

## Relación entre cambios en la expresión de proteasas y metacicloogénesis espontánea asociadas a las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio.

Yhol Ledezma<sup>1</sup>, María Ledezma<sup>1</sup>, Marlyn León<sup>1</sup>, Wilmer Pineda<sup>1</sup>, Rosa Arteaga<sup>1</sup>, María C. Navarro<sup>1</sup>, Víctor Contreras<sup>1</sup>, Ana Rita De Lima<sup>1,2,\*</sup>

### RESUMEN

La metacicloogénesis de *Trypanosoma cruzi* es la transformación del estadio epimastigota en tripomastigota metacíclica que ocurre en la ampolla rectal del insecto vector. Durante este proceso se ha implicado una activación del metabolismo proteico, con probable participación de proteasas en la degradación de proteínas del parásito. En el presente trabajo se determinó el efecto de las condiciones de mantenimiento de *T. cruzi* en el laboratorio sobre la actividad de proteasas y su relación sobre la metacicloogénesis espontánea en cultivos axénicos. Se trabajó con el clon Dm30L de *Trypanosoma cruzi* mantenido en el laboratorio mediante pases trimestrales chipo-ratón (condición triatomino: CT) o repiques semanales durante 15 años en medio LITB (condición cultivo: CC). En ambas condiciones, se hizo curva de crecimiento durante 30 días en medio LITB suplementado con 10, 24 y 48 mM glucosa, calculándose el porcentaje de metacíclicos espontáneos y determinación de la actividad de proteasas. En 10 mM glucosa, parásitos de la CT presentaron mayor expresión de proteasas y porcentaje de metacíclicos respecto a la CC. En la CT, el crecimiento en 48 mM glucosa redujo las variables antes mencionadas, mientras que no se evidenció actividad proteolítica ni metacicloogénesis espontánea en parásitos de la CC en altas concentraciones de glucosa. En todos los casos se evidenció mayor actividad de cistein proteasas durante la fase estacionaria del cultivo. No se reportó actividades metaloproteasas en ninguna de las condiciones estudiadas, pero sí en el clon Dm28c utilizado como control de la expresión de este tipo de enzima. Estos resultados sugieren que la expresión de proteasas está influenciada por la constitución genética del parásito y que la CC provoca disminución de la actividad proteolítica que persisten aún en condiciones de agotamiento de carbohidratos del medio, con una concomitante reducción significativa en el porcentaje de metacíclicos espontáneos.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, proteasas, metacicloogénesis

### ABSTRACT

**Relationship between changes in the expression of proteases and spontaneous metacyclogenesis associated to *Trypanosoma cruzi* maintenance conditions in the laboratory.**

*Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis is the transformation of epimastigote stage to trypomastigote metacyclic that happens in the rectal ampulla of the insect vector. During this process it has been implicated protein metabolism activation, with proteases likely involvement in parasite protein degradation. In this study we determined the effect of *T. cruzi* keeping conditions in the laboratory on the activity of proteases and their relationship on spontaneous metacyclogenesis in axenic culture. We worked with *Trypanosoma cruzi* Dm30L clone maintained in the laboratory by quarterly passes triatomine-mouse (triatomine condition: TC) or serial culture media during 15 years in LITB medium (culture condition: CC). In both conditions, growth curve was made for 30 days in LITB medium supplemented with 10, 24 and 48 mM glucose, calculating the percentage of spontaneous metacyclics and determining proteases activity. In 10 mM glucose, TC parasites showed higher expression of proteases and metacyclic percentage relative to the CC. In TC, the growth in 48 mM glucose reduced the above variables, while no evidenced proteolytic activity nor spontaneous metacyclogenesis on CC parasites in high glucose concentrations. In all cases there was greater cysteine proteases activity during the stationary phase of the culture. Metalloprotease activity was not reported in any of the conditions studied, but it was detected in clone Dm28c used as control of expression of this type of enzyme. These results suggest that the expression of proteases is influenced by the genetic makeup of the parasite and the CC causes decrease of proteolytic activity which persists even in carbohydrate depleted conditions of the medium, with a concomitant significant reduction in the percentage of spontaneous metacyclics.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, proteases, metacyclogenesis

### INTRODUCCION

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos y ejecutan un amplio espectro de reacciones biológicas, implicándose su participación en la patogénesis de enfermedades parasitarias. *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito protozoario que presenta alternancia morfológica y completa su ciclo evolutivo en dos hospedadores: un invertebrado representado por insectos hematófagos o triatominos y un hospedador vertebrado que abarca a los mamíferos, incluyendo al hombre. Existen cuatro estadios del parásito: epimastigotas y tripomastigotas metacíclicas en el insecto vector, así como tripomastigotas sanguíneas y

<sup>1</sup> Laboratorio de Protozoología. Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.

<sup>2</sup> Departamento de Morfofisiopatología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo

**Correspondencia:** Ana Rita De Lima.

**E-mail:** delima.anarita@gmail.com

amastigotas en el hospedador vertebrado, estos últimos de localización intracelular.

Se ha descrito la existencia de una gran variedad de enzimas proteolíticas en *T. cruzi*, siendo algunas comunes en diferentes estadios, en tanto que otras son diferencialmente reguladas. La mayoría corresponden a cistein proteasas y presentan una alta homología entre los diferentes aislados del parásito, tales como la cruzipaína (1-4), otras presentes en epimastigotas con movilidad relativa de 30 kDa (5) y 120 kDa (6). Adicionalmente se ha detectado la presencia de metaloproteasas como una de 60 kDa presente en epimastigotas (7), una de 52 kDa común a epimastigotas y metacíclicos (3) y algunas específicas de metacíclicos, tales como una enzima de 65 kDa (3) y 116 kDa (8). Por otro lado, se han reportado varias metaloproteasas en metacíclicos que migran entre 52 y 65 kDa, los cuales muestran una alta heterogeneidad según la cepa o clon de *T. cruzi* empleado (9). También se ha reportado la aparición de una serín proteinasa de 120 kDa con pH óptimo alcalino presente en epimastigotas y metacíclicos (10) y otra de 75 kDa (11). Recientemente se identificaron dos aspartil proteasas conocidas como cruzipsina-I y cruzipsina-II (12). Además de proteasas constitutivamente expresadas por el parásito, se ha demostrado la secreción de enzimas proteolíticas tipo cisteína compatible con cruzipaína (13) y metaloproteinasas de matriz extracelular conocidas como MMP-9 (14).

