







Tesis de Maestría:

Caracterización de proteínas con repetidos ricos en Leucina (LRR) en *Trypanosoma cruzi* y su rol en el ciclo de vida del parásito

Fernanda Matto Camejo

Orientadora de tesis: Adriana Parodi Talice

Resumen

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, constituye un problema sanitario en Latinoamérica, siendo declarada por la Organización Mundial de la Salud como "enfermedad tropical desatendida". *T. cruzi* es capaz de invadir varios tipos celulares en el hospedero mamífero, desplegando diferentes moléculas y diversos mecanismos, muchos de los cuales aún se desconocen, asegurando su invasión y persistencia.

Buscando en la base de datos de su genoma hemos identificado 63 secuencias de proteínas con motivos repetidos ricos en Leucina (LRR), muchas de las cuales no presentan claras homologías con proteínas de mamíferos. La mayoría de dichas secuencias aparecen anotadas como hipotéticas lo que muestra la falta de estudio que existe sobre este grupo de proteínas en T. cruzi.

Las proteínas con LRR están presentes a lo largo de toda la escala evolutiva y se conoce que en otros organismos estas proteínas participan en importantes funciones tales como interacción célula-célula, transducción de señales, reordenamiento del citoesqueleto, señalización celular, entre otros. Constituyen factores de virulencia en varios organismos patógenos, haciéndolas así un blanco atractivo para su estudio. En este trabajo nos propusimos estudiar algunas de estas proteínas, en particular investigando su rol en el ciclo de vida de *T. cruzi*, y en la invasión y persistencia de la infección.

Mediante ensayos funcionales, hemos caracterizado dos de estas proteínas con motivos LRR de *T. cruzi*, denominadas TcCMF46 y TcPP1r. Para cada una se ha determinado, la influencia en el crecimiento de los parásitos, su influencia en el proceso infectivo mediante ensayos de infección *in vitro*, así como se ha estudiado su localización subcelular por microscopía de fluorescencia y Western blot. También hemos identificado posibles interactores mediante ensayos de co-inmunoprecipitación que nos han dado pistas sobre su posible función.

Los resultados obtenidos indican que TcCMF46 se encuentra fuertemente asociada al citoesqueleto y su sobreexpresión se correlacionó con una mayor capacidad de invasión. Algunos de sus posibles interactores son moléculas presentes en acidocalcisomas y el Complejo de la Vacuola Contráctil. Los estudios realizados indican que esta proteína puede estar participando en procesos asociados a la dinámica del citoesqueleto y el tráfico vesicular.

Para el caso de TcPP1r, nuestros estudios sugieren que interacciona con la serina/treonina fosfatasa TcPP1, regulando su actividad. Su localización subcelular mostró ser principalmente citosólica, estando excluída del núcleo. Su sobreexpresión disminuyó en pequeña medida la capacidad infectiva de los parásitos y les confirió una mayor susceptibilidad a Calyculina A, un fármaco inhibidor de PP1, lo que sugiere que estaría inhibiendo la actividad de esta fosfatasa.

Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen una primera aproximación al estudio de proteínas con LRR en *T. cruzi*, aportando información sobre un grupo de proteínas hasta ahora muy poco explorado.

Muchas, pero muchas gracias...

Al Tribunal de Tesis, por su buena disposición y gentileza de aceptar corregir mi trabajo.

A la ANII por financiar el proyecto y mi participación en el mismo y a PEDECIBA por el apoyo.

A UByPA, por el procesamiento de muestras en el análisis de Espectrometría de masa.

A Marcela Díaz, de la Unidad Técnica de Microscopía del Instituto, por enseñarme y ayudarme las veces que fue necesario, y por compartir los viajes Atlántida/Montevideo junto con Andrés y Rocío.

A Carlos Robello y todos los compañeros de trabajo de UBM por los 4 años compartidos.

A mis amigos, que me aguantaron y sufrieron todo el proceso.

A mi familia, por el apoyo y amor incondicional, en especial a mi papá (Héctor Matto), por inculcarme el amor por la naturaleza desde chiquita (tantos documentales de National Geographic hicieron mella).

A mis compañeras y amigas María Laura Chiribao, Florencia Díaz, Lucía López y María Eugenia Francia, mejor conocidas como Lau, Flo, Lu y Euge, por ayudarme, asesorarme, apoyarme y escucharme innumerables veces.

A Adriana, por confiar en mi, un híbrido estudiante/docente con muchas ganas de investigar pero con muy poca experiencia. Gracias por tenerme paciencia, enseñarme, guiarme cuando me encontraba perdida (o cuando estaba perdida pero todavía no la sabía).

A Javi... mi mejor amigo, mi compañero de la vida, mi cable a tierra, mi potenciador, mi amor. Sin su apoyo incondicional, este trabajo ni siquiera hubiera sido soñado.

A todos los que me acompañaron durante estos cuatro años.

¡GRACIAS!

Índice

	Resumen	Ι		
	Agradecimientos	II		
Índice de tablas				
Índice de imágenes				
1. Introducción				
	1.1.1. Aspectos socioeconómicos de la Enfermedad de Chagas 1.1.2. Fases de la enfermedad y tratamiento 1.2. Trypanosoma cruzi	1 2 4		
	1.2.1. Taxonomía 1.2.1. Taxonomía 1.2.2. Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi 1.2.2. Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi 1.2.3. Mecanismos conocidos de invasión y persistencia en el hospedero 1.2.3. Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi 1.2.4. Organización subcelular de Trypanosoma cruzi 1.2.5. El citoesqueleto 1.2.5. El citoesqueleto 1.2.6. El flagelo en tripanosomátidos 1.2.6. El flagelo en tripanosomátidos 1.2.7. Otros componentes celulares relevantes			
	 1.2.1. Otros componentes certuares relevantes	14 17 18 18		
	 1.3.2. El segmento variable (VS) y las familias de proteínas LRR 1.3.3. Familias de proteínas LRR 1.3.4. Evolución de las proteínas LRR 1.3.5. Las internalinas (Inls) de <i>Listeria monocytogenes</i> como ejemplo de proteínas LRR 1.3.6. Proteínas LRR en tripanosomátidos 	18 19 21 22 26		
2.	Hipótesis	27		
3.	Objetivos 3.1. Objetivo general 3.2. Objetivos específicos	27 27 27		
4.	Materiales 4.1. Reactivos químicos, fármacos y anticuerpos 4.1.1. Reactivos químicos 4.1.2. Fármacos 4.1.3. Anticuerpos 4.1.3. Anticuerpos 4.2. Kits comerciales 4.3. Buffers y soluciones 4.3.1. Buffers 4.3.2. Soluciones 4.4. Líneas celulares	28 28 29 29 30 30 30 31 31 21		
	 4.5. Medios de cultivo	31 32 32 33		
5.	Métodos 5.1. Análisis bioinformático: Búsqueda y selección de proteínas LRR in silico 5.1.1. Búsqueda de secuencias LRR en Trypanosoma cruzi 5.1.2. Selección de secuencias LRR con mayor identidad con Internalinas de Listeria monocytogenes 5.1.3. Aproximación in silico de la estructura de las proteínas LRR seleccionadas 5.1.4. Estrategia de clonado de secuencias LRR en vectores de expresión	34 34 34 34 34 35		

