



SOCHIPA
SOCIEDAD CHILENA DE PARASITOLOGÍA



Fermoquímica del Pacífico

JORNADA ANUAL SOCHIPA 2022

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

Elgueta Bastián¹, Valenzuela Lucía², Yael Mendel², Cabrera Gonzalo², Ramírez-Toloza Galia¹.

¹Laboratorio de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

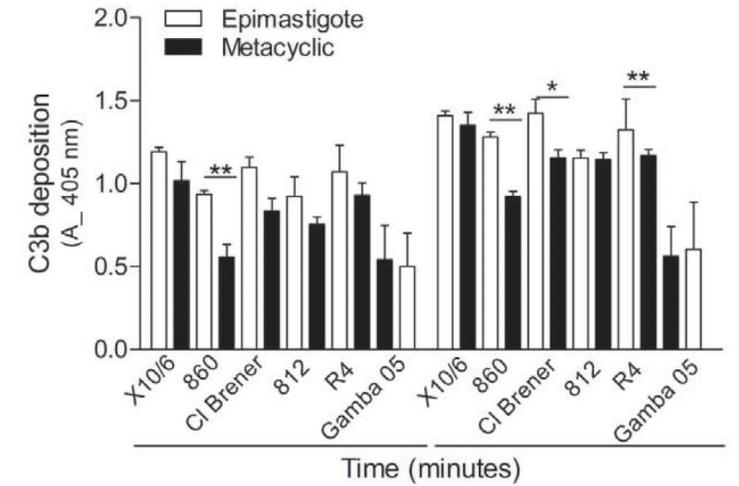
²Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

INTRODUCCIÓN:

Trypanosoma cruzi y el Sistema del Complemento (C)

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario, agente causal de la enfermedad de Chagas

Su ciclo de vida, transcurre entre vectores triatominos y múltiples hospederos mamíferos



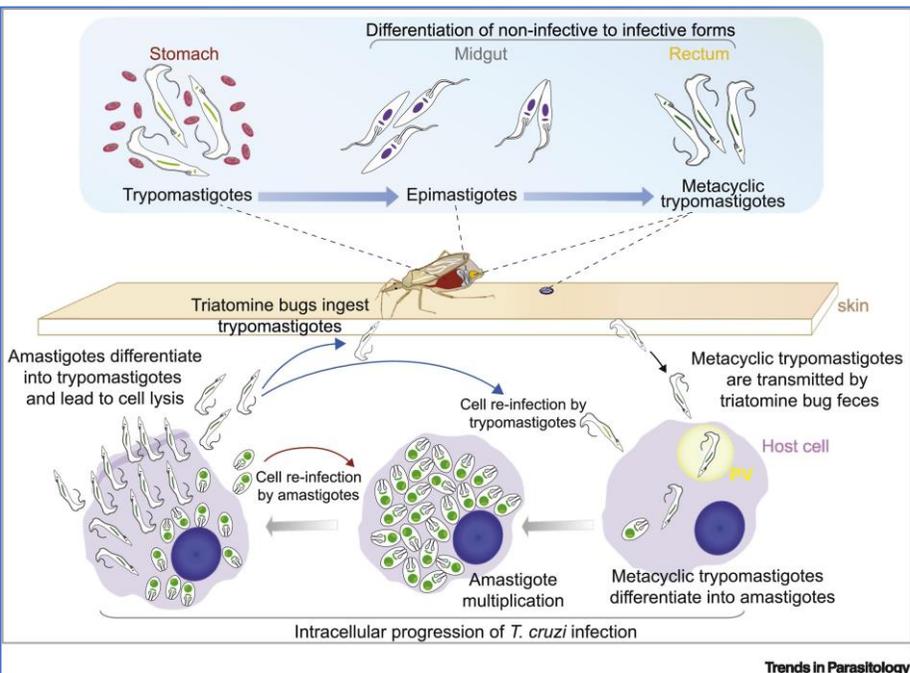
Cestari I, Ramirez MI. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. PLoS One. 2010 Mar 16;5(3):e9721. doi: 10.1371/journal.pone.0009721