Durante el crecimiento de *T. cruzi* en medios de cultivo axénico, epimastigotas de fase estacionaria muestran un perfil proteolítico más complejo con respecto a la fase exponencial, caracterizado por aparición de enzimas tipo cisteína de alto peso molecular, así como una mayor actividad de la cruzipaína (15), lo cual pudiera coincidir con la sobrevivencia del parásito durante esta etapa a expensas de un metabolismo proteolítico, con agotamiento de los carbohidratos del medio.

Se ha reportado la aparición de tripomastigotas metacíclicos durante la fase estacionaria de cultivos de epimastigotas en el laboratorio, fenómeno conocido como metacicloogénesis espontánea (16). Se ha propuesto varios factores que inducen este proceso como osmolaridad (17) y agotamiento de nutrientes en el medio (18).

Basado en la hipótesis del estrés nutricional, se ha desarrollado un medio químicamente definido que simula la orina del triatomino conocido como TAU (Triatomine Artificial Urine) suplementado con Prolina, Glutamato, Aspartato y bajas concentraciones de glucosa (TAU3AAG). En este medio se logra el proceso de diferenciación en ausencia de replicación, obteniéndose un porcentaje significativamente mayor de metacíclicos con respecto a los obtenidos en cultivos envejecidos, conociéndosele como metacicloogénesis inducida (19). Se ha demostrado la activación diferencial de proteasas durante la metacicloogénesis en el medio TAU3AAG, así como inhibición de este proceso mediante la adición de inhibidores de proteasas (3).

Previamente demostramos que la metacicloogénesis espontánea coincide con el agotamiento de la glucosa del medio y posterior aumento en la liberación de amoníaco al medio de cultivo (20), sugiriendo un cambio de metabolismo glicolítico a proteico en *T. cruzi*, con probable participación de enzimas proteolíticas durante este proceso. En un mismo aislado, el esquema de mantenimiento en el laboratorio también afectaba el porcentaje de metacíclicos espontáneos; el pasaje alternado de *T. cruzi* en chipo-ratón (condición triatomino) era capaz de preservar la competencia del parásito para la metacicloogénesis.

Mientras que parásitos mantenidos mediante repiques semanales por varios años consecutivos en medio LITB (condición cultivo) bloqueaba la aparición de metacíclicos espontáneos y reducía significativamente los metacíclicos inducidos en el medio TAU3AAG (21). No obstante, el cultivo de aislados de *T. cruzi* mantenidos bajo la condición cultivo en medio LITB con bajas concentraciones de glucosa, restituía la capacidad metacicloogénica del parásito, incrementando el porcentaje de metacíclicos tanto espontáneos como inducidos (20). Esto pudiera sugerir que la capacidad metacicloogénica del parásito está asociada a la utilización de proteínas como fuente de energía.

En apoyo a esta idea, se ha demostrado la existencia en el epimastigota de organelas denominadas reservosomas, y que éstas desaparecen durante la metacicloogénesis, con utilización de proteínas almacenadas a este nivel (22), con probable participación de proteasas en la escisión de esas proteínas para generar aminoácidos que ingresen al ciclo de Krebs.

En este artículo se demuestra cambios en la expresión de proteasas asociadas a los niveles de glucosa y a las condiciones de mantenimiento del parásito en el laboratorio, con una posible participación de estas enzimas en la metacicloogénesis espontánea de *Trypanosoma cruzi*.

## MATERIALES Y METODOS

**Parásitos, condiciones de mantenimiento y curva de crecimiento.** Se utilizó el clon Dm30L de *Trypanosoma cruzi* aislado de rabipelado, mantenido mediante pasajes alternos triatomino-ratón (condición triatomino) o mediante repiques semanales durante 15 años consecutivos en medio axénico (LITB) a 27° C (condición cultivo) (21). Los parásitos fueron cultivados en medio LITB (23). Para la determinación de la curva de crecimiento, los parásitos fueron cultivados en frascos Erlenmeyer de 125 mL partiendo de un inóculo inicial de  $2 \times 10^6$  parásitos/mL en un volumen final de 20 mL de medio de cultivo en presencia de 10, 24 y 48 mM glucosa.

Los diferentes puntos de la curva se realizaron por triplicado. Se realizó el conteo de los parásitos en cámara de Neubauer y se calculó el porcentaje de tripomastigotas metacíclicos en láminas fijadas coloreadas con Giemsa. Por cada lámina se contaron al menos 300 parásitos.

**Metacicloogénesis inducida de *Trypanosoma cruzi*.**

Epimastigotas procedentes de final de fase exponencial en medio LITB suplementado con diferentes concentraciones de glucosa (10 y 48 mM) fueron sedimentados mediante centrifugación a 8500 g y resuspendidos con un inóculo de  $5 \times 10^7$  parásitos/mL en frascos Roux utilizando un volumen final de 70 mL del medio TAU3AAG (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato, 2 mM L-aspartato, 10 mM glucosa y 8 mM tampón fosfato pH 6.0) (19). Los parásitos se incubaron a 27° C durante 96 horas. Cada ensayo de inducción fue realizado por triplicado. Se determinó el porcentaje de tripomastigotas metacíclicos al cuarto día de incubación mediante recuento diferencial en láminas fijadas coloreadas con Giemsa.