		5.1.5. Diseño de primers	
5.2. Aislamiento y tratamiento de ácidos nucleicos		Aislamiento y tratamiento de ácidos nucleicos	
5.2.1. Obtención de ADN genómico		5.2.1. Obtención de ADN genómico	
		5.2.2. Amplificación por PCR	,
		5.2.3. Clonado de secuencias LRR en el vector pGEM-T	,
		5.2.4. Extracción de ADN plasmídico (Miniprep) del vector recombinante pGEM-T/genLRR 38	3
		5.2.5. Secuenciación y análisis de plásmidos recombinantes seleccionados)
		5.2.6. Clonado de secuencias LRR en vectores de expresión)
		5.2.7. Extracción de ADN plasmídico (Miniprep) de vectores de expresión recombinantes 39)
	5.3.	Cultivo y manipulación de bacterias)
		5.3.1. Transformación de bacterias electrocompetentes <i>E. coli</i> XL1 Blue, con el vector	
		recombinante pGEM-T/genLRR 40	
		5.3.2. Transformación de bacterias electrocompetentes <i>E. coli</i> XL1 Blue con vectores de	
		expresión recombinantes	
	5.4.	Cultivo y manipulación de parásitos 41	
		5.4.1. Cultivo de parásitos epimastigotas	
		5.4.2. Producción de líneas de $Trypanosoma \ cruzi$ sobreexpresantes de secuencias LRR . 41	
		5.4.3. Cultivo de tripomastigotas celulares 41	
	5.5.	Obtención y tratamiento de proteínas	
		5.5.1. Obtención de extractos proteicos totales $\ldots \ldots 42$	
		5.5.2. Obtención de extractos de citoesqueleto y fracción citosólica de epimastigotas 42	
		5.5.3. Precipitación de fracción citosólica con acetona	
		5.5.4. Extracción de proteínas para co-inmunoprecipitación 42	
		5.5.5. Cuantificación de proteínas	
		5.5.6. Separación de proteínas mediante Electroforesis por SDS-PAGE	,
		5.5.7. Tinción de gel con Coomassie coloidal Blue G-250 y visualización de perfil de bandas proteicas	
		5.5.8 Extracción y digestión de péntidos para evaluación por Espectrometría de masa 43	
	5.6	Técnicas inmunológicas	
	0.0.	5.6.1 Western blot	
		5.6.2 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) 44	
		5.6.3 Co-Inmunonrecipitación con esferas magnéticos anti-HA 46	
	5.7	Cultivos celulares y ensavos <i>in vitro</i>	,
	0.1.	5.71 Cultivo de líneas celulares de mamífero 47	
		5.7.2 Ensavos de invasión celular 47	
		5.7.3 Ensayos de infección celular	
		5.7.4 Ensayos de interacción célula-parésito 48	
		5.7.5. Curvas de crecimiento de enimastigatas de líneas sobreavoresantes de secuencias	
		LRB de Trunanosoma cruzi	
		5.7.6 Amastigogénesis 48	
	5.8	Otras técnicas	
	0.0.	5.8.1 Espectrometría de masa 49	,
		5.8.2. Determinación de viabilidad con Calyculin A	J
	-	· · · ·	
б.	Kes	$\frac{51}{51}$	
	6.1.	Analisis bioinformatico: Busqueda y selección de proteinas LRR <i>in silico</i>	
		6.1.1. Busqueda de secuencias LRR en <i>Trypanosoma cruzi</i>	
		6.1.2. Selección de secuencias LRR con mayor identidad con internalma A de <i>Listeria</i> monocutogenes	!
6.1.3. Aproximación <i>in silico</i> de la estructura de las proteínas LRR sel 6.2. Generación de vectores de expresión y evaluación de líneas sobreexpresa		6.1.3. Aproximación <i>in silico</i> de la estructura de las proteínas LRR seleccionadas 53	
		Generación de vectores de expresión y evaluación de líneas sobreexpresantes establecidas	
		de $T. cruzi$	
 6.2.1. Estrategia de clonado de secuencias LRR en vectores de expresión 6.2.2. Amplificación por PCR		6.2.1. Estrategia de clonado de secuencias LRR en vectores de expresión	
		6.2.2. Amplificación por PCR	
		$ 6.2.3. {\rm Producción \ de \ líneas \ de \ } Trypanosoma \ cruzi \ {\rm sobreexpresantes \ de \ proteínas \ LRR \ . } 60 $	l
		6.2.4. Determinación de sobreexpresión por Western Blot	
		Proteína TcPP1r: Protein Phosphatase regulatory subunit 1 (TcCLB.507867.60) 62	
		6.3.1. Analisis <i>in silico</i> de la estructura de TcPP1r	

6.3.2. Determinación de sobreexpresión y localización subcelular de TcPP1r mediante IFI				
	66			
	70			
	73			
	73			
	75			
ediante				
	76			
	87			
smas de				
	88			
	~ ~			
	92			
· · · · · ·	92 96			
	92 96 00			
 1	92 96 .00			
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	92 96 .00 100			
 1 1 1	92 96 .00 100			
1 1 1 1	92 96 .00 100 101 102 05			
1 •••••• •••••• ••••••• ••••••• ••••••••	92 96 .00 100 101 102 105			
	92 96 .00 100 101 102 105 .09			
1 1 1 1 1 1 1	92 96 .00 100 101 102 105 .09			
1 1 1 1 1 1 1 1	92 96 .00 100 101 102 105 .09 10			
1 1 1 1 1 1 1 1 1	 92 96 .00 100 101 102 105 .09 10 10 19 			
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	 92 96 .00 100 101 102 105 .09 .10 19 .19 			

Índice de tablas

1.	Secuencia consenso de los diferentes tipos de repetidos LRR	19
2.	Primers diseñados para amplificar los genes LRR seleccionados	33
3.	Genes LRR obtenidos por la búsqueda in silico en Trypanosoma cruzi CL Brener Esmeraldo-	
	like	52
4.	Alineamiento entre proteínas LRR de Trypanosoma cruzi e InlA de Listeria monocytogenes	53
5.	Identificación y clasificación de repetidos LRR en internalinas de Listeria monocytogenes .	54
6.	Análisis de secuencia de proteínas con identidad significativa con InlA	55
7.	Identidad significativa con otras Inl de <i>Listeria monocytogenes</i>	57
8.	Selección final de genes con mayor identidad significativa con internalinas de Listeria	
	monocytogenes	57
9.	Tamaño predicho, tags asociados y vectores de destino de las proteínas LRR seleccionadas	59
10.	Posibles interactores de TcPP1r	69
11.	Posibles interactores de TcCMF46	98

