

Producción recombinante de la enzima TcTS para el desarrollo de tratamientos contra Chagas

Aguilar Aguilar Antonio Emmanuel¹ Silva Cuellar Karla María¹ Rodríguez García Edgar Giovanni¹ Reyes Martínez Juana Elizabeth¹

¹Laboratorio de Biología Celular K203, Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N, Guanajuato, México
juana.reyes@ugto.mx¹

Resumen

Trypanosoma cruzi es el causante de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, su tratamiento en la fase crónica es difícil por lo que se requiere de una búsqueda constante de estrategias para la prevención de la infección en regiones endémicas o bien para su eliminación una vez que ha infectado al hombre. La búsqueda constante de tratamientos contra enfermedades parasitarias ha integrado los desarrollos tecnológicos realizados en las áreas de genética y biotecnología, esto ha permitido estudiar la función biológica de proteínas parasitarias entre ellas la Trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTS). La expresión recombinante de estas proteínas ha sido limitada por la disponibilidad y cantidad de organismos y medios de cultivo en los que se produce. En el presente proyecto realizamos la suplementación de medios de cultivo convencionales para la producción de la proteína recombinante TcTS y a partir de esta explorar su potencial antigénico en un futuro.

Palabras clave: Chagas; *Trypanosoma cruzi*; trans-sialidasa.

Introducción

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, enfermedad que se ha identificado desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina, trata de una infección provocada por el parásito *Trypanosoma cruzi* el cual infecta al ser humano gracias a un vector (*Triatoma infestans*) conocido comúnmente como chinche besucona, un organismo que se alimenta de la sangre generando picaduras durante el estado de reposo del humano, usualmente en zonas como la cara (Lidani et al., 2019; Nunes et al., 2013).

Normalmente la infección aguda es combatida por el sistema inmunológico de la persona infectada, eliminando al parásito en circulación. Sin embargo, si éste no es eliminado se replica en el interior de las células del hospedero (Cardillo et al., 2015). Los fármacos que se administran como tratamiento contra la Tripanosomiasis son altamente tóxicos, solo se administran en la etapa temprana de la enfermedad y actualmente no existen vacunas para Chagas (Mazzeti et al., 2021; Sales Junior et al., 2017).

Investigaciones realizadas por distintos grupos de trabajo, han demostrado que *T. cruzi* ha desarrollado la capacidad de añadir un azúcar llamado ácido siálico a las glicoproteínas de su membrana, esto como un mecanismo de evasión hacia la respuesta inmune del hospedero evitando la acción lítica del complemento, la acción fagocítica de los macrófagos y la activación de los linfocitos T (Nardy et al., 2016). Es interesante que el parásito no cuenta con una vía metabólica para la síntesis “*de novo*” del ácido siálico. Sin embargo, contiene una enzima que toma al azúcar de hospedero específicamente de la superficie de las células del torrente sanguíneo y transfiere esta molécula a la porción terminal de las glicoproteínas del parásito esta enzima es la trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) (Oliveira et al., 2014). Dada la importancia que tiene esta enzima para el parásito, se han buscado varias estrategias para inhibir su función (Freire-de-Lima et al., 2015). Una de ellas es bloquear su actividad mediante la inducción de la producción de anticuerpos específicos, una vez que se inhiba su función el sistema inmune podrá reconocer al parásito y eliminarlo.

Anteriormente en el grupo de trabajo se estableció la producción de la enzima TcTS en un sistema de expresión heterólogo utilizando a *E. coli* (BL21). Sin embargo, las cantidades obtenidas de proteína

recombinante fueron limitados al crecimiento de la bacteria (Reyes Martínez et al., 2013). En el presente proyecto se estableció una metodología para la expresión de TcTS en la que involucra la selección de diferentes medios de cultivo en la que se determinó la viabilidad bacteriana para posteriormente realizar una cinética post-inducción de la proteína recombinante mencionada.

Material y Métodos

Cepas

Se trabajó con la cepa de laboratorio de *E. coli* (BL21) la cual fue previamente transformada con el vector de expresión pET30a al cual se le insertó en gen que codifica a la porción catalítica de la enzima TcTS (pET30a-TcTS) (Reyes Martínez et al., 2013).