Para la obtención de tripomastigotas metacíclicos purificados, parásitos procedentes del cuarto día de incubación en el medio TAU3AAG fueron sedimentados a 8500 g, resuspendidos en medio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM tampón fosfato pH 6.0) y tratados con suero fresco de cobayo durante 30 minutos a 37° C y purificados a través de una columna de DEAE-celulosa (24).

**Determinación de la actividad proteolítica.** La actividad proteolítica se caracterizó mediante electroforesis en minigeles SDS-poliacrilamida al 10% (25) utilizando como sustrato gelatina a una concentración final de 0,1% (Sigma, G-8150). Para la preparación de las muestras a cargar en el gel, masas de  $2 \times 10^8$  epimastigotas correspondientes a diferentes días de la curva de crecimiento se resuspendieron en 100 µl de tampón de lisis (187,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS) y se agitaron en vortex durante 15 segundos en baño de hielo. El homogenato obtenido se sedimentó a 14000 g (3 min, 4° C) en microcentrifuga Eppendorf y se tomó 10 µl del sobrenadante, al cual se le añadió 5 µl de tampón de muestra no desnaturante.

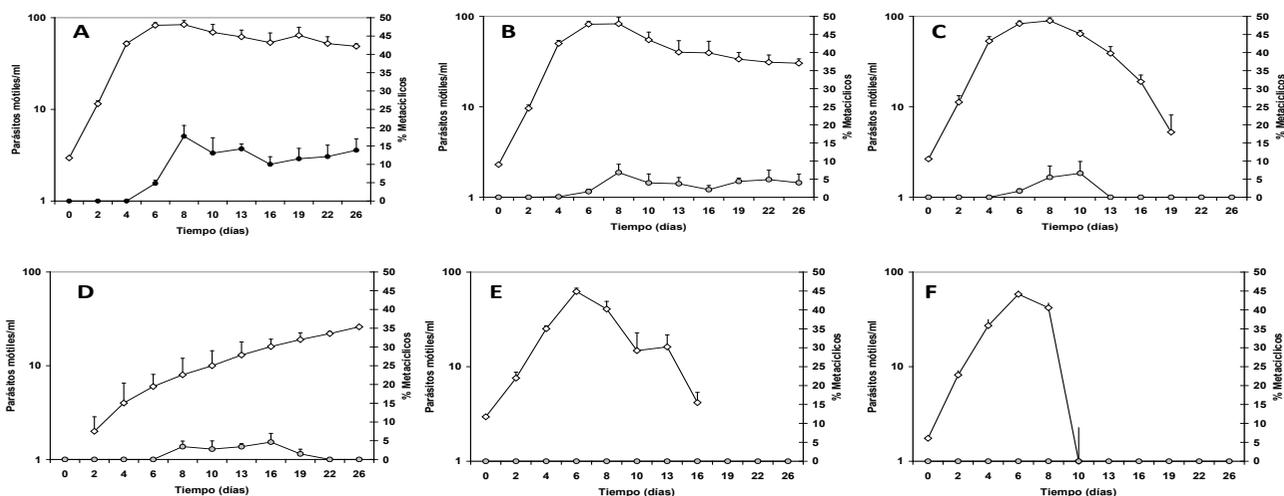
La separación electroforética se realizó a corriente constante a 4° C con una corriente constante de 10 mAmp. Una vez concluida la corrida electroforética, los geles se desmontaron y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en 10 volúmenes de tampón 100 mM Tris-HCl pH 7.0 suplementado con 2,5% de Tritón X-100. Para revelar la actividad proteolítica total y cisteín proteasas los geles se incubaron en tampón de digestión (100 mM Tris-HCl pH 7.0, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM ZnCl<sub>2</sub>, 250 mM cisteína) en ausencia o presencia de inhibidores de metaloproteasas (1 mM 1.10 fenantrolina, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA). Para la visualización de metaloproteasas se empleó el mismo tampón de digestión sin adición de cisteína y suplementado con inhibidores de cisteín proteasas [10 µM trans-epoxy succinil-L-leucilamido (4 guanidino)-butano (E-64), 100 µM N $\alpha$ -p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), 100 µM N $\alpha$ -tosil-L-cloro lisina metil cetona (TLCK)]. Las condiciones de revelado se hicieron a 37° C durante 12 horas (para visualización de actividad proteolítica total y cisteín proteasas) ó 96 horas (metaloproteasas). En todos

los casos los geles fueron teñidos con 0.25% Coomassie Blue R-250 en metanol 50%-Acido acético 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se decoloraron en el mismo solvente.

**Análisis densitométrico.** La comparación de los perfiles y la determinación de la movilidad relativa de las bandas obtenidas se realizaron mediante densitometría utilizando un escáner BIORAD Modelo GPS-670 y los valores se calcularon con el programa Multy-Analyst versión 3.0 (BIORAD) considerando su migración respecto a los marcadores de movilidad relativa colocados en cada gel.