Índice de imágenes

1.	Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas.	1
2.	Árbol filogenético bayesiano de tripanosomátidos	4
3.	Esquema del ciclo de vida de <i>Trupanosoma cruzi</i>	5
4.	Modelo de invasión de <i>Trypanosoma cruzi</i> en una célula de mamífero	7
5.	Estructura esquemática de organelos de epimastigota de <i>T. cruzi</i> en diferentes estadios	9
6.	Ultraestructura del corset subpelicular de microtúbulos	11
7.	Ultraestructura del flagelo de <i>Trupanosoma</i>	12
8	Modelo de la estructura de N-DRC de <i>Chlamudomonas flagella</i>	13
9. 9	El Complejo de la Vacuola Contráctil	15
10	Acidocalcisomas en enimastigotas de <i>Trumanosoma cruzi</i>	16
11	Modelo propuesto para el proceso de descenso regulador de volumen (RVC) en T cruzi	17
12	Estructura tridimensional de proteínas LBR	21
13	Ciclo celular de L. monocutogenes	23
10.14	Estructura de Internalinas de L. monocutagenes	20
15	Escueras de internalización de L. monocutagenes	21
16	Esquemas de Internalización de <i>D. monocytogenes</i> .	20
10.17	Esquema del vector pTREXn	36
18	Estrategia completa de húsqueda de secuencias LBR en Trungnosomo cruzi CL Brener	50
10.	Estrategia completa de busqueda de secucierías Entre en Trypanosoma eraza en Erener	58
10	Besultados de las amplificaciones por PCB	50
19. 20	Identificación de sobreevpresión per Western blot de líneas transfectantes de <i>T. cruzi</i>	61
$\frac{20}{21}$	Comparación de ostructura socundaria de las proteínas Sde22 de S nombe y TcPP1r	63
$\frac{21}{22}$	Estructura tridimongional de la proteína Sda22 de S. pombe, y 101111	64
22. 92	Detección de expresión de taga en enimectivates transfectentes pDIV oCED	65
20. 94	Detección de Expresión de tags en epimastigotas transfectantes pDI1-eGFF	65
24.	Evaluación de aficiancia de Inmunoproginitación por Western blot	67
20. 26	Evaluation de enciencia de minunoprecipitación por vestern blot	07
20.	Blue G-250	68
27.	Ensayo de supervivencia a Calyculina A de epimastigotas sobreexpresantes de TcPP1r	70
28.	Curvas de crecimiento de epimastigotas sobreexpresantes de TcPP1r	71
29.	Ensayos de infección de transfectantes pDIY-eGFP y pDIY-TcPP1r	72
30.	Comparación de estructura secundaria de las proteínas DRC3 de C. reinhardtii, TbCMF46	
	y TcCMF46	74
31.	Determinación de especificidad del anticuerpo policional anti-TcCMF46 por Western blot.	76
32.	Detección de TcCMF46 en epimastigotas Wild Type Dm28c	78
33.	Detección de TcCMF46 en epimastigotas transfectantes pTREXn	79
34.	Detección de TcCMF46 en epimastigotas transfectantes pDIY-TcCMF46	80
35.	Detección de TcCMF46 en epimastigotas transfectantes pTREXn-TcCMF46HA	81
36.	IFI de interacción de células HeLa con tripomastigotas celulares pTREXn y pTREXn-	
	TcCMF46HA	83
37.	IFI de invasión de células HeLa con amastigotas intracelulares pTREXn y pTREXn-	
	ТсСМF46HA	85
38.	IFI 72 horas pos-invasión de células HeLa con amastigotas intracelulares pTREXn y	
	pTREXn-TcCMF46HA.	86
39.	IFI 96 horas pos-invasión de células HeLa con amastigotas intracelulares pTREXn y	
	pTREXn-TcCMF46HA.	87
40.	Determinación de localización subcelular de TcCMF46 por Western blot.	88
41.	Citoesqueleto de epimastigotas pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA obtenidos con 0,005 %	
	Triton X-100.	89
42.	Citoesqueleto de epimastigotas pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA obtenidos con 0,2 %	
	Triton X-100.	90
43.	Citoesqueleto de epimastigotas pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA obtenidos con 0.2 %	-
	Triton X-100.	91
44.	Curvas de crecimiento de epimastigotas sobreexpresantes de TcCMF46	93
45.	Ensayos de infección de líneas sobreexpresantes de TcCMF46	94
46.	Ensayos de invasión de pTREXn-TcCMF46HA	95

47.	Ensayos de amastigogénesis de líneas transfectantes de <i>T. cruzi</i>	96
48.	Evaluación de eficiencia de Co-Inmunoprecipitación por Western blot	97
49.	Extractos de Co-Inmunoprecipitación de pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA teñidos con	
	Coomassie Blue G-250	98
50.	Control de especificidad de anticuerpos en epimastigotas	120
51.	Control de especificidad de anticuerpos en ensayos <i>in vitro</i>	121
52.	Control de especificidad de anticuerpos en ensayos <i>in vitro</i>	122

1. Introducción

1.1. Enfermedad de Chagas

También llamada Trypanosomiasis Americana, la Enfermedad de Chagas, causada por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*, es una zoonosis endémica en 21 países de América Latina, causando más muertes por año que cualquier otra enfermedad transmitida por insectos (vectores), incluida la Malaria. Esta enfermedad está muy extendida en otros países no endémicos, como Australia, Japón, España y Estados Unidos, principalmente a causa de la migración (ver Figura 1). Actualmente existen entre 7 y 8 millones de personas infectadas, y cerca de 70 millones de personas se encuentran en riesgo de infección, principalmente en América Latina. Anualmente se producen cerca de 7500 muertes por esta enfermedad, y se cree que menos del 1% de los infectados tienen acceso a un diagnótico y tratamiento adecuados. La Figura 1 muestra la distribución geográfica de esta enfermedad al 2016 [1].



Figura 1 – Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas. En marrón se indican las regiones donde la enfermedad es endémica y en beige las regiones donde la enfermedad esta presente pero no es endémica. Extraído de DNDI: Drugs for neglected disease iniciative http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/ [1]

Esta enfermedad fue descubierta en 1909 por el médico Carlos Chagas, quien describió las manifestaciones clínicas de la infección en la etapa aguda, el agente etiológico y ciclo de vida del parásito, el insecto vector que lo transmite, así como los hospederos mamíferos [2]. La enfermedad de Chagas es transmitida a humanos y más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos), y salvajes (roedores, marsupiales, armadillos, etc), generalmente a través de insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae. A pesar de la existencia de más de 130 especies de triatominos, tres, son las principales que actúan como vectores competentes de *Trypanosoma cruzi: Triatoma infestans, Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata*, siendo la primera las más importante [3]. El vector defeca luego de alimentarse de la sangre del hospedero (actividad que realiza de noche), y la transmisión del parásito ocurre cuando una herida en la piel (incluso la misma picadura), los ojos o la boca entran en contacto con las heces/orina contaminadas con *T. cruzi* [4].

1.1.1. Aspectos socioeconómicos de la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas está catalogada como una "Enfermedad Tropical Desantendida" (Neglected Tropical Disease); ya que está relacionada directamente con la pobreza y no apropiadamente atendida o encarada desde la esfera política o por los medios de comunicación, lo que produce un impacto en la salud, bienestar y desarrollo socioeconómico de países de bajos recursos o en vías de desarrollo [5].

Numerosos estudios han demostrado las ventajas de prevenir esta enfermedad mediante programas de control del insecto vector [6]. En el caso de Uruguay, los esfuerzos por erradicar la enfermedad se lograron gracias a la creación del "Programa Nacional de Chagas", en 1972 y reformulado en 1983, un esfuerzo mancomunado entre el Ministerio de Salud Pública (MSP) y la Universidad de la República (especialmente el Departamento de Parasitología y Micología de la Facultad de Medicina) y las Intendencias locales. Desde el Departamento de Parasitología y Micología se trabajó por estandarizar técnicas diagnósticas, conocer más a fondo a los triatominos silvestres de Uruguay, los mecanismos de transmisión de T. cruzi y las manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas, mientras que los esfuerzos del MSP se centraron en la erradicación del parásito. La efectividad del control antivectorial se manifestó en la cada vez más escasa captura de vectores y en la no detección de casos agudos de la enfermedad [7]. La implementación consistente de este programa permitió que desde el 1997, se haya mantenido interrumpida la transmisión domiciliaria de la Enfermedad de Chagas, y que en 2012, la Organización Panamericana de la Salud certificara al país como el primero de América Latina libre del insecto que transmite esta enfermedad [8], [9].

