETTE LAPIERRE A.

Coordinadora
Comité de Bioseguridad
FAVET



Anexo 3. Vías de activación del Sistema de Complemento



Esquema general de la cascada del complemento ilustrando sus tres vías de activación (clásica, de las lectinas y alterna) y el MAC (Noris y Remuzzi, 2013).

Anexo 4. Moléculas implicadas en la evasión del C por *T. cruzi*

Parasite molecule	Complement component	Complement pathway affected	Reference
TcCRT	Binds to MBL collagen-like domain	Lectin pathway	Ferreira et al., 2004b
	Binds to Ficolin-2 collagen-like domain	Lectin pathway	Sosoniuk et al., 2014
	Interacts with C1q collagen-like domain	Classical pathway	Ferreira et al., 2004b; Valck et al., 2010
T-DAF	Binds to C3b and C4b accelerating the dissociation of C3 convertase	Alternative, classical, and lectin (probably) pathways	Joiner et al., 1988; Rimoldi et al., 1988; Tambourgi et al., 1993
TcCRP/Gp160	Binds to C3b and C4b preventing assembly of C3 convertase	Alternative and classical Lectin (probably) pathways	Norris et al., 1991, 1989; Norris and Schrimpf, 1994; Norris, 1998
TcCRIT	Binds to C2 and prevent its cleavage by C1s and MASP2	Classical and lectin pathways	Cestari et al., 2008, 2009
gp58/68	Interacts with Factor B blocking its binding to C3b	Alternative pathway	Fischer et al., 1988
<i>T. cruzi</i> -induced membrane-derived vesicles from host cells or microvesicle (MV)	Binds to C3 convertase (C4b2a) on the <i>T. cruzi</i> surface, thereby inhibiting C3 cleavage	Classical and lectin pathway	Cestari et al., 2012; Ramirez et al., 2016

Lidani *et al.*, 2017