**RESULTADOS**

Para establecer el efecto de las concentraciones de glucosa sobre el crecimiento y diferenciación de *T. cruzi* (metacicloogénesis espontánea) se procedió al cultivo del parásito en presencia de baja (10 mM) y alta (48 mM) concentración de glucosa con respecto a la condición control empleada en la formulación del medio LITB en la mayoría de los laboratorios (24 mM glucosa). Se empleó el clon Dm30L (aislado de *Didelphis marsupialis*) mantenido en el laboratorio simultáneamente bajo dos esquemas de mantenimiento: mantenimiento mediante pases trimestrales chipo-ratón (condición triatomino) o mediante cultivo prolongado en medio LITB (condición cultivo). Para ello se elaboraron curvas de crecimiento (por triplicado) partiendo de un inóculo inicial de  $2 \times 10^6$  parásitos/mL según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos (Figura 1). Tomando como referencia la condición control 24 mM glucosa, en parásitos mantenidos bajo la condición triatomino, puede apreciarse que los niveles de glucosa tuvieron poco efecto sobre la fase exponencial con respecto a la condición cultivo (comparar figuras 1B y 1E), pero sí se evidenciaron cambios a nivel de la fase estacionaria, la cual se alarga en la condición triatomino (Figura 1B) y desaparece en la condición cultivo (Figura 1E). En parásitos de la condición triatomino, la reducción de los niveles de glucosa a 10 mM no tuvo un efecto significativo sobre las fases exponencial y estacionaria (comparar figuras 1A y 1B). Igual comportamiento se registra cuando se incrementó la concentración de glucosa a 48 mM, donde se mantuvo la fase exponencial, pero se reduce la fase estacionaria, iniciándose una caída en el número de parásitos móviles a partir del día 10 de la curva (Figura 1C). En parásitos de la condición cultivo, el descenso de glucosa en el medio LITB a 10 mM permitió un incremento menos acentuado de la población de parásitos, en donde no se observa una fase exponencial típica, sino un crecimiento en etapas de la población de epimastigotas (Figura 1D). Por otro lado, en la condición 48 mM glucosa, se observa desaparición de la fase estacionaria y muerte abrupta de los parásitos (Figura 1F). En la Tabla 1 se muestra que el tiempo de generación de los parásitos no experimentó cambios significativos asociados a los niveles de glucosa en el medio LITB, pero sí hubo modificaciones asociadas a la condición de mantenimiento del parásito.



**Figura 1.** Curvas de crecimiento del clon Dm30L de *Trypanosoma cruzi* mantenida bajo las condiciones triatomino (A, B, C) y cultivo (D, E, F) en medio LITB suplementado con 10 mM (A, D), 24 mM (B, E) y 48 mM glucosa (C, F). El eje de la ordenada izquierda representa el recuento de parásitos vivos ( $\diamond$ ) y la escala derecha muestra el porcentaje de metacíclicos espontáneos ( $\circ$ ). Los puntos representan la media y las barras la desviación estándar de al menos tres ensayos experimentales.

**Tabla 1.** Tiempo de generación del aislado Dm30L de *T. cruzi* mantenido bajo diferentes esquemas de mantenimiento y cultivados en medio LITB con diferentes concentraciones de glucosa

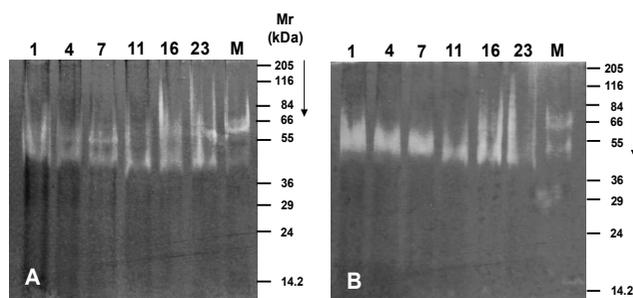
Concentración de glucosa (mM) <sup>2</sup>	TG <sub>1/2</sub> (horas) <sup>1</sup>	
	Condición de Mantenimiento	
	Triatomino	Cultivo
10	22,3 ± 1,0	28,1 ± 0,2
24	20,2 ± 0,1	27,7 ± 2,0
48	21,3 ± 0,9	27,8 ± 1,1

<sup>1</sup>Tiempo de generación. <sup>2</sup>Parásitos incubados en medio LITB suplementado con 10, 24 y 48 mM glucosa. Valores representados como la media ± DS de tres experimentos.

Para establecer los efectos de la glucosa sobre la diferenciación de *T. cruzi*, se calculó el porcentaje de metacíclicos espontáneos a diferentes días de la curva de crecimiento. Tomando como punto de referencia la condición control (24 mM), se observa que los parásitos mantenidos bajo la condición cultivo (Figura 1E) pierden la capacidad diferenciante con respecto a aquellos mantenidos bajo pases alternos triatomino-ratón (Figura 1B). Sin embargo, en los parásitos cultivados en 10 mM glucosa y mantenidos bajo la condición cultivo se restituyó la aparición de metacíclicos espontáneos (Figura 1D), así como un mayor incremento en el porcentaje de metacíclicos espontáneos en la condición triatomino (Figura 1A). En la condición 48 mM glucosa hubo una caída en el porcentaje de metacíclicos en parásitos mantenidos bajo la condición triatomino (Figura 1C), con bloqueo de la metaciclogénesis en la condición cultivo (Figura 1F).

Con el objeto de asociar los cambios en la capacidad metaciclogénica con la expresión de proteasas, se obtuvo el perfil proteolítico de los parásitos cultivados en medio LITB con diferentes concentraciones de glucosa. En la figura 2 se muestra la actividad de proteasas de epimastigotas del clon Dm30L mantenido bajo la condición triatomino durante la fase de crecimiento en medio LITB empleando 10 mM glucosa.

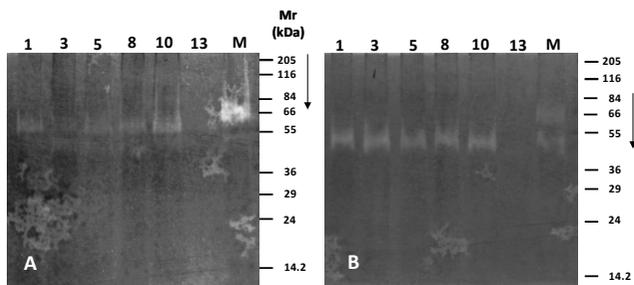
En ausencia de inhibidores de proteasas, los epimastigotas del día 1 muestran dos bandas de 60 y 55 kDa (Figura 2A, canal 1). Entre los días 4 a 7 se registran tres actividades proteolíticas: dos de 60 y 55 kDa comunes al día 1, y otra de 45 kDa. Entre los días 11 y 23 se observa una mayor intensificación de la banda de 60 kDa, y la aparición de una banda de 40 kDa. Es de hacer notar que este último perfil coincide con la expresión de proteasas de metacíclicos purificados obtenidos a partir de medio TAU3AAG (Figura 2A, canal M). En presencia de inhibidores de metaloproteasas, se obtuvo un patrón de proteasas similar a la condición sin inhibidores, indicando que las actividades registradas pueden clasificarse como cisteín proteasas (figura 2B), mientras que no se logró detectar la expresión de metaloproteasas bajo las condiciones ensayadas (resultados no mostrados).