1.1.2. Fases de la enfermedad y tratamiento

Fases aguda y crónica

La Enfermedad de chagas generalmente presenta una fase inicial o aguda, seguida por una fase crónica que puede ser clasificada como indeterminada (sin manifestaciones clínicas), o determinada, de tipo cardíaca, digestiva o cardiodigestiva, cada una con sus propias manifestaciones clínicas. Una fase aguda severa ocurre en menos del 1 % de los pacientes, donde las manifestaciones clínicas pueden incluir miocarditis aguda, efusión pericárdica y/o meningoencefalitis [6].

La fase inicial de infección con *Trypanosoma cruzi* o Fase Aguda dura de 4 a 8 semamas, mientras que la fase crónica dura toda la vida del hospedero. Generalmente, la fase aguda es asintomática o presenta síntomas asociados a una enfermedad febril que se resuelve de forma espontánea. Dichos síntomas, cuando ocurren, comienzan 1 o dos semanas luego de la exposición con un triatomino infectado, incluyendo fiebre, inflamación de hígado, bazo, y gánglios linfáticos, edema subcutáneo, y la característica lesión inflamatoria en el sitio de entrada del parásito a través de la piel (Chagoma) o la mucosa ocular (signo de Romaña) [10], [3], [4]. Estos síntomas sistémicos son el resultado de una alta parasitemia.

La fase aguda se resuelve espontáneamente entre 4 y 8 semanas en la gran mayoría de los pacientes. Estos pacientes pueden entrar entonces en una de dos fases; la fase de latencia o indeterminada, que se caracteriza por una parasitemia casi indetectable, falta de síntomas, serología positiva y un leve y subclinico compromiso cardiaco[11]. Sin embargo, un tercio de los pacientes evoluciona luego a la fase crónica unos 20 años luego de la infección [6].

La fase crónica está caracterizada por el desarrollo progresivo de lesiones en diferentes órganos, principalmente corazón, esófago, cólon, o una combinación de estos, generando tres formas de la enfermedad; cardíaca, digestiva o cardiodigestiva. La forma digestiva se manifiesta en el 10-15% de los pacientes crónicos, mientras que la forma cardíaca es más común y peligrosa, presentándose en el 20-30% de los pacientes, y generalmente lleva a anormalidades en el sistema de conducción, bradiarritmias y taquiarritmias, aneurismas apicales, falla cardíaca y muerte súbita [3].

Fármacos tripanocidas

A pesar de la alta incidencia en las regiones endémicas y de la diseminación de la enfermedad de Chagas, no existe a la fecha una vacuna contra $T.\ cruzi$ y solo hay dos fármacos aprobados para el tratamiento que fueron desarrollados a fines de los años 60'; Benznidazol (Bzn) y Nifurtimox (Nfx). Estos nitrocompuestos heterocíclicos presentan mayor efectividad en la fase aguda de la enfermedad, teniendo una actividad antiparasitaria muy leve en la fase crónica. A su vez, poseen efectos secundarios indeseables, mayor toxicidad en adultos, eficiencia variable, y resistencia desarrollada por el parásito [10], [12]. La quimioterapia con estos compuestos está recomendada para todos los casos en fase aguda, congénita y reactivación de la enfermedad, para todos los niños y para menores de 18 años en fase crónica. También se recomienda para adultos de 19-50 años que no presenten cardiopatía chagásica. Como contrapartida, está contraindicada en embarazadas, pacientes con insuficiencia renal o hepática y en casos avanzados de megacólon y cardiopatía chagásica [3].

El efecto secundario más común de Bzn es la dermatitis alérgica localizada, que afecta entre el 20% y 30% de los pacientes, seguida por neuropatía periférica en el 5-10% de los pacientes. Otros efectos

secundarios asociados pueden ser nauseas, vómitos, anorexia, pérdida de peso, e insomnio. En cuanto a Nfx, el efecto secundario más común está asociado a molestias gastrointestinales, reportándose en el 50 % de los pacientes, incluyendo nauseas, vómitos, anorexia, pérdida de peso, molestia abdominal, y diarrea. Otros síntomas están relacionados con el efecto sobre el Sistema Nervioso Central, e incluyen insomnio, irritabilidad y desorientación. En general, los niños tratados tanto con Bzn como con Nfx presentan menos efectos adversos que los adultos [12].

Tomando estos datos, es clara la necesidad de nuevas drogas que sean efectivas tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad, y que presenten menos efectos secundarios que los actualmente usados.

1.2. Trypanosoma cruzi

1.2.1. Taxonomía

Trypanosoma cruzi presenta la siguiente ubicación taxonómica: Eukarya, Protista, Exclavata, Discoba, Discricristata, Euglenozoa, Kinetoplastea, Tripanosomatida, Trypanosomatidae, Trypanosoma. Es un parásito unicelular flagelado digenético (su ciclo de vida alterna entre dos hospedadores de diferentes especies; por ejemplo entre vertebrados e insectos, generalmente llamados vectores) perteneciente a la familia Trypanosomatidae. En el sistema taxonómico actual la familia Trypanosomatidae contiene tres subfamilias descritas: Leishmaniinae, compuesta por un género digenético (*Leishmania*) y tres monogenéticos (parásito cuyo ciclo de vida ocurre enteramente en un hospedador) (*Crithidia, Leptomonas* y *Lotmaria*); Strigomonadinae que contiene tres géneros monogenéticos (*Angomonas, Kentomonas*, y *Strigomonas*); y Blechomonadinae que contiene el género monogenético Blechomonas. Por fuera de estos tres grupos existen otros géneros: Trypanosoma, Phytomonas, Blastocrithidia, Herpetomonas, Sergeia, Paratrypanosoma y Wallacemonas, [13].

La Figura 2 muestra el árbol filogenético bayesiano de Tripanosomátidos [13].



Figura 2 – Árbol filogenético bayesiano de tripanosomátidos. Dicho árbol se obtuvo a través del análisis de secuencia de la subunidad pequeña de ARNr. En amarillo se representan los parásitos monogenéticos y rojo los digenéticos. El color verde representa las especies de bodonidos usadas como grupo externo [13].

