

**Título** Caracterización Funcional de las mucinas de T. Cruzi en la infección del hospedador invertebrado

---

**Tipo de Producto** Informe técnico

---

**Autores** Maria de los Milagros Cámara

---

Código del Proyecto y Título del Proyecto

---

BSR174 - Caracterización funcional de las proteínas de tipo mucina de T. cruzi

---

Responsable del Proyecto

---

María de los Milagros Cámara

---

Línea

---

Biología Molecular

---

Área Temática

---

Parasitología

---

Fecha

---

Noviembre 2017

---

# **Caracterización Funcional de las mucinas de *T. cruzi* en la infección del hospedador invertebrado**

## **Introducción**

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, un problema sanitario y económico de gran relevancia en nuestro país y en América Latina contra el cual no existen vacunas ni terapias farmacológicas apropiadas. Este parásito presenta un ciclo de vida altamente complejo en el cual alterna entre un hospedador vertebrado y uno invertebrado. La colonización del hospedador invertebrado es un proceso altamente complejo, que involucra la multiplicación, la diferenciación y el establecimiento de múltiples interacciones del parásito con distintas porciones del tubo digestivo del insecto triatomino. En nuestro laboratorio hemos descrito una familia de genes de tipo mucina (TcSMUG L) que estarían involucradas en la adhesión del parásito al intestino de la vinchuca, fundamental para su transmisibilidad al hospedador vertebrado. El objetivo central del presente proyecto es la caracterización detallada a nivel funcional de esta familia de mucinas en cepas representativas de *T. cruzi*. Mediante este estudio buscamos caracterizar y comprender los mecanismos de infección del parásito en el hospedador invertebrado. Esperamos que los resultados obtenidos nos permitan comprender con mayor profundidad la infección y transmisión de la enfermedad de Chagas y puedan ser capitalizados para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos contra la enfermedad.

## **Metodologías**

### ***Cepas, cultivos y generación de epimastigotes transgénicos de *T. cruzi*.***

El cultivo y manipulación de los epimastigotes se hará de acuerdo a lo descrito (Canepa, Degese et al. 2012). En el IIB contamos con numerosas cepas pertenecientes a los distintos linajes de *T. cruzi*. Para generar parásitos transgénicos, se usarán distintos sistemas de expresión homólogos, algunos de los cuales ya han sido utilizados en nuestro laboratorio (Urban, Santurio et al. 2011). Brevemente, se clonarán los cDNA deseados en vectores de expresión en tripanosomátidos fusionados a epítopos reporteros, se seleccionarán de acuerdo al gen de resistencia portado en el vector y se evaluarán los parásitos transgénicos en cuanto a su viabilidad, morfología, expresión y localización de las proteínas reporteras usando técnicas rutinarias (Bouvier, Camara Mde et al. 2013; Camara Mde, Bouvier et al. 2013) En este caso generaremos parásitos transgénicos sobreexpresantes de los distintos miembros de la familia TcSmug, TcSMUGL y TcSMUGS, como controles utilizaremos la proteína de superficie TcTSSA (mucina del estadio del tripomastigote). Se generaron parásitos transgénicos de las cepas CL Brener e Y, que pertenecen a distintos linajes de *T. cruzi*, siendo la E incapaz de infectar al insecto hematófago *R. prolixus* y presenta bajos niveles de TcSMUGL

### ***Interacción Ex vivo entre las células del intestino de *R. prolixus* y los epimastigotes de *T. cruzi****

Se seguirán protocolos ya descritos (Gonzalez, Souza et al. 2013) (Vieira, Waniek et al. 2014). Epimastigotes de *T. cruzi* serán lavados y resuspendidos en medio BHI a una densidad de  $2,5 \times 10^7$  cel/ml. 200  $\mu$ l de esta suspensión de parásitos serán mezclados con secciones posteriores del intestino de *R. prolixus* e incubados 30 minutos a 25 C. Bajo estas condiciones los epimastigotes se adhieren a las células

epiteliales del intestino o del recto. Luego de la incubación se procederá al conteo bajo microscopio del número de parásitos adheridos. En cada caso se tomarán 100 campos elegidos al azar y se realizarán 10 muestras independientes por cada línea transgénica de parásitos. Para este análisis utilizamos insectos de las especies *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*.

### ***Ensayos de lisis Ex vivo***

Para poder establecer la infección, el parásito debe ser capaz de colonizar el tracto digestivo del insecto vector, siendo capaz de enfrentar las condiciones adversas del mismo. Al observarse una capacidad diferencial de las distintas cepas de *T. cruzi* para poder infectar a distintas especies de insecto, buscaremos analizar la causa de este fenómeno, para ello realizaremos ensayos de lisis ex vivo utilizando distintas cepas de *T. cruzi* y los parásitos transgénicos previamente generados. Brevemente se extraerá el contenido estomacal de 10 ninfas de 5 estadio de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans* 24 hs y 7 días post alimentación, posteriormente filtrados y homogeneizados. Con los mismos se incubarán  $2 \times 10^5$  epimastigotes de *T. cruzi*. Luego de 30 minutos se contarán el número de parásitos motiles bajo microscopio óptico y cámara de Neubauer.