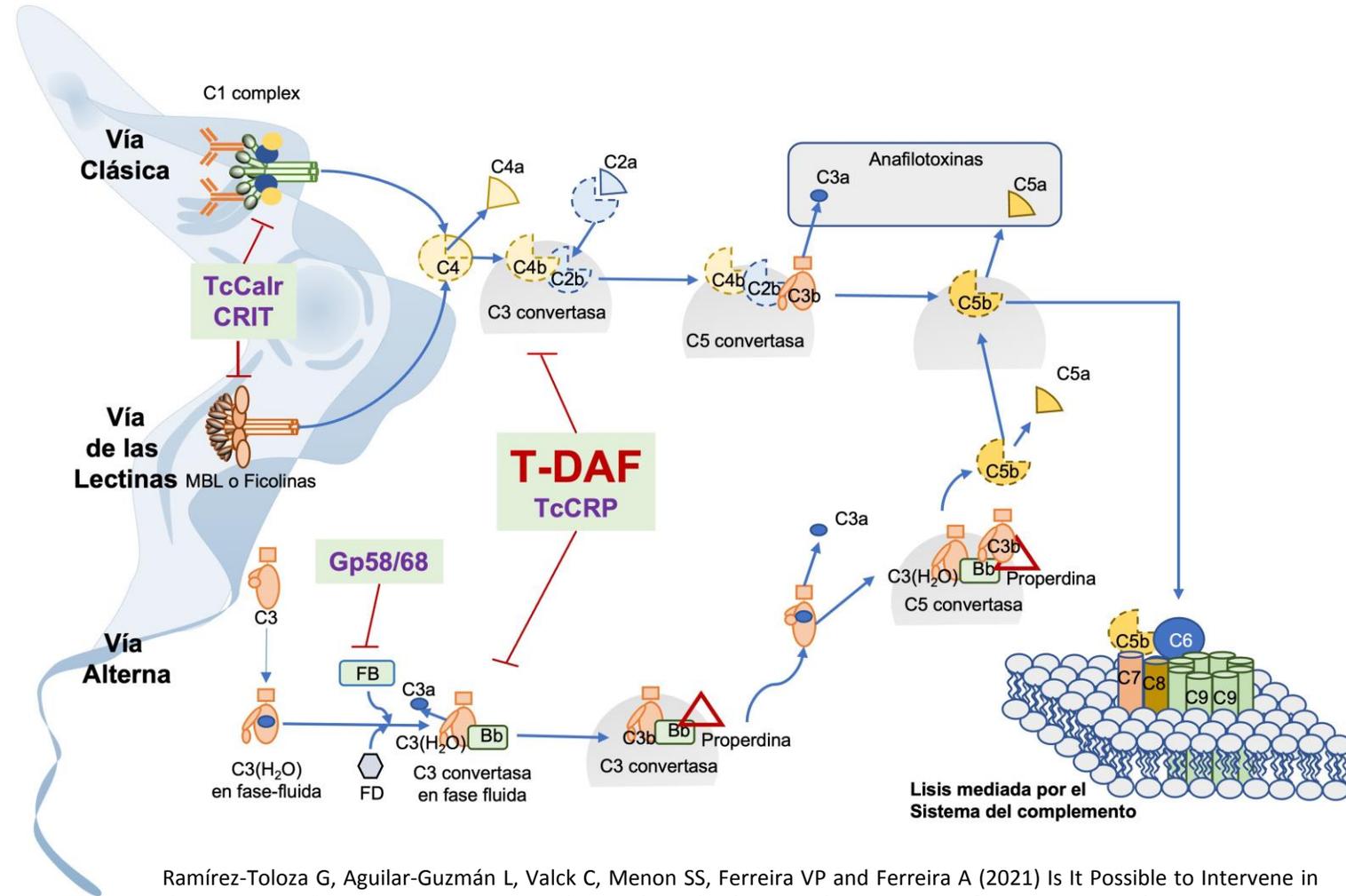
En el torrente sanguíneo del mamífero, *T. cruzi* se convierte en un blanco del sistema inmune

Sin embargo, los **trypomastigotes, formas infectantes de *T. cruzi*, son altamente resistentes a la acción del C**, importante componente efector de la respuesta inmune innata. Por el contrario, los **epimastigotes, formas replicativas presentes solo en el vector triatomino, son extremadamente sensibles a su acción**

Epimastigotes son las formas que replican en el vector biológico

Trypomastigotes están presentes en el hospedero mamífero y se exponen a la respuesta inmune del hospedero





OBJETIVO:

Sintetizar una proteína T-DAF recombinante con capacidad de inhibir el C humano *in vitro*.