1.2.2. Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi

La descripción del ciclo comenzará con la infección del hospedero mamífero por tripomastigotas metacíclicos presentes en la excreta del triatomino hematófago. Los parásitos en este estadio pueden ingresar al hospedero mediante la contaminación de la picadura con dicha excreta o penetrando las mucosas. Este estadio es no proliferativo, pero altamente infectivo, pudiendo invadir un amplio rango de células fagocíticas y no fagocíticas, ingresando a través de una vacuola parasitófora. Inmediatamente luego de su ingreso, se diferencia a amastigota y escapa de la vacuola parasitófora. Una vez en el citoplasma se completa su diferenciación, donde, entre otras cosas sufren un drástico acortamiento del flagelo. Este estadio es replicativo y comienza así la proliferación hasta que la célula está llena de amastigotas, formando un "pseudoquiste" [14]. En este punto, los amastigotas se alargan, y también lo hace el flagelo, diferenciándose a "tripomastigotas esbeltos". Estos, al lisarse la célula pueden tanto invadir células vecinas, como pasar al sistema circulatorio o linfático y diseminarse, en cuyo caso comienzan a diferenciarse, a "tripomastigotas retacones" o a amastigotas extracelulares, ambos capaces de invadir otras células (en el caso de amastigotas especialmente invaden células fagocíticas, pero utilizando mecanismos de invasión diferentes [14] [15]). Se ha demostrado que aquellos "tripomastigotas esbeltos" que fallan en su invasión se diferencian, primero a "tripomastigotas retacones" y luego a amastigotas (proceso denominado amastigogénesis) [14]. Una mezcla de estas tres formas puede estar presente en la sangre de un hospedero infectado, y ser ingeridos por un triatomino. En el intestino medio del vector, los tripomastigotas se diferencian, inicialmente a una forma esferomastigota intermedia, alargando su flagelo, para luego alargar el resto del cuerpo celular y convertirse en epimastigotas (estadio replicativo no infectivo) y continúa su replicación hasta llegar a la fase estacionaria cuando se agotan los nutrientes de la sangre ingerida. Cuando esto ocurre, migran hacia la región posterior del tracto intestinal del insecto, donde los epimastigotas esbeltos característicos de la fase estacionaria de crecimiento se adhieren a la cutícula del intestino a través del flagelo, y se diferencian en la forma infectiva (no replicativa) tripomastigota metacíclico, completando el ciclo de vida [14], [15].

La Figura 3 esquematiza el ciclo de vida completo de *Trypanosoma cruzi*, identificando los estadios y formas que pueden encontrarse en el insecto vector de la familia Reduviidae ("Reduviid bug"), y en el mamífero [15].



Figura 3 – Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Al ser un parásito digenético, presenta dos tipos de hospederos, uno de ellos invertebrado (insecto vector de la familia Reduviidae, indicado como "Reduviid bug") y otro mamífero (identificado como "Mammal"). Cada uno de estos hospederos presenta formas o estadios característicos de *T. cruzi*. También se pueden observar formas intermedias, como la forma esferomastigota ("spheromastigote"), y las formas "esbelta" y "retacona" del estadio tripomastigota (indicados como 'slender trypomastigote") [15].

1.2.3. Mecanismos conocidos de invasión y persistencia en el hospedero

Invasión en células de mamífero

La invasión de células en el hospedero involucra numerosas interacciones con la célula invadida y efectos sobre la misma, que facilitan los pasos para una infección efectiva. En este contexto, el citoesqueleto de la célula hospedera es crucial para la invasión y persistencia de los parásitos.

Los tripomastigotas son muy móviles y tienen una importante adaptación a la invasión de células no fagocíticas mediante uno de tres mecanismos. Previamente, y durante la invasión, los tripomastigotas activan en la célula hospedera un importante número de vías de señalización, incluidas aquellas que involucran concentraciones de Ca^{2+} , kinasas de fosfatidilinositol, y AMPc [16].

El primer mecanismo es el dependiente de lisosomas. En este caso, T. cruzi logra el ingreso en células no fagocíticas al activar la vía de exocitosis lisosomal, generando un flujo de Ca²⁺ que estimula la depolimerización de los filamentos corticales de actina y el reclutamiento de microtúbulos y lisosomas al sitio de la invasión [17], [15]. Estos lisosomas se fusionan a la membrana formando una vacuola que contiene al parásito, el cual residirá allí durante un breve periodo. Este mecanismo de exocitosis mediada por Ca²⁺ se encuentra altamente conservado en todas las células de mamíferos (mecanismo de tipo "housekeeping"), y se activa ante la señal de ruptura de la membrana, por lo que puede ser una de las explicaciones de la habilidad de T. cruzi de invadir virtualmente cualquier tipo de célula de mamífero [18]. Dado que las células musculares tienen particularmente desarrollado este mecanismo, el mismo puede promover a la vez la invasión y tropismo sobre las células del músculo cardíaco y liso.

Otro de los mecanismos (denominado "mecanismo dependiente de actina") implica los filamentos de actina de la célula hospedera, donde inicialmente la vacuola parasitófora es formada enteramente por la membrana plasmática de la célula, que lo rodea y engloba. Dicho mecanismo activa la ruta endocítica de la célula hospedera, la cual activa la depolimerización del citoesqueleto de actina alrededor del sitio de invasión. Dicha depolimerización promueve el ingreso del parásito, mediado por la fusión con organelos endocíticos como los endosomas tempranos [19], [20].

El último mecanismo es el "independiente de lisosomas", en el cual los parásitos logran invadir ingresando por invaginación de la membrana plasmática donde se acumula fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato (PIP₃) por actividad de kinasas de fosfatidilinositol de tipo I. Dicha invaginación de la membrana, conteniendo al parásito, madura como vacuola parasitófora mediante la fusión con endosomas tempranos y posteriormente, con la fusión de lisosomas [21].

Sea cual sea el mecanismo de entrada, una vez que se forma la vacuola, se produce un tráfico lisosomal hacia la misma, acidificando su medio. Este descenso de pH induce dos procesos; diferenciación de tripomastigota a amastigota y activación en el parásito de moléculas denominadas TcTox, que median el debilitamiento de la membrana de la vacuola parasitófora y permite el escape del amastigota al citoplasma [21], [15]. Este proceso se completa en unas 8 h y una vez en el citoplasma, los amastigotas completamente diferenciados comienzan a replicarse cada 12 h durante 3-5 días, hasta completar el volumen celular.

También se ha descrito una reorganización del citoesqueleto de actina, el cual se incrementa y organiza sobre el sitio de invasión. Se considera que dicho incremento también es promovido por el parásito, para facilitar su retención en la célula [16].

La Figura 4 muestra un esquema de los tres tipos de invasión previamente descritos [21].



Figura 4 – Modelo de invasión de *Trypanosoma cruzi* en una célula de mamífero. De izquierda a derecha se muestra el mecanismo dependiente de lisosomas, el mecanismo dependiente de actina y el mecanismo independiente de lisosomas [21].

A pesar de que en la invasión el reordenamiento del citoesqueleto (tanto a nivel de microtúbulos, como de filamentos de actina), hacen a la célula más "tiesa", promoviendo la invasión y retención del parásito, se ha demostrado que, una vez establecida la invasión, a medida que pasa el tiempo ocurre un "ablandamiento" de la célula hospedera, producto de un desensamblaje progresivo del citoesqueleto. Si bien no se conocen los beneficios de este proceso sobre el parásito, se puede hipotetizar que el mismo genera un ambiente más permisivo para la replicación y puede facilitar la disrupción de la célula hospedera y egreso de los parásitos. En un contexto tisular, este proceso puede afectar la función del tejido infectado y contribuir a la patofisiología de la Enfermedad de Chagas [16].

Persistencia en el hospedero mamífero

 $T.\ cruzi$ ha desarrollado la capacidad de evadir el Sistema Inmune Innato de mamíferos. Uno de los mecanismos identificados de persistencia es la supresión del mecanismo de "estallido respiratorio" de los macrófagos, ya sea por Intermediarios Reactivos de Oxígeno (ROI) o por Intermediarios Reactivos de Nitrógeno (NOI), mediante el uso de un sistema antioxidante que hace frente al ataque oxidativo, asegurando su liberación del fagosoma hacia el citoplasma de la célula. Dicho sistema consta de la producción de equivalentes reductores desde el NADPH a una variedad de sistemas enzimáticos de detoxificación que utilizan antioxidantes como tripanotión, glutatión, ascorbato o triparredoxinas [17].