### ***Ensayos de infección in vivo.***

Brevemente Ninfas de 5 estadio alimentadas regularmente serán hambreadas por 7 días y serán alimentadas con una mezcla de sangre humana y epimastigotes ( $2 \times 10^5$  parásitos/ml) de las distintas cepas y cepas transgénicas (Gonzalez, Souza et al. 2013). A los 7, 14 y 21 post infección se tomarán y diseccionarán el intestino medio y el recto de 10 insectos. Estos serán homogenizados en PBS y se estimarán el número de parásitos en cada homogenato bajo microscopio óptico y cámara de Neubauer (Gonzalez and Garcia 1992; Garcia, Gonzalez et al. 1999). Cada experimento será llevado a cabo por triplicado. 3.4).

### **Resultados:**

#### **Ensayos de Infección in vivo**

Las líneas transgénicas obtenidas fueron utilizadas para realizar infecciones in vivo en ninfas de 5 estadio de *Rhodnius prolixus*. Para la cepa CL Brener se observó que las cepas sobreexpresantes de TcSMUGL y TcSMUGS presentaron una mayor prevalencia en el insecto que las cepas control (Figura 1). Llamativamente para la cepa Y que es incapaz de infectar *Rhodnius prolixus* se observaron insectos positivos para las cepas transgénicas sobreexpresantes de TcSMUGL y TcSMUGS sugiriendo que ambas familias de mucinas se encuentran involucradas en la infección del parásito en su hospedador invertebrado (Figura 1).

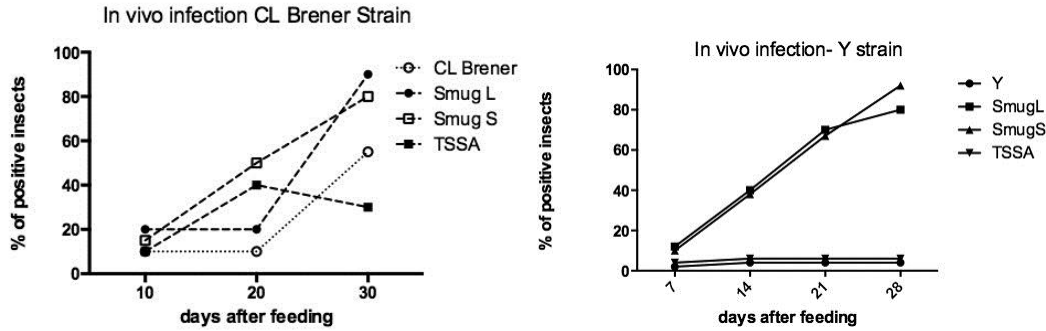


Figura 1: Ensayos de infección in vivo en *Rhodnius prolixus*. Ninfas de 5 estadio alimentadas regularmente serán hambreadas por 7 días y serán alimentadas con una mezcla de sangre humana y epimastigotes ( $2 \times 10^5$  parásitos/ml) de las distintas cepas y cepas transgénicas. A los 7, 14 y 21 post infección se tomarán y diseccionarán el intestino medio y el recto de 10 insectos. Estos serán homogenizados en PBS y se estimarán el número de parásitos en cada homogenato bajo microscopio óptico y cámara de Neubauer. Se graficaron el número de insectos positivos a lo largo de la infección.

### Desarrollo de las cepas transgénicas en el insecto vector

Paralelamente se cuantificaron la cantidad de metacíclicos a los 28 días post infección. Este análisis se llevó a cabo por conteo directo en el microscopio óptico. Se observó un mayor número de metacíclicos en las líneas de TcSMUGL y TcSMUGS en ambas cepas de parásitos (Figura 2).

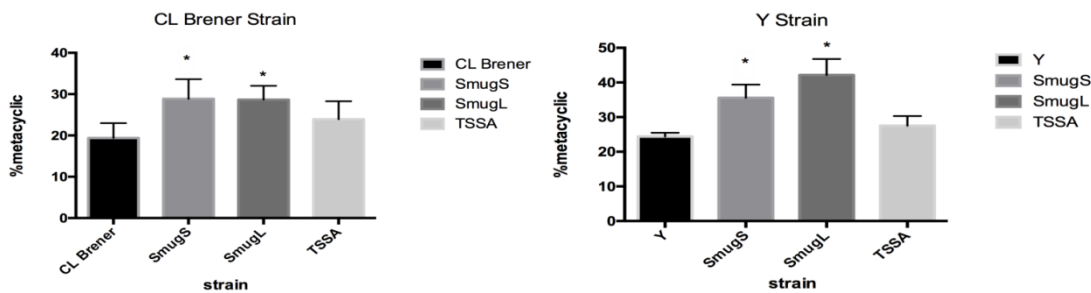


Figura 2: Porcentaje de metacíclicos 28 días post-infección. Ninfas de 5 estadio alimentadas regularmente serán hambreadas por 7 días y serán alimentadas con una mezcla de sangre humana y epimastigotes ( $2 \times 10^5$  parásitos/ml) de las distintas cepas y cepas transgénicas. A los 7, 14 y 21 post infección se tomarán y diseccionarán el intestino medio y el recto de 10 insectos. Estos serán homogenizados en PBS y se estimarán el número de parásitos en cada homogenato bajo microscopio óptico y cámara de Neubauer. Se contaron el número de epimastigotes metacíclicos y se graficó el porcentaje de metacíclicos en comparación con el número de parásitos encontrados.