**Figura 2.** Perfil proteolítico en gel SDS-PAGE 10% durante la curva de crecimiento de epimastigotas del clon Dm30L de *T. cruzi* mantenido bajo la condición triatomino ( $2 \times 10^8$  parásitos/canal) en presencia de 10 mM glucosa empleando como sustrato gelatina (0,1%) en ausencia (A) y presencia (B) de inhibidores de metaloproteasas coloreado con Azul de Coomassie. Los números en la parte superior de cada canal corresponden al día de la curva de crecimiento y M a metacíclicos purificados. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en Kilodaltons (kDa).

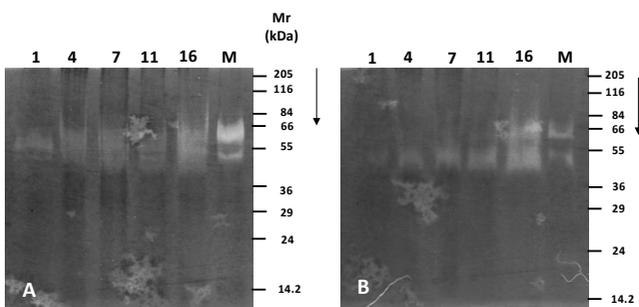
Cuando el mismo clon Dm30L mantenido bajo la condición triatomino fue crecido en medio LIT 48 mM glucosa, se registró una significativa disminución de las actividades proteolíticas tanto totales (Figura 3A) como de cisteín proteasas (Figura 3B), no identificándose nuevamente actividad de metaloproteasas (resultados no mostrados).

Es de hacer notar que en este caso sólo se registró una actividad proteolítica difusa entre 60 y 55 kDa entre los días 1 y 13 de la curva de crecimiento, así como una banda de 65 kDa en metacíclicos purificados del medio TAU3AAG (Figura 3A, canal M).



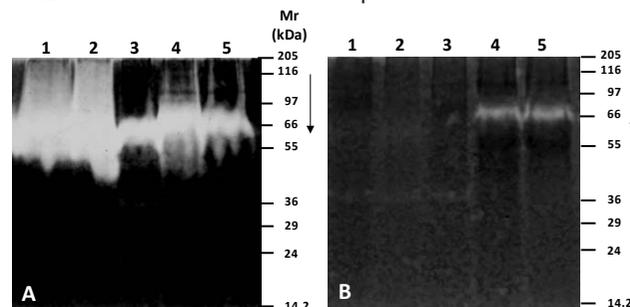
**Figura 3.** Perfil proteolítico en gel SDS-PAGE 10% durante la curva de crecimiento de epimastigotas del clon Dm30L de *T. cruzi* mantenido bajo la condición triatomino ( $2 \times 10^8$  parásitos/canal) en presencia de 48 mM glucosa empleando como sustrato gelatina (0,1%) en ausencia (A) y presencia (B) de inhibidores de metaloproteasas coloreado con Azul de Coomassie. Los números en la parte superior de cada canal corresponden al día de la curva de crecimiento y M a metacíclicos purificados. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en Kilodaltons (kDa).

Cuando el clon Dm30L mantenido bajo la condición cultivo fue crecido en medio LITB suplementado con 10 mM glucosa, se registra en el día 1 de la curva una actividad proteolítica difusa y débil entre 60 y 55 kDa, la cual se mantiene y se intensifica un poco hasta el día 16 de la curva (Figura 4A). Entre los días 4 y 16 aparece una nueva banda de 40 kDa cuya expresión se eleva ligeramente hacia el día 16. Los metacíclicos purificados a partir del medio TAU3AAG muestran un patrón electroforético de actividades proteolíticas de 60 y 52 kDa (Figura 4A, canal M). Todas estas actividades fueron clasificadas como cisteín proteasas (Figura 4B), mientras que al igual que en los casos anteriores, no se detectaron metaloproteasas (resultados no mostrados). Cuando se evaluó el perfil de proteasas de los parásitos mantenidos bajo la condición cultivo y crecidos en 48 mM glucosa, no se registró ningún tipo de actividad proteolítica (resultados no mostrados).



**Figura 4.** Perfil proteolítico en gel SDS-PAGE 10% durante la curva de crecimiento de epimastigotas del clon Dm30L de *T. cruzi* mantenido bajo la condición cultivo ( $2 \times 10^8$  parásitos/canal) en presencia de 10 mM glucosa empleando como sustrato gelatina (0,1%) en ausencia (A) y presencia (B) de inhibidores de metaloproteasas coloreado con Azul de Coomassie. Los números en la parte superior de cada canal corresponden al día de la curva de crecimiento y M a metacíclicos purificados. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en Kilodaltons (kDa).

Habiéndose establecido previamente que los tripomastigotas metacíclicos expresan actividades tipo metaloproteasas (3, 9) y que éstas pueden utilizarse como marcadores de diferenciación, se decidió determinar por qué no se logró la identificación de metaloproteasas en el clon estudiado en este proyecto, ni siquiera en metacíclicos purificados inducidos in vitro. Para ello se procedió a determinar la actividad proteolítica de epimastigotas y metacíclicos inducidos en medio TAU3AAG purificados mediante cromatografía procedentes de medio LITB 24 mM glucosa utilizando diferentes aislados del parásito.