Otro mecanismo utilizado es el uso del tejido adiposo como "escondite". Estudios han demostrado que además del tejido muscular cardíaco y liso, *T. cruzi* presenta tropismo hacia adipocitos y el tejido adiposo. En ensayos *in vitro* se ha demostrado que es capaz de alterar un importante número de vías de señalización en adipocitos en la fase temprana de la infección, que se mantienen durante la fase crónica de la misma. Por otro lado, los parásitos tienen una gran afinidad con lipoproteínas, cuya unión facilita la invasión de células. Todo esto puede facilitar en parte la persistencia de *T. cruzi* en el tejido adiposo y en adipocitos, siendo un "depósito" de parásitos a largo plazo, de donde los mismos pueden emerger ante una situación de inmunosupresión aún décadas después [17].

1.2.4. Organización subcelular de Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi es un protozoario que se caracteriza por presentar organelos únicos (a diferencia de la mayoría de las células eucariotas), como es caso de la vacuola contráctil en contacto con el bolsillo

flagelar, la gran mitocondria, anexada a un kinetoplasto que contiene maxicírculos y minicírculos que conforman el ADNk, así como un sólo flagelo, conectado al kinetoplasto a través del cuerpo basal, que emerge de la célula desde el bolsillo flagelar (una invaginación en la membrana plasmática) [22]. Además presenta estructuras particulares, como los glicosomas (organelos donde se realizan las reacciones de glicólisis), reservosomas (organelos donde se almacenan ciertas sustancias de reserva) y acidocalcisomas (organelos con grandes reservorios de iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y polifosfatos) [23]. La región anterior de la célula está definida como la región donde se ubica el flagelo y es la que dirige su desplazamiento. Esta estructura básica se mantiene en todos los estadios, donde los cambios morfológicos están relacionados a una reorganización de dichas estructuras, más que a una pérdida/ganancia de las mismas.

El estadio epimastigota

Puede definirse como aquel donde el kinetoplasto y la base del flagelo se encuentran en posición anterior con respecto al núcleo. Aunque es claro que el estadio epimastigota está bien delimitado, los parásitos en dicho estadio presentan una amplia variedad de tamaños y formas, hasta llegar a un tamaño de 30 μ m. Existen dos fases principales dentro de la curva de crecimiento de este estadio, cada una con características morfológicas marcadas; la fase exponencial, con la forma epimastigota característica, donde los parásitos están en su mayor tasa de replicación, mientras que en la fase estacionaria la proliferación cesa, se alarga tanto el cuerpo celular como el flagelo, adquiriendo una forma más esbelta, y se preparan (metabólica y morfológicamente) para el pasaje al estadio tripomastigota metacíclico (proceso llamado metaciclogénesis) [24]. Se ha identificado ademas, una forma intermedia denominada "esferomastigota", con un cuerpo redondeado, la cual aparece en la fase logarítmica temprana (con un flagelo pequeño) y en la fase estacionaria (con un flagelo varias veces más grande que el cuerpo celular). Esta forma no ha sido identificada como un estadio en sí mismo, sino una forma intermedia entre la diferenciación amastigota/epimastigota y epimastigota/tripomastigota [14].

El estadio tripomastigota

En contraposición al estadio epimastigota, los tripomastigotas se definen como aquellos parásitos donde el kinetoplasto y la base del flagelo pasan a una posición posterior con respecto al núcleo. Este estadio presenta dos tipos morfológicos básicos; esbelto o "slender" y retacón o "stump". Además, existen dos tipos de tripomastigotas (cada uno con los mismos tipos morfológicos mencionados anteriormente); los tripomastigotas celulares, que son aquellos que emergen de células de mamífero infectadas, diferenciándose a partir de amastigota intracelular, y los tripomastigotas metacíclicos, que son el resultado metaciclogénesis de epimastigotas en el tracto digestivo posterior del insecto vector [24].

El estadio amastigota

Los amastigotas, por otro lado, son más o menos esféricos, con un tamaño de 3-5 μ m de diámetro, con un flagelo muy reducido, que apenas emerge del bolsillo flagelar. Con respecto a la relación espacial de las estructuras subcelulares, al igual que en epimastigota, el kinetoplasto y la base del flagelo se encuentran en posición anterior con respecto al núcleo.

La Figura 5 muestra un esquema 2D y 3D de los tres estadios anteriormente mencionados en su forma más general, donde es posible visualizar y comparar las relaciones espaciales de las principales estructuras [25].



Figura 5 – Estructura esquemática de organelos de epimastigota de *T. cruzi* en diferentes estadios. (a) Estructura y relación espacial de organelos en el estadio epimastigota. (b) Estructura y relación espacial de organelos en el estadio tripomastigota. (c) Estructura y relación espacial de organelos en el estadio amastigota. En función de microscopía óptica y de microscopía electrónica de barrido y transmisión, se generaron los modelos 2D y 3D de cada estadio [25].

1.2.5. El citoesqueleto

En las células eucariotas, el citoesqueleto cumple un papel esencial en numerosos procesos, desde el mantenimiento de la forma celular, locomoción y movimiento intracelular de diversas estructuras. Los microtúbulos son la principal estructura del citoesqueleto, pudiendo hallarse en el citoplasma, formando el huso mitótico o ensamblados en varias estructuras intracelulares. En algunos protozoarios además, existe un arreglo particular de microtúbulos, el cual se organiza como una capa única ubicada inmediatamente por debajo de la membrana plasmática [26], llamada "Corset subpelicular de microtúbulos" [27], [28], [29]. Este arreglo se puede encontrar en la familia Kinetoplastida.

Los microtúbulos

Los microtúbulos pueden definirse como complejos macromoleculares de α/β Tubulina (unidad estructural) que forman una estructura polimérica que interactúa con otras proteínas menos abundantes. Estas últimas proteínas son importantes en el control de la estabilidad y dinámica de ensamblaje/desensamblaje del microtúbulo, modulando así las propiedades funcionales del mismo [26].

El principal componente del citoesqueleto de los tripanosomátidos es el microtúbulo. En estos parásitos, a diferencia de las células de mamíferos, los microtúbulos están precisamente formando dos estructuras celulares diferentes. El primero de ellos es el "Corset subpelicular de microtúbulos", el cual le da forma a la célula y está presente durante todo el ciclo del parásito. El segundo arreglo de microtúbulos es el que forma el complejo cuerpo basal/axonema del flagelo [30], [26].

El Corset Subpelicular de Microtúbulos

Este arreglo se encuentra a lo largo de toda la célula, excepto en la región del bolsillo flagelar, donde los microtúbulos subpeliculares son reemplazados por la Zona de Unión al Flagelo (Flagellum Attachment Zone: FAZ), formada por una estructura filamentosa. Por Microscopía de Transmisión se identificó que, en todas las especies estudiadas de tripanosomátidos, el arreglo subpelicular se encuentra a unos 15 nm de distancia de la membrana plasmática, y los microtúbulos se disponen de forma paralela unos de otros, manteniendo una distancia fija de 44 nm. Esta distancia fija se debe en parte a la presencia de filamentos de 6 nm de espesor que los conectan formando una especie de "puente". Estos filamentos están formados por proteínas asociadas a microtúbulos ("Microtubule-Asociated Proteins" o MAPs). Aunque han sido descritas algunas de estas proteínas presentes en dichos filamentos, la naturaleza de los mismos no está completamente clara. La unión entre microtúbulos y los filamentos que actúan de anclaje entre microtúbulos contiguos (también dispuestos de forma regular), convierte el arreglo en una cáscara dura imposible de doblar o encoger. Sin embargo, el arreglo helicoidal que forma le permite encogerse o hincharse en respuesta a un estrés osmótico, volviendo a la célula más pequeña y esférica o con forma de tirabuzón [26], [29].