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en el presente proyecto se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo.

Medio	Contenido
A	LB
B	Caseína + Extracto de levadura
C	LB + sacarosa
D	LB + glucosa + Vitamina + minerales esenciales
E	LB + glucosa + Complejo B (vitaminas)

Para la preparación del medio **A**: en cual contiene Luria Broth (LB), se pesaron 12 g de LB (Pronadisa) y se agregaron en 500 ml de agua destilada. Este fue nuestro medio LB sin modificaciones usado como control para el crecimiento de *E. coli*.

El medio **B**, fue preparado en un volumen final de 250 ml de agua, se agregaron 1.87 g de hidrolizado de caseína y 1.25 g de extracto de levadura (MCDLAB) y 2.5 g NaCl (Golden Bell Reactivos). El medio **C**, se preparó en un volumen final de 100 ml, se suplementó el medio LB previamente preparado al cual se le agregaron 0.1 g de sacarosa (Golden Bell Reactivos).

Para la preparación del medio **D**, el volumen final fue de 250 ml; al medio LB previamente preparado se le añadieron 0.2 g de glucosa (Sigma-Aldrich) y una solución de vitaminas y minerales esenciales a las concentraciones finales que se describen en la tabla 2. De igual manera, para la propuesta **E** se suplementó el medio LB previamente preparado vitaminas del complejo B lo que se describe en la tabla 3.

Cada una de las preparaciones de medios de cultivo se rotularon y se esterizaron por 15 min a 120 psi.

Tabla 2. Suplementos añadidos al medio D.

Componente	Cf (µg)
Acetato de retinol	0.03
Beta-caroteno	0.112
Acetato de dl-alfa tocoferilo	1.15
Fitomenadiona	0.007
Colecalcifero	0.084
Biotina	0.052
d-pantotenato de calcio	0.124
Cianocobalamina	0.026
Ácido fólico	0.005
Luteína	0.130
Licopeno	0.081
Niacinamida	0.157
Clorhidrato de Piridoxina	0.070
Rivoflavina	0.036
Mononitrato de Tiamina	0.031
Ácido ascórbico	0.974
Yoduro de Potasio	0.002
Carbonato de calcio	5.257
Sulfato cúprico	0.026
Fumarato ferroso	0.319
Óxido de magnesio	0.828
Sulfato de magnesio	0.161
Cloruro de potasio	1.525
Cloruro de cromo	0.002
Molibdato de sodio	0.001
Selenato de sodio	0.001
Óxido de zinc	0.093

Tabla 3. Suplementos añadidos al medio E.

Componente	Cf (mg)
B ₁	1.00
B ₆	0.5
B ₁₂	0.1

Para analizar el crecimiento de las bacterias en los distintos medios de cultivo, se realizó un pre-inoculo tomando 50 µl de la bacteria *E. coli* (BL21) para agregarlos en 10 ml de medio LB, dichas bacterias fueron tomadas de un stock que se encontraba en almacenamiento a -70°C y las cuales fueron previamente transformadas con el vector de expresión pET30a-TcTS. Se incubaron a 37°C por 24 horas con agitación

constante de 180 rpm en una incubadora MaxQ6000 de Thermo Scientific. Al día siguiente se sembraron las bacterias en la misma proporción en 10 ml de medio LB y en los diferentes medios descritos previamente. Posteriormente se determinó su crecimiento realizando una cinética de 8 horas tomando muestras cada hora para determinar sus densidades ópticas a 600 nm (OD^{600}) usando el lector de placas AM100 AllSheng con agitación de 1 minuto previa a cada lectura.

Prueba de viabilidad

Se realizaron diluciones seriadas que van de 1:10 a 1:10¹⁰ de los cultivos LB como control y el medio suplementado con vitaminas (LB+glu+vit+min), se tomaron 100 μ l de estas diluciones seriadas para sembrar en cajas de LB agar las cuales se incubaron a 37° C por 24 horas para finalmente determinar su crecimiento realizando un conteo de colonias.