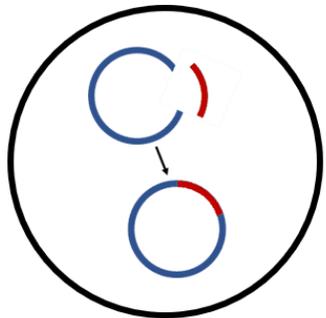
- La resistencia de los tripomastigotes se debe a la expresión o secreción de proteínas reguladora del C, con función homóloga a las proteínas reguladoras presentes en el hospedero
- La proteína aceleradora del decaimiento de la convertasa de tripomastigotes (T-DAF) inhibe la acción del C.
- **Su mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado.**

MATERIAL Y MÉTODO

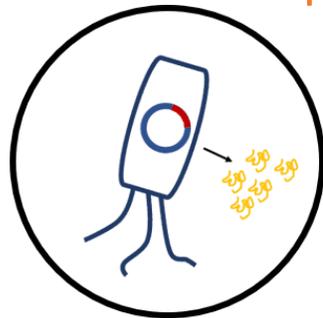
Se transformaron bacterias *E. coli* JM109 con la construcción pQE80L-T-DAF, las cuales fueron sembradas y cultivadas, para obtener una proteína T-DAF recombinante (rT-DAF)

rT-DAF fue purificada, en condiciones nativas, mediante columna de Niquel. La proteína fue visualizada mediante SDS-PAGE y Western blot.

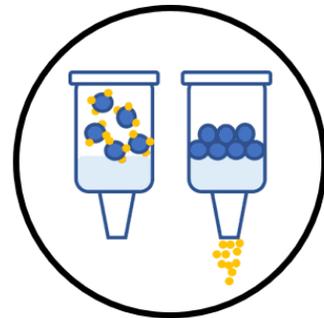
Se midió su capacidad de inhibir el C humano, agregando concentraciones crecientes de proteína recombinante a 5×10^5 epimastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi*, en presencia de 20% suero normal humano (SNH) durante 30 minutos a 37°C. La viabilidad de los epimastigotes fue medida en ensayo de Alamar Blue.



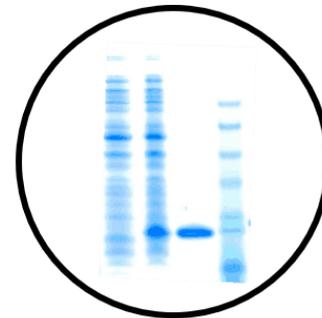
Secuenciación y Clonamiento



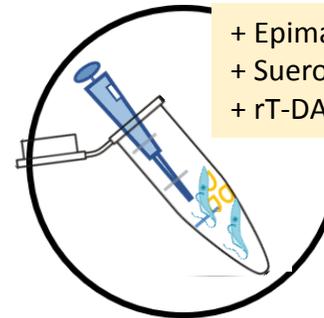
Transformación de bacterias y expresión de proteína T-DAF



Purificación en Columna de Niquel



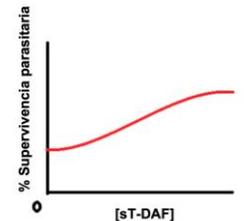
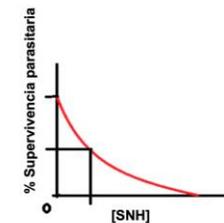
Verificación de tamaño molecular y pureza



Caracterización funcional

+ Epimastigotes
+ Suero (C)
+ rT-DAF

Evaluación de lisis mediada por C → supervivencia parasitaria



RESULTADOS:

Se clonó, expresó y purificó una proteína de aproximadamente 35 kDa



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de secuencias nucleotídicas de T-DAF insertas en constructo pQE-80L-rT-DAF, y purificados de bacterias *E. coli* transformadas.