(c)

Figura 6 – Ultraestructura del corset subpelicular de microtúbulos. (a) Corte transversal de *Leptomonas samueli* mostrando el arreglo de microtúbulos debajo de la membrana plasmática [26]. (b) Microfotagrafía electrónica de epimastigota de *T. cruzi*, mostrando el corset subpelicular de microtúbulos y los filamentos (flechas) que actúan como puentes conectando los microtúbulos paralelos [26] (c) Microfotagrafía electrónica de transmisión donde se realizó una tinción negativa de citoesqueleto de *T. brucei* [30] (escala: 1,1 μ m).

1.2.6. El flagelo en tripanosomátidos

El flagelo es un apéndice celular, generalmente rodeado de membrana que se proyecta al medio externo. Esta estructura se encuentra presente en la mayoría de los organismos pluricelulares y en muchos otros unicelulares, especialmente protozoarios, como es el caso de los tripanosomátidos [31]. La comparación genómica entre diferentes organismos flagelados ha mostrado que la mayoría de las proteínas identificadas en el flagelo están altamente conservadas.

En el caso de *T. cruzi*, el tamaño del flagelo varía a lo largo de su ciclo, desde menos de 2 μ m en amastigotas, hasta 20 μ m en epimastigotas en fase estacionaria [15].

La Figura 7 muestra las tres estructuras principales del flagelo de *Trypanosoma*; el axonema, el PFR o "Paraflagellar Rod" y la zona de unión al flagelo o FAZ ("Flagellar Atachtment Zone") en un corte transversal de flagelo de *T. brucei* [30].



Figura 7 – Ultraestructura del flagelo de *Trypanosoma*. Se observa una microscopía de transmisión de corte transversal de flagelo de *T. brucei*, donde se observa el axonema, con su arreglo de 9+2 dobletes de microtúbulos, acompañado del PFR (indicado con flechas). también se pueden identificar cuatro microtúbulos del corset subpelicular (indicados con cabezas de flechas) que se asocian con el retículo endoplasmático liso, y la zona de unión al flagelo (FAZ), marcada con una llave. Escala: 70 nm [30].

El axonema

El axonema es el núcleo central de las cilias y los flagelos eucariotas (en bacterias la composición del flagelo es diferente). Esta estructura cilíndrica altamente organizada se compone de 9 pares (dobletes) de microtúbulos periféricos, rodeando un par de microtúbulos centrales denominados CPC (Central Pair Complex). Los 9 dobletes se ordenan en intervalos regulares formando un cilindro hueco que se extiende a lo largo de todo el flagelo. Los dobletes están compuestos por dos tipos diferentes de microtúbulos; los "A" están compuestos por 13 protofilamentos típicos, mientras que los "B" están formados por 11 protofilamentos y se fusionan con los A. Los microtúbulos del par central o CPC están formados por 13 protofilamentos, y, si bien no están en contacto directo, se conectan mediante un filamento fino o "puente". Los dobletes se encuentran conectados entre ellos mediante "nexin-links". Los túbulos A contienen dos proyecciones llamadas "brazo externo de dineína" ("Outer Dynein Arm": ODA) y "brazo interno de dineína" ("Inner Dynein Arm": IDA). Una tercer proyección, llamada "Radial Spoke" (RS) se orienta hacia el par central de túbulos [31].

Composición molecular del axonema.

Dado que son el componente estructural de los microtúbulos, las proteínas flagelares más abundantes son la α y β -tubulina.

La siguiente familia de proteínas más frecuentes es la de **dineínas**; proteínas motoras asociadas a microtúbulos, cuya actividad es la responsable de la motilidad del flagelo. Las dineínas flagelares son complejos proteicos compuestos por 1-3 cadenas pesadas (con actividad ATPasa y motilidad intrínseca), y un número variable de cadenas intermedias o livianas (sin actividad motora, pero con dominios de interacción proteína-proteína, regulando la actividad, especificidad y localización de las cadenas pesadas). Estos complejos pueden ser de dos tipos; el ODA, el cual está formado por 3 cadenas pesadas diferentes, 2 cadenas intermedias y 8 cadenas livianas, mientras que el IDA, esta compuesto por una cadena pesada y una cadena liviana o intermedia [31].

El movimiento del flagelo se realiza en presencia de Mg^{2+} y ATP, mediante la acción de los complejos de dineína, en un proceso denominado deslizamiento de microtúbulos. En este proceso, los brazos de dineína de un doblete periférico interactúan brevemente con el doblete adyacente . Dado que el axonema se encuentra anclado en la célula mediante el cuerpo basal ("basal body"), el deslizamiento de los microtúbulos hace que el flagelo se doble. Sin embargo, no todos los microtúbulos pueden deslizarse simultáneamente, dado que se requiere asimetría para lograr que el flagelo se doble. La participación del doblete central es crucial para brindar la asimetría; se ha determinado que en muchos organismos el doblete central se gira, permitiendo la interacción breve con dobletes específicos, activándolos sólo en ese momento de interacción [31].

Existen numerosas líneas de investigación que indican que los complejos de dineína son regulados por complejos específicos, denominados *dynein regulatory complex* o "complejos reguladores de dineína" (DRCs), localizados muy cerca de los brazos internos de dineína de los túbulos A [31]. Actualmente a estos complejos se los denomina N-DRC o "Nexin-Dynein Regulatory Complex" [32].

Estudios revelan que N-DRC, junto con otros complejos (como el RS y el doblete central) estaría participando en la conexión entre los RS y los ODAs e IDAs, regulando el desplazamiento de los mismos sobre los dobletes vecinos [33] [32] [34]. Al restringir, mecánica o químicamente, el deslizamiento de algunas dineínas en particular, se tiene como resultado el doblamiento del flagelo. Sin embargo, la naturaleza de dicha regulación y su mecanismo no están completamente esclarecidos [34].

La Figura 8 [32], muestra la estructura del axonema de *Chlamydomonas flagella* (organismo modelo para el estudio de esta estructura) en un corte transversal, y un modelado 3D, indicando la posición de N-DRCs, IDAs, ODAs, RS y los túbulos A y B de un doblete.



Figura 8 – Modelo de la estructura de N-DRC de *Chlamydomonas flagella*. A: Imagen de contraste de interferencia diferencial mostrando una célula de *Chlamydomonas flagella* con sus dos flagelos, al hacer un zoom esquemático se observa el axonema en una vista transversal del flagelo. Se identifican tres estructuras que conectan dobletes vecinos; IDAs, ODAs y el complejo N-DRC. B y C: mapa 3D del repetido que forma el axonema de *Chlamydomonas flagella* realizado por tomografía crio-electrónica (cryo-ET), en corte transversal (B) y su vista longitudinal (C). Referencias: At; túbulo A, Bt; túbulo B, CPC; Central Pair Complex, IDA; Inner Dynein Arm, ODA; Outer Dynein Arm, RS; Radial Spoke [32].