Inducción de la expresión

Se realizó la expresión de la proteína recombinante añadiendo 10 μ l de Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM siguiendo el protocolo descrito previamente por reyes y colaboradores (Reyes Martínez et al., 2013) a cada uno de los cultivos de los dos medios mencionados en la sección anterior. Se tomaron alícuotas de 200 μ l cada hora durante 4 horas para determinar la expresión de la proteína recombinante en las bacterias en dicho periodo.

SDS-PAGE

Preparación de las muestras

Se añadieron 50 μ l de buffer de lisis a cada una de las muestras que contenían las bacterias colectadas en la cinética de expresión. Después de añadir el buffer de lisis se llevaron al vortex por 1 minuto, después se mantuvieron 5 minutos en hielo para nuevamente realizar el paso anterior, finalmente se centrifugaron por 10 minutos a 10,000 rpm en una minicentrífuga MiniSpin marca Eppendorf. Se tomaron 100 μ l del sobrenadante y se pasaron a un tubo nuevo. Se precipitaron con 1 ml de metanol frío y se mantuvieron a -20 por 3 horas. Pasado el tiempo, se centrifugaron nuevamente por 10 minutos a 10,000 rpm, se les retiró el sobrenadante y se suspendió la pastilla en 50 μ l de buffer de carga Laemmli 2x (Sigma Aldrich) para más adelante cargarse en el gel de poliacrilamida.

Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% (3 ml de Acrilamida al 30%, 2.25 ml de Tris pH 8.8, 2.4 ml de agua destilada, 300 μ l de SDS 2%, 100 μ l de TEMED y 100 μ l de persulfato de amonio al 10%). Adicionalmente se preparó un gel de compactación al 5% (750 μ L de Acrilamida al 30%, 1.24 ml de Tris pH 6.8, 2.25 ml de agua destilada, 250 μ l de SDS 2%, 50 μ L de TEMED y 50 μ l de persulfato de amonio al 10%). Una vez polimerizados los geles, se cargaron 20 μ l de cada una de las muestras lisadas y se sometió a un voltaje inicial de 80 voltios por 30 min y posteriormente se aumentó el voltaje a 100 voltios durante 1.5 horas. Se utilizó una cámara de electroforesis vertical de la marca BioRad.

Tinción por Coomassie

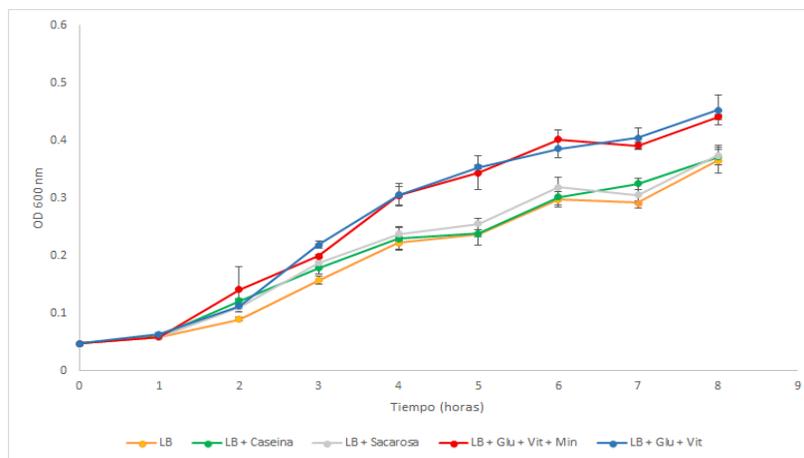
Una vez que se terminó de realizar la electroforesis, para revelar a las proteínas presentes en cada muestra se tiñó el gel utilizando reactivo de Coomassie (Brunelle & Green, 2014). Se incubó el gel con la solución de Coomassie (0.2gr de azul de Coomassie R-250 en MetOH/ Ac. Acético 1:1 v/v) por 1 hora, posteriormente se dejó con solución desteñidora (MetOH 50%/Ac, Acético 10%/H₂O 40%) en agitación 20 RPM cambiando la solución desteñidora cada hora, esto hasta desteñir el gel y solo observar las bandas de las proteínas teñidas de color azul. Tras lavar el gel para eliminar el exceso de tinción, se realizó una captura de imagen utilizando el equipo ChemiDoc MP Imaging System de Bio-Rad.