### Ensayos de adhesión ex vivo

Con el fin de analizar con mayor detalle la función de las mucinas en la infección del hospedador invertebrado realizamos ensayos de adhesión in vitro. En primera instancia analizamos la adhesión de los parásitos al epitelio intestinal. Observamos que la sobreexpresión de TcSMUGL aumenta los niveles de adhesión del parásito al epitelio intestinal en comparación con las otras cepas transgénicas y la cepa control (Figura 3)

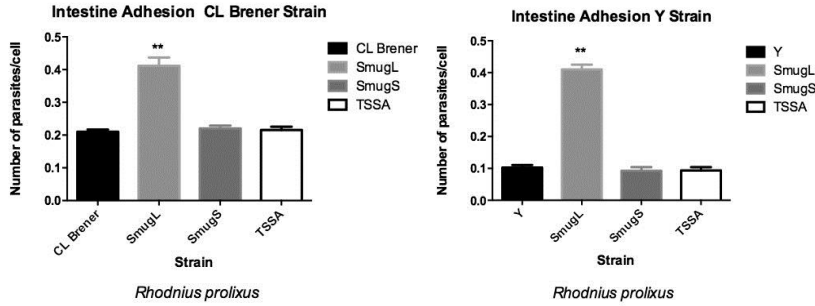


Figura 3 : Ensayos de Adhesion in vitro. Epimastigotes de *T. cruzi* serán lavados y resuspendidos en medio BHI a una densidad de  $2,5 \times 10^7$  cel/ml. 200 ul de esta suspensión de parásitos serán mezclados con secciones posteriores del intestino de *R. prolixus* e incubados 30 minutos a 25 C. Luego de la incubación se contaron el número de parásitos adheridos. En cada caso se tomaran 100 campos elegidos al azar y se realizaran 10 muestras independientes por cada línea transgénica de parásitos.

### Ensayos de lisis ex vivo

Los ensayos de lisis ex vivo demostraron que las mucinas estarían cumpliendo una función de protección contra los contenidos estomacales presentes en el insecto vector. Observamos también que los componentes estomacales de *R. prolixus* tienen un efecto letal contra el parásito mayor que *Triatoma infestans* indicando que existen diferencias entre las distintas especies de insectos (Figura 4).

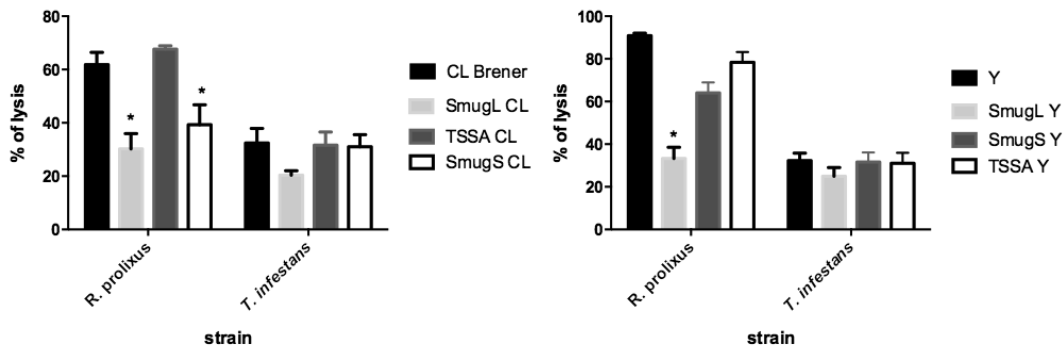


Figura 4 : Ensayos de lisis ex vivo: se incubaran  $2 \times 10^5$  epimastigotes de *T. cruzi*. Luego de 30 minutos se contaron el número de parásitos motiles bajo microscopio óptico y cámara de Neubauer. En cada caso se calculó el porcentaje de lisis. Cada experimento se realizó por triplicado.

### Conclusiones:

Los resultados obtenidos sugieren que las mucinas estarían involucradas en el establecimiento de la infección en el hospedador invertebrado. Por un lado estarían protegiendo al parásito de las condiciones adversas que enfrenta al ingresar al tracto

digestivo del insecto. Por otra parte la familia de mucinas de TcSMUGL estarían involucradas en la adhesión del parasito al epitelio intestinal del insecto, paso esencial para establecer la infección.