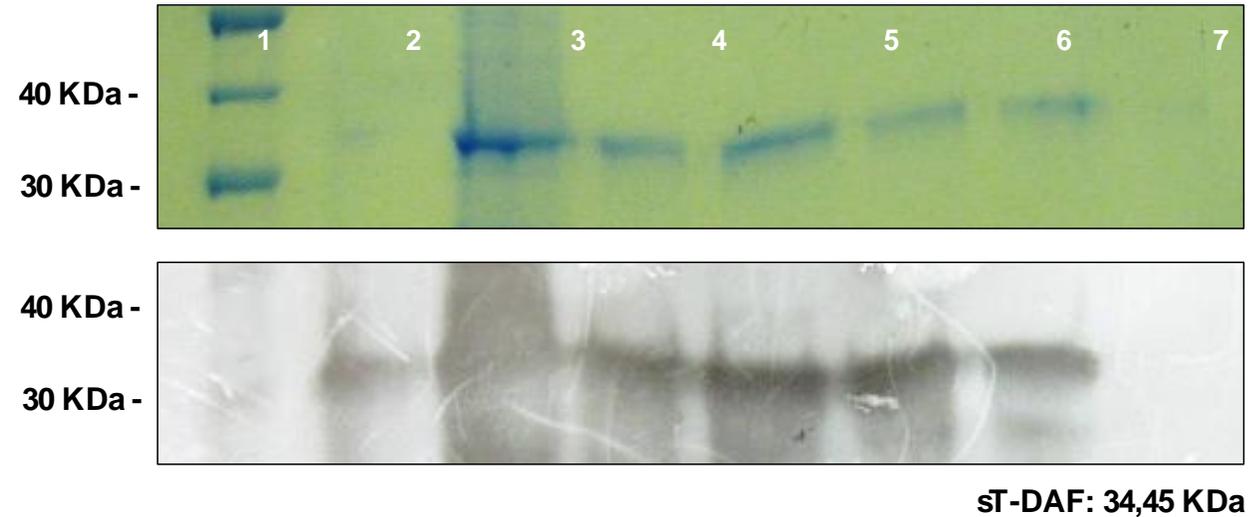
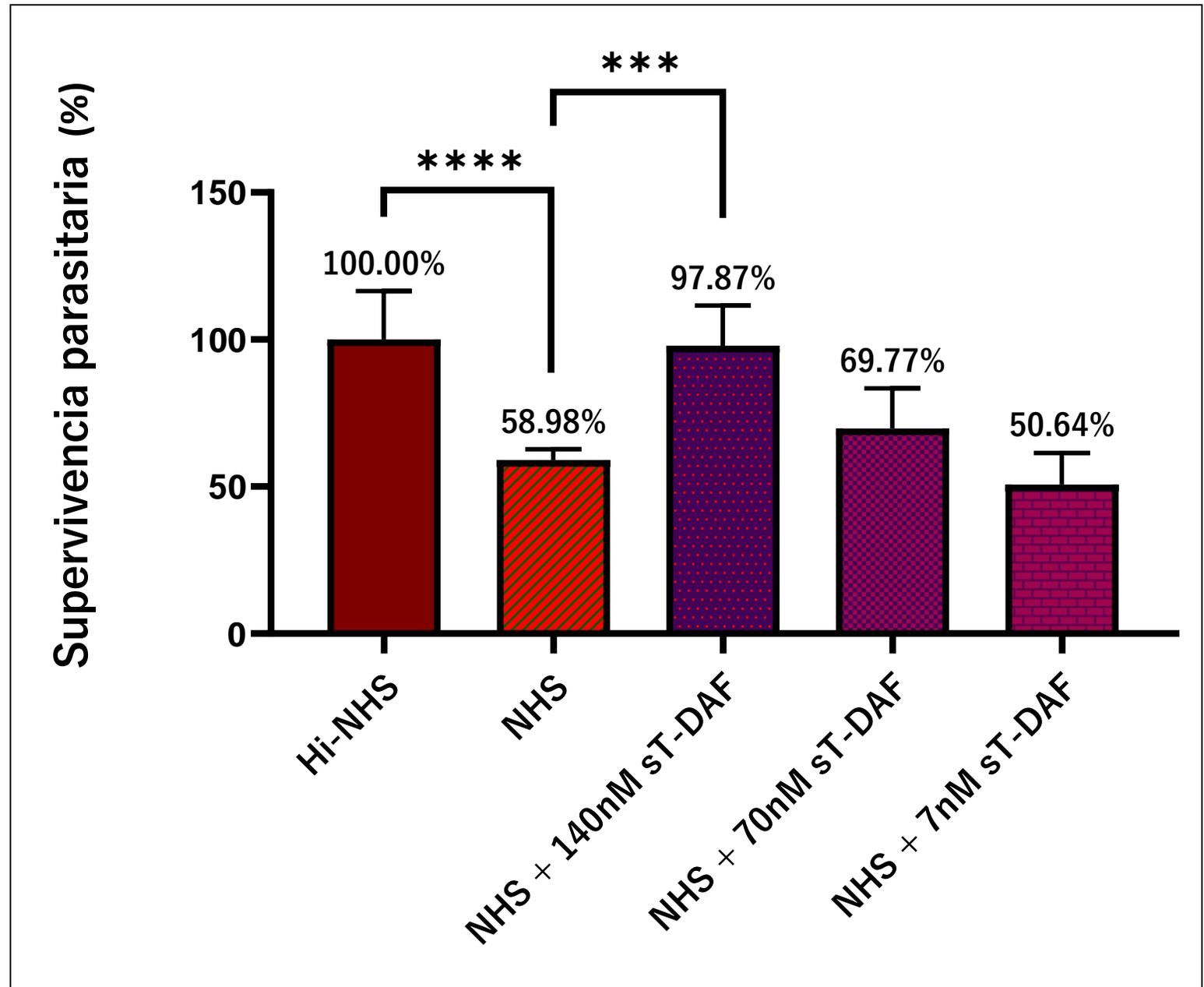