Resultados

De los 5 medios de cultivo que se utilizaron en el presente estudio, observamos que el medio **D**; el cual fue Luria Broth suplementado con glucosa y vitaminas más minerales esenciales tiene un mayor crecimiento determinado por su OD⁶⁰⁰ en contraste a lo observado cuando se utilizó el medio **A** (LB sin suplementar) (gráfica 1, líneas roja y amarilla). Interesantemente el incremento de la densidad óptica de los medios suplementados se observa desde las 4 horas y persiste a las 8 horas en la cinética realizada.

En el caso de los medios **B** y **C**, los cuales fueron LB suplementados con Sacarosa y Caseína respectivamente no se observó una diferencia con respecto al medio **A** (LB sin suplementar) lo cual se puede observar en la gráfica 1, (líneas verde, gris y amarillo).

Finalmente, cuando se utilizó el medio **E**, el cual fue suplementado con vitaminas del complejo B, se observa un comportamiento similar al observado cuando se utilizó el medio **D** (gráfica 1, líneas roja y azul).



Gráfica 1. Crecimiento de *E. coli* en diferentes medios de cultivo. Muestra el crecimiento determinado por mediciones de su densidad óptica a 600 nm en intervalos de una hora con duración de 8 horas. N=3

Dada la factibilidad de preparación del medio se decidió continuar utilizando el medio **D** (LB+glu+vit+min) para realizar la expresión de la proteína recombinante. Sin embargo, antes de continuar se confirmó la viabilidad de las bacterias mediante ensayos de dilución que van de 1:10 a 1:10¹⁰. Dado que en las diluciones menores de 1:10⁶ se observaron colonias incontables, se determinó realizar el conteo de colonias viables a partir de la dilución 1:10⁶. En la prueba viabilidad, la cepa de *E. coli* (BL21) creció en ambos medios **A** y **D**. Sin embargo, podemos observar una notoria diferencia de crecimiento de colonias entre el medio control y el medio suplementado con vitaminas y minerales esenciales (LB y LB+glu+vit+min) como se puede observar en la Figura 1A. La dilución que corresponde a 1:10⁷ es donde se se puede apreciar un mayor crecimiento de colonias en el medio LB suplementado con glucosa y vitaminas (Figura 1B).

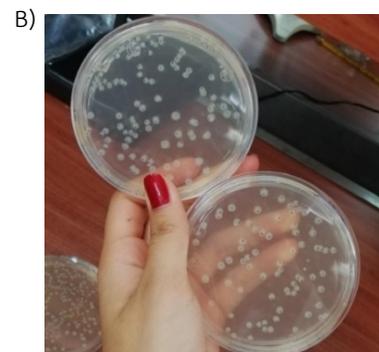
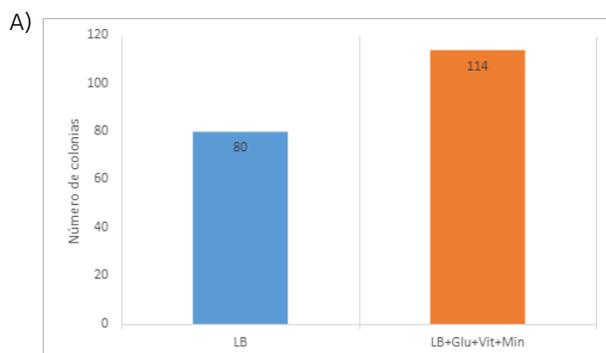


Figura 1. A) Grafica de la Prueba de viabilidad. A) Muestra el crecimiento de colonias de *E. coli* en dos diferentes medios. Barra azul corresponde al medio LB sin suplementar y la barra naranja corresponde al LB suplementado con glucosa y vitaminas (LB + Glu +Vit). B) Crecimiento de *E. coli* en placas con medio LB.