**Figura 5.** Perfil proteolítico en gel SDS-PAGE 10% de diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi* ( $2 \times 10^8$  parásitos/canal) en ausencia (A) y presencia (B) de inhibidores de cisteín proteasas coloreado con Azul de Coomassie. Canales 1 y 2 (epimastigotas fase exponencial y estacionaria de EP triatomino, respectivamente). Canal 3 (metacíclicos purificados del clon Dm30L triatomino). Canales 4 y 5 (epimastigotas y metacíclicos del clon Dm28c). Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kilodaltons (kDa).

La Figura 5A muestra la actividad proteolítica de epimastigotas y metacíclicos de diferentes aislados de *T. cruzi* crecidos durante 6 días en medio LITB 24 mM glucosa empleando gelatina como sustrato exógeno y revelada en ausencia de inhibidores de proteasas. Se evidencia una intensa actividad proteolítica en epimastigotas tanto en la cepa EP como en el clon Dm28c (canal 4). En la cepa EP, la intensidad del revelado no permitió la identificación de bandas individuales (canales 1 y 2) mientras que en el clon Dm28c se registra cuatro bandas de 57 kDa, una banda difusa entre 60 y 70 kDa, 97 y 116 kDa. Por su parte, los tripomastigotas metacíclicos expresan una actividad proteolítica de 65 kDa siendo más intensa en la cepa EP respecto al clon Dm28c.

La Figura 5B corresponde a los resultados obtenidos cuando los diferentes estadios y aislados descritos anteriormente se incubaron en presencia de inhibidores de cisteín proteasas. En este caso se observó actividad proteolítica de 65 kDa, solamente en el clon Dm28c independientemente del estadio utilizado. Esta actividad corresponde a metaloproteasas y nos permite corroborar que el tampón y las condiciones de incubación utilizados en el presente estudio permiten la identificación de este tipo de enzimas. Los resultados presentados en la Figura 5 indican que en *T. cruzi* la expresión de metaloproteasas está asociada al aislado empleado y que la actividad de cisteín proteasas se expresa diferencialmente entre múltiples aislados y estadios del parásito. Esto explica la ausencia de actividad de metaloproteasas en las zimografías empleadas en este estudio.

## DISCUSION

Nuestros resultados indican que las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio son capaces de provocar alteraciones en las propiedades biológicas del parásito, entre ellas el tiempo de replicación de epimastigotas, así como la capacidad de experimentar metaciclógenesis espontánea en medios de cultivo axénicos (Figura 1 y Tabla 1). Previamente demostramos que cuando *T. cruzi* es mantenido en el laboratorio simulando el ciclo de vida en la naturaleza, es decir, mediante pases alternos entre triatomino y ratón albino, se preservan propiedades biológicas del parásito, tales como la metaciclógenesis (20), así como la virulencia del parásito (21). Todo parece indicar que el cultivo prolongado por más de 15 años de aislados del parásito mediante repiques semanales en medio LITB sin pases en vector ni triatomino provoca cambios en la expresión génica no solo de cepas, sino también en poblaciones de parásitos genéticamente homogéneos como el clon Dm30L de *T. cruzi* (26).

Habiéndose demostrado mayor velocidad del consumo de glucosa en parásitos de un mismo aislado mantenido bajo la condición cultivo respecto a la condición triatomino (20), todo parece indicar que el repique prolongado en medio LITB conduce a una adaptación gradual del parásito a un medio de cultivo artefactual, con mayores niveles de glucosa a los que normalmente está expuesto en su ciclo evolutivo. Como es sabido, la metaciclógenesis ocurre normalmente en la ampolla rectal del triatomino, donde existe una orina extremadamente pobre en carbohidratos y con concentración nanomolar de aminoácidos. Esto plantea la hipótesis del estrés nutricional, donde el parásito recurre a la utilización de aminoácidos como fuente de energía. En efecto, se ha demostrado en los epimastigotas unas organelas ricas en proteínas denominadas reservosomas, las cuales desaparecen durante la metaciclógenesis y están ausentes en metacíclicos (27). Esto sugiere la degradación de estas proteínas para rendir aminoácidos como fuente de energía, con participación de proteasas del parásito.

Se ha descrito una amplia variedad de proteasas en *Trypanosoma cruzi*, principalmente de tipo cisteín proteasas, entre ellas la cruzipaina. Esta enzima presenta múltiples isoformas (28) de las cuales una fracción importante se localiza en los reservosomas (22) así como también en los lisosomas. Estas enzimas podrían jugar un papel importante en la degradación de proteínas del reservosoma tanto en la metaciclógenesis espontánea en medio LITB como inducida en el medio TAU3AAG.

Se ha demostrado incremento en la actividad de proteasas durante la fase estacionaria de epimastigotas en medio LITB (15), coincidiendo con la metaciclógenesis espontánea. Así como expresión diferencial y activación de proteasas durante la metaciclógenesis inducida en el medio TAU3AAG (3). En apoyo a la teoría de que la metaciclógenesis está asociado a la activación del metabolismo proteico del parásito, está reportado que inhibidores de proteasas (3, 29), así como el

uso de inhibidores del transporte de glucosa como ploreína (30) son capaces de bloquear o inducir la metaciclógenesis, respectivamente.

Habiéndose observado que parásitos mantenidos en cultivo presentan menor porcentaje tanto de metacíclicos espontáneos (Figura 1) como inducidos en TAU3AAG con respecto a parásitos mantenidos bajo la condición natural (20), quisimos evaluar la actividad de proteasas en un mismo aislado mantenido bajo idénticas condiciones (triatomino o cultivo) crecidos en medio LITB con equivalente concentración de glucosa. El medio LITB utilizado ampliamente en la mayoría de los laboratorios presenta en su formulación una concentración final de 24 mM glucosa (23). Estudios realizados en este medio estándar han demostrado que los epimastigotas presentan un metabolismo preferiblemente glicolítico, caracterizado por ausencia de regulación de las enzimas hexoquinasa y fosfofructoquinasa (31), y con metabolismo proteolítico basal muy bajo, que sólo se incrementa al agotarse completamente la glucosa (20). Por esta razón quisimos evaluar la actividad proteolítica cultivando parásitos del clon Dm30L mantenido en diferentes condiciones en el laboratorio en medios con baja (10 mM) y alta (48 mM) concentración de glucosa.