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y Western Blot de muestras obtenidas de eluidos de la proteína rT-DAF.

RESULTADOS:

rT-DAF es funcional, ya que su adición junto a suero normal humano con complemento activo, es capaz de proteger a epimastigotes, formas parasitarias de *T. cruzi* considerados altamente sensibles a la lisis del C.

Figura 3. Ensayo de lisis celular mediada por el complemento. 5×10^5 epimastigotes fueron incubados con 20 % de suero normal humano (NHS) como fuente de C. Adicionalmente, 140, 70 y 7 nM de la proteína rT-DAF fueron agregados al suero. El porcentaje de supervivencia parasitaria fue evaluado mediante Alamar Blue. Como control negativo un grupo fue incubado con NHS inactivado por calor (Hi-NHS). Los grupos fueron comparados usando ANOVA y la prueba de Bonferroni. ****: p value < 0,0001; ***: p value = 0,0001.



Conclusión y Proyecciones

La proteína T-DAF recombinante generada es funcional, siendo capaz de conferir protección contra la lisis mediada por Complemento a epimastigotes, formas parasitarias consideradas sensibles a este importante componente del sistema inmune innato.

Esta proteína funcional permitirá dilucidar los mecanismos específicos de inhibición del Sistema del Complemento utilizados por T-DAF y así diseñar alternativas terapéuticas o profilácticas para la Tripanosomiasis Americana, basadas en su capacidad de controlar la acción del Complemento de su hospedero.

Referencias

- Moretti NS, Mortara RA, Schenkman S. *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol. 2020 Apr;36(4):404-405. doi: 10.1016/j.pt.2019.10.002
- Cestari I, Ramirez MI. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. PLoS One. 2010 Mar 16;5(3):e9721. doi: 10.1371/journal.pone.0009721
- Ramírez-Tolosa G, Aguilar-Guzmán L, Valck C, Menon SS, Ferreira VP and Ferreira A (2021) Is It Possible to Intervene in the Capacity of *Trypanosoma cruzi* to Elicit and Evade the Complement System? Front. Immunol. 12:789145. doi: 10.3389/fimmu.2021.789145