Una vez realizada la inducción de la proteína TcTS suplementando al medio con IPTG se realizó un análisis de las proteínas citoplasmáticas presentes en *E. coli* (BL21) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 2). En la cual podemos apreciar un incremento en la banda de una proteína de aproximadamente 70 KDa (TcTS) conforme pasa el tiempo, la cual se señala con una flecha. Del pozo 1 al 5 se observan las proteínas citoplasmáticas producidas en medio LB control (medio A) del tiempo 0 a las 4 horas post-inducción y del pozo 6 al 10 se observan las proteínas citoplasmáticas producidas en medio LB+glu+vit+min (medio D) de las muestras tomadas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

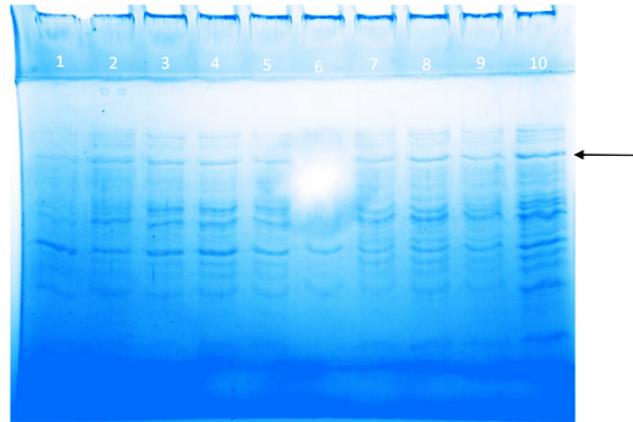


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida. La flecha negra indica la proteína TcTS.

Conclusiones.

Se logró determinar el crecimiento de células de *E. coli* (BL21) en diferentes medios de cultivo mediante la medición de su OD⁶⁰⁰, de los medios utilizados se observó un crecimiento mayor los medios D y E lo cual es más notorio a partir de las 4 horas de incubación. Por la factibilidad económica y facilidad de preparación se optó por utilizar el medio D para la inducción de la proteína recombinante TcTS. El uso de este medio se apoyó con la prueba de viabilidad donde observamos una mayor cantidad de colonias viables en el medio D comparado con el medio LB sin suplementar (medio A). Mediante SDS-PAGE se observó una mayor expresión de la proteína recombinante TcTS cuando las bacterias fueron crecidas utilizando el medio suplementado con vitamina y minerales esenciales (medio D) en comparación al medio LB control (medio A).

Bibliografía/Referencias

- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Coomassie blue staining. *Methods Enzymol*, 541, 161-167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6>
- Cardillo, F., de Pinho, R. T., Antas, P. R., & Mengel, J. (2015). Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathog Dis*, 73(9), ftv082. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv082>
- Freire-de-Lima, L., Fonseca, L. M., Oeltmann, T., Mendonça-Previato, L., & Previato, J. O. (2015). The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. *Glycobiology*, 25(11), 1142-1149. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv057>
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health*, 7, 166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Mazzeti, A. L., Capelari-Oliveira, P., Bahia, M. T., & Mosqueira, V. C. F. (2021). Review on Experimental Treatment Strategies Against. *J Exp Pharmacol*, 13, 409-432. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267378>

- Nardy, A. F., Freire-de-Lima, C. G., Pérez, A. R., & Morrot, A. (2016). Role of Trypanosoma cruzi Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Front Microbiol*, 7, 348. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00348>
- Nunes, M. C., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., Ribeiro, A. L., & Cardiology, C. o. C. D. o. t. I. S. o. (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*, 62(9), 767-776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- Oliveira, I. A., Freire-de-Lima, L., Penha, L. L., Dias, W. B., & Todeschini, A. R. (2014). Trypanosoma cruzi Trans-sialidase: structural features and biological implications. *Subcell Biochem*, 74, 181-201. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_8
- Reyes Martínez, J. E., Šardžik, R., Voglmeir, J., & Flitsch, S. L. (2013). Enzymatic synthesis of colorimetric substrates to determine α -2,3- and α -2,6-specific neuraminidase activity [10.1039/C3RA44791J]. *RSC Advances*, 3(44), 21335-21338. <https://doi.org/10.1039/C3RA44791J>
- Sales Junior, P. A., Molina, I., Fonseca Murta, S. M., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., & Carneiro, C. M. (2017). Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am J Trop Med Hyg*, 97(5), 1289-1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>