Se observa que cuando el clon Dm30L mantenido bajo la condición triatomino fue cultivado en 10 mM glucosa, se evidenció una actividad proteolítica en el día 1 que contempla básicamente dos cisteín proteasas de 60 y 55 kDa, las cuales se corresponden con otras previamente descritas en epimastigotas (15). A partir del cuarto día se evidencia intensificación de estas bandas y aparece una actividad de 45 kDa. A partir del día 11, que coincide con el agotamiento de los carbohidratos del medio (20), se registra activación de la banda de 60 kDa, probablemente la cruzipaina del parásito, así como una banda de 40 kDa que podría corresponder a la actividad proteolítica de igual movilidad relativa descrita en epimastigotas diferenciadas (3). Esta última actividad proteolítica coincide con el pico de metacíclicos espontáneos. A pesar de que en el día 15 sólo se registra un 13% de tripomastigotas metacíclicos (figura 1A), el recuento diferencial indica que tenemos una mezcla de epimastigotas, metacíclicos y formas en diferenciación que aún no ha completado su transformación hacia metacíclicos. De hecho, es posible que los epimastigotas expresen un perfil de metacíclicos sin experimentar la transformación morfológica (32). En apoyo a esta idea, metacíclicos purificados de medio TAU3AAG utilizados como control de la expresión de proteasas de ese estadio muestran esas mismas dos bandas previamente descritas (Figura 2A, canal M).

Cuando el mismo aislado mantenido bajo la condición triatomino fue cultivado en 48 mM glucosa, se registró no sólo una significativa reducción de la intensidad de la actividad proteolítica, sino también sólo se expresó una actividad difusa entre 60 y 55 kDa entre los días 1 y 13 de la curva, que pudiera corresponder a la cruzipaina del parásito

y la cual se intensificó entre los días 8 y 10, coincidiendo con la disminución de los carbohidratos del medio de cultivo (20). Esto sugiere que la actividad proteolítica pudiera estar regulada por una parte, a la expresión de estas enzimas, la cual a su vez está en función de los niveles de glucosa en el medio de cultivo.

Cuando se cultivó el clon Dm30L mantenido bajo la condición cultivo en medio LITB suplementado con 10 mM glucosa, ocurre diferencias cuantitativas y cualitativas en la expresión de proteasas, con visualización de una banda difusa entre de 60 y 55 kDa (día 1) con aparición a partir del cuarto día de una banda de 40 kDa. Aquí los metacíclicos purificados muestran un perfil compatible con los obtenidos con el mismo aislado cultivado en 10 mM de la condición triatomino.

Es importante destacar que aún cuando bajo estas condiciones se logra el agotamiento total de la glucosa en el medio de cultivo (previamente demostrado y publicado) (20), no se logró un incremento significativo de la actividad proteolítica, aún en la fase estacionaria de cultivo, la cual resultó ser comparable a la mostrada por el parásito de la condición triatomino en altas concentraciones de glucosa (Figura 3). Se plantea entonces la posibilidad de que la condición cultivo afecta la expresión de proteasas del parásito, hasta tal punto de que aún ante la ausencia total de carbohidratos, se evidencia una actividad basal que fue capaz de responder ante el estímulo del estrés nutricional. Por otro lado, cuando este mismo aislado mantenido bajo la misma condición cultivo fue crecido en 48 mM glucosa, no se evidenció ningún tipo de actividad proteolítica bajo las condiciones ensayadas (resultados no mostrados). Sabiendo que en este caso no hubo agotamiento de carbohidratos del medio (20), esto sugiere que existe un bloqueo en la expresión de estas enzimas que sólo se revierte ante la presencia de un estrés nutricional.

En vista de que no se logró detectar la expresión de metaloproteasas durante los ensayos, se decidió corroborar si esto era consecuencia de la metodología empleada o debido a la constitución genética del parásito. En la Figura 5A se evidencia que la expresión de proteasas totales fue mucho más acentuada en parásitos de los aislados EP y Dm28c mantenidos en la condición triatomino y cultivados en medio LITB con 24 mM glucosa con respecto al clon Dm30L, independientemente de su esquema de manutención en el laboratorio. Es de hacer notar la expresión de dos cisteín proteasas de 97 y 116 kDa en epimastigotas del clon Dm28c de *T. cruzi* (Figura 5A, canal 4) previamente descritas en epimastigotas de fase estacionaria (15). Sin embargo, sí se logró la detección de metaloproteasas en epimastigotas y metacíclicos del clon Dm28c, coincidiendo con resultados previos (9), indicando que la expresión de este tipo de proteasa varía en función del aislado empleado, y confirmando la ausencia de expresión de este tipo de enzima en el clon Dm30L.

A pesar de que se ha reportado la expresión de serín proteasas en *T. cruzi* (10, 11), no se identificó este tipo de

enzima en el presente trabajo. Esto es debido a la utilización de TLCK y TPCK en los tampones de digestión, los cuales inhiben tanto cisteín como serín proteasas. De la misma forma, no se realizó la identificación de aspartil proteasas en las condiciones de revelado de las actividades proteolíticas.

Los resultados presentados en el siguiente trabajo muestran que hay una expresión constitutiva de proteasas que varía en función del aislado de *Trypanosoma cruzi* y cuya actividad sufre cambios durante la curva de crecimiento de epimastigotas en medio LITB. No obstante, las condiciones de mantenimiento del parásito en el laboratorio afectan la expresión de enzimas proteolíticas.

