

¿MODIFICACIONES EN GIROS L4 Y L6 DE *CHAGASINA* AFECTAN SU ACTIVIDAD INHIBITORIA?

Yasmin Irene Rodríguez Gavaldón, Edgar Ezequiel Nava Pintor, Claudia Ivonne Flores Pucheta, Yosehandy Palma Leal, Gerardo Reséndiz Cardiel, Jaime Ortega López.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Ciudad de México CP 07360, e-mail: yaasrdz@hotmail.com

Palabras clave: Trypanosoma cruzi, Chagasina, Andamio Molecular

Introducción. La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad puede ocasionar fallas cardiacas en estadios crónicos y es un problema de salud pública de magnitud global (1). Actualmente se buscan nuevas alternativas terapéuticas basadas en vacunas de proteínas recombinantes debido a la baja eficacia que ha presentado el tratamiento farmacológico en etapas crónicas. Ensayos en modelos murinos y caninos han demostrado que el antígeno TSA-1 es buen candidato para el desarrollo de estas vacunas. La producción heteróloga de TSA-1 es eficiente en *E. coli* pero se expresa en agregados de proteína mal plegada como cuerpos de inclusión (2). Como alternativa para evitar la etapa de replegamiento se propuso usar un andamio molecular para generar proteínas quiméricas que incluyan los epítomos de TSA-1 y que se expresen en forma soluble. La chagasina, un inhibidor de la de cisteína proteinasas (CP), es un factor de virulencia de *T. cruzi* y se expresa en forma soluble en *E. coli* (3). En estudios previos se generaron quimeras de la chagasina incorporando epítomos de TSA-1 en los giros L4 y L6. Se sabe que los residuos conservados de L6 interactúan con las CP y contribuyen a la inhibición de alta afinidad (4).

El objetivo de este estudio es determinar el efecto de las modificaciones en la secuencia de los giros L4 y L6 de Chagasina en la actividad inhibitoria de CP.

Metodología.

Producción y purificación. La Chagasina y la quimera Q8 se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) en medio LB. La inducción se llevó a cabo 25°C durante 6 h adicionando IPTG. La biomasa resultante se recuperó por centrifugación, se lisó y las proteínas recombinantes se purificaron de la fracción soluble por cromatografía de afinidad a níquel usando un sistema de cromatografía NGC (Bio-Rad). Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 15% y se colectaron las correspondientes a la Chagasina y Q8 purificadas.

Inhibición de la actividad enzimática. La actividad inhibitoria de la Chagasina y la Q8 se determinó usando extracto de CP de *Trichomonas vaginalis* y un sustrato fluorogénico específico para CP tipo catepsina (Z-Phe-Arg-MCA).

Resultados.

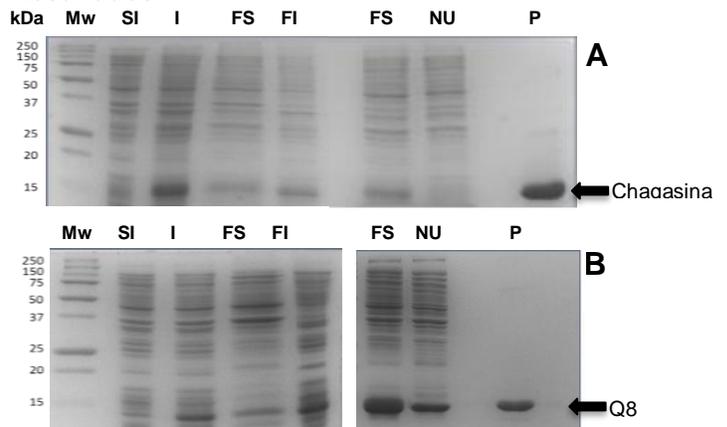


Fig. 1. Purificación de la Chagasina y la Quimera Q8 recombinantes. Expresión y Purificación de **A)** Chagasina **B)** Quimera Q8 (SI: sin inducir, I: inducido, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble, NU: no unida, P: purificada).

En la Fig. 1 se muestran el perfil electroforético de expresión y purificación de las proteínas recombinantes. Ambas proteínas se expresaron mayoritariamente en la fracción soluble y se purificaron con un solo paso de cromatografía de afinidad. Los ensayos preliminares de inhibición mostraron una disminución en la actividad inhibitoria de la Chagasina al modificar la secuencia de los giros L4 y L6.

Conclusiones. La expresión de la quimera Q8 en forma soluble indica que la Chagasina puede usarse como andamio molecular para expresar los epítomos de TSA-1.

Agradecimientos. Por el apoyo para la realización de este trabajo a CINVESTAV y CONACyT; donativo INFR-2016-269657 a JOL y becas 721653 a YIRG y 784949 a EENP para estudios de maestría y a la Fundación Carlos Slim.

Bibliografía.

- Burleigh B & Soldati D. (2008) Molecular Mechanisms of Parasite Invasion: *Subcellular Biochemistry*, Vol.4. Springer, USA. Pp 142-143.
- De la Cruz, J., Villanueva, L., Ortega, J., Bottazzi, M., Hotez, P., & Dumonteil, E. (2018). *Hum Vaccin Immunother.* 8:1-2.
- Reis, F *et al.* (2008). *FEBS Lett.* 4-3
- Miao, Q *et al.* (2014). *Am J Pathol.* 184: 1-3.