Los resultados presentados en las figuras 2A y 4A parecen indicar que el cultivo prolongado de *Trypanosoma cruzi* durante más de 15 años bajo la condición cultivo, conduce a cambios en la expresión génica, evidenciadas por una menor expresión basal de proteasas del parásito.

Sabiendo que los epimastigotas poseen un metabolismo eminentemente glicolítico, esto parece indicar que existe un aumento en la expresión de estas proteínas en función de la concentración de carbohidratos del medio, explicando su mayor actividad en epimastigotas de fase estacionaria. Corroborando esta hipótesis, parásitos de la condición triatomino redujeron significativamente la actividad de proteasas cuando fueron cultivados en presencia de altas concentraciones de carbohidratos (comparar figuras 2 y 3).

Habiéndose registrado una asociación directa entre actividad de proteasas y la aparición de metacíclicos espontáneos, todo parece indicar la participación de estas enzimas en el proceso de diferenciación del parásito. En efecto, se ha demostrado que los parásitos de las cepas EP y el clon Dm28c, los cuales expresan mayor actividad proteolítica que el clon Dm30L mantenido bajo la misma condición triatomino, también presentan mayor porcentaje de metacíclicos espontáneos (20, 21). Por otro lado, el mantenimiento de la cepa EP bajo la condición cultivo no sólo condujo a una reducción significativa de la actividad proteolítica (resultados no mostrados), sino también condujo a una reducción significativa de la metaciclologénesis espontánea (20). En apoyo a esta idea, se ha demostrado que la transfección de *Trypanosoma cruzi* con múltiples copias de cruzipaina conducen a un aumento significativo de la metaciclologénesis en el parásito (33).

**AGRADECIMIENTO.** Al Sr. Johny Albanese por su apoyo en la infraestructura del laboratorio. Este trabajo se realizó con el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo a través de los proyectos CDCH-2010-001 y CDCH-AM-394-2010.

#### REFERENCIAS

1. Cazzulo JJ, Couso R, Raimondi A, Wernstedt C, Hellman U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1989; 33(1):33-41

2. Bontempi E, Martínez J, Cazzulo JJ. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 33(1):43-47
3. Bonaldo MC, D'Escofier LN, Salles J, Goldenberg S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp Parasitol* 1991; 73:44-51.
4. Martínez J, Cazzulo JJ. Anomalous electrophoretic behavior of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* in relation to its apparent molecular mass. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 95:225-230.
5. García MP, Nóbrega O, Teixeira ARL, Sousa MV, Santana JM. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 91:263-272.
6. Bongertz V, Hungerer KD. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of a protease. *Exp Parasitol* 1978; 45:8-18.
7. Greigh S, Ashall F. Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 39:31-38.
8. Duschak VG, Barboza M, García GA, Lammel EM, Couto AS, Isola EL. Novel cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitol* 2006; 132(3):345-355.
9. Lowndes CM, Bonaldo MC, Thomaz N, Goldenberg S. Heterogeneity of metalloprotease expression in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol* 1996; 112:393-399.
10. Burleigh BA, Caler EV, Webster P, Andrews N. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells. *J Cell Biol* 1997; 136(3):609-620.
11. da Silva-Lopez RE, Morgado-Díaz JA, dos Santos PT, Giovanni-De-Simone S. Purification and subcellular localization of a secreted 75 kDa *Trypanosoma cruzi* serine oligopeptidase. *Acta Trop* 2008; 107(2):159-167.
12. Pinho RT, Beltrami LM, Alves CR, De-Simone SG. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Parasitol* 2009; 122(2):128-133.
13. Yokoyama-Yasunaka JKU, Pral EMF, Oliveira OC, Alfieri SC, Stolf MS. *Trypanosoma cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. *Acta Tropica* 1994; 57:307-315.
14. Nogueira de Melo AC, de Souza EP, Elias CG, dos Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM, dos Reis FC, Costa TF, Lima AP, de Souza Pereira MC, Meirelles MN, Vermelho AB. Detection of matrix metalloproteinase-9-like proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2010; 125(3):256-263.
15. Pance A, Henríquez D. Changes in proteolytic activity during the growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Int* 1992; 27:613-623.
16. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1964; 6:93-100
17. Osuna A, Adroher FJ, Lupiáñez JA. Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Diff Develop* 1990; 30:89-95.
18. Cáceres O, Fernandes JF. (1976) Glucose metabolism, growth and differentiation of *T. cruzi*. *Rev Bras Biol* 1976; 36:397-410.
19. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 16(3):315-327.
20. De Lima AR, Navarro MC, Arteaga R, Contreras VT. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in low glucose axenic media shifts its competence to differentiate at metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2008; 119(3):336-342
21. Contreras VT, Araque W, Delgado VS. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis in vitro I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89(2):253-9.
22. Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(1):139-141.
23. Goitia-Aular M, Boisso, J F. Cultivo del *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. *Acta Cient Venezol* 1982; 33: 488-496.
24. De Souza, MA. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983; 78:317-333.
25. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
26. Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G. *Trypanosoma cruzi*: Maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93(6):753-760.
27. Soares MJ, Souto-Pradrón T, Bonaldo MC, Goldenberg S, de Souza W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1989; 75:522-527.
28. Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch ACC, Pettersson U, Cazzulo JJ. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 50:225-234.
29. Franke de Cazzulo BM, Martínez J, North MJ, Coombs GH, Cazzulo JJ. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 124:81-86.
30. Adroher FJ, Osuna A, Lupiáñez JA. Phloretin and citrate promote the differentiation rate from epimastigotes to metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 1992; 50:79-85.
31. Urbina JA, Crespo A. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. I. Hexokinase and phosphofructokinase. *Mol Biochem Parasitol*. 1984; 11:225-39.
32. Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 1985; 14(1):83-96.
33. Tomas AM, Miles MA, Kelly JM. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem* 1997; 244:596-603.