Estructuras accesorias al axonema

-PFR o Paraflagellar Rod, es una estructura reticular que se extiende a lo largo del axonema. A pesar que su ultra-estructura ha sido bien caracterizada, es poco lo que se conoce a nivel de su composición y su función en el flagelo, aunque ciertos estudios han sugerido que la presencia de esta estructura es un pre-requisito para la motilidad del flagelo [31], [35], [36], [29].

-FAZ o Fagellum Attachment Zone, es una estructura única en *Trypanosoma* y algunos protozoarios emparentados [37]. Es una larga estructura del citoesqueleto que conecta al esqueleto del flagelo con el citoesqueleto de la célula a través de la membrana tanto del flagelo como de la célula. Se ha demostrado que en *Trypanosoma brucei* esta estructura actúa como una "regla celular", que regula el largo de la célula y la posición de los organelos, siendo crítica en la división celular y la diferenciación del parásito [38], [35], [36], [29].

Funciones del flagelo

Notablemente, el rol del movimiento flagelar en los protozoarios, no está limitado al desplazamiento de la célula, sino que además contribuye al ingreso de nutrientes y la división celular. Por ejemplo, en *Trypanosoma brucei* se reconoce que el flagelo es crucial tanto en la motilidad, como en procesos como la morfogénesis y citocinesis, controlando tanto el tamaño como la forma celular, dirige la citocinesis y la segregación de organelos. La interacción parásito-célula hospedera en el momento de la invasión se logra en gran medida por moléculas flagelares que median la unión a los tejidos del hospedero, obtienen e ingresan del mismo factores de crecimiento, promoviendo la supervivencia del parásito a través de la supresión del sistema inmune [39]. También se ha demostrado que para la viabilidad del estadio sanguíneo es esencial el movimiento del flagelo, ya que una falla en la función del flagelo lleva a una pérdida de citocinesis en el estadio sanguíneo [40]. En esta misma línea, mutantes knockdown para proteínas flagelares ("Component of Motile Flagella": CMF) de *T. brucei* demuestran que hay una correlación directa entre la formación de "clusters" de células con citocinesis incompleta y defectos en la motilidad de los parásitos. Por lo tanto, el flagelo es esencial para la patogénesis de la enfermedad y el desarrollo del parásito en el hospedero [41].

Para el caso de Trypanosoma cruzi, el estadio tripomastigota no es replicativo, por lo que no se observa la importancia del flagelo a nivel de la citocinesis y morfogénesis a este nivel, pero sí en el estadio epimastigota. En la replicación de epimastigotas se ha identificado el orden de los eventos que se suceden en la mitosis y citocinesis, y se determinó que la duplicación del flagelo dirige las mismas. El flagelo comienza a duplicarse y emerge del bolsillo flagelar durante la fase G2 del ciclo celular, unas 5 h luego de duplicado el ADN del núcleo y el kinetoplasto, pero queda con un tercio del tamaño final al entrar en la mitosis. A esta altura también se segrega el kinetoplasto y el bolsillo flagelar casi simultáneamente. El alargamiento del flagelo a su tamaño final ocurre durante la citocinesis, junto con la segregación del núcleo [42]. Esta sucesión de eventos, asociado al hecho de que T. cruzi presenta FAZ en su flagelo (estructura que en T. brucei regula el largo de la célula y la posición de los organelos) pueden ser indicadores de que en este parásito el flagelo también dirige la segregación y posición de organelos durante la división celular.

1.2.7. Otros componentes celulares relevantes

El bolsillo flagelar

El bolsillo flagelar, es una invaginación profunda de la membrana plasmática, ubicada en la región anterior de la célula, donde se localiza la base del flagelo. Representa un subdominio de membrana, con una composición proteica única, especializado en el ingreso de la mayor parte de los nutrientes via endocitosis (de hecho es el único lugar del parásito donde ocurre este proceso), secreción de proteínas al medio extracelular, e integración de proteínas de membrana en la superficie celular [43]. Actualmente se reconoce el bolsillo flagelar como el sitio de eliminación de agua desde la vacuola contráctil durante el proceso de RVC (Regulatory Volume Decrease: descenso regulador del volumen) mediante el cual ante un estrés hiposmótico las células inicialmente aumentan su volumen pero pronto vuelven a su volumen normal [44].

Complejo de la Vacuola Contráctil

Este complejo consiste de dos estructuras; una vacuola central, y una red de túbulos y vesículas que la rodean, llamado Espongioma. Ambos, espongioma y vacuola forman una red interconectada y estable que colapsa durante la sístole [45] y presenta un tiempo de pulsación (periodo entre dos sístoles) de aproximadamente 1 minuto [46]. En el espongioma fue descrita una proteína denominada "Vacuolar-type H+-ATPases", que se encuentra principalmente asociada a esta estructura, formando unas "clavijas" de uno 15 nm, que probablemente le brinde el gradiente electroquímico que permite el movimiento de iones a través de la vacuola, propiciando la osmorregulación [45].

Al igual que como ocurre con la osmorregulación de células vertebradas, los protozoarios como T. cruzi pueden liberar osmolitos e iones, pero una parte del mecanismo de regulación osmótica se produce a través la liberación de agua por el Complejo de la Vacuola Contráctil (CVC). Otra importante función de la vacuola contráctil, recientemente descrita, es la de la homeostasis del calcio. Se han descrito proteínas como Calmodulinas y ATPasas de Ca^{2+} del tipo PMCA, o "Plasma membrane Ca^{2+} ATPase" (proteínas que remueven el Ca^{2+} intracelular). Hay estudios que comprueban que la actividad de la propia vacuola depende de concentración de calcio y que participa en el almacenamiento del mismo [45].

La Figura 9 muestra la estructura del CVC y su relación espacial con otras estructuras como el bolsillo flagelar y los acidocalcisomas.



Figura 9 – El Complejo de la Vacuola Contráctil. (A) Micrografía de transmisión de epimastigota mostrando el Complejo de la Vacuola Contráctil (CV). Las flechas indican el espongioma colapsado. (B) Micrografía de transmisión de epimastigota en fase G2 mostrando la vacuola contráctil y los túbulos interconectados (marcados con flechas) que forman el espongioma (Sp). (C) Sección virtual mostrando la vacuola contráctil (CV) acoplada al bolsillo flagelar (FP) y la región electrondensa entre ambas estructuras. (D) Sección virtual y modelo 3D del Complejo de la Vacuola Contráctil y el bolsillo flagelar (FP), donde se observa una deformación en el bolsillo flagelar (flecha negra), y se forma un túbulo del espengioma que se conecta con la vacuola central (flecha blanca). (E) Modelo 3D del Complejo de la Vacuola contráctil y el bolsillo flagelar (FP), mostrando el espongioma (Sp) conectado con el CV (flechas). Se observan también algunas vesículas conectadas al espongioma (marcadas con flechas). (F) Modelo 3D que muestra la organización del CVC y las estructuras aledañas, como ribosomas (Rb), acidocalcisomas (Ac) y el núcleo [47].

Acidocalcisomas

Son organelos que actúan como un depósito ácido de calcio, inicialmente descubiertos en *Trypanosoma*, pero identificados en un amplio rango de organismos, incluidos el ser humano y organismos procariotas (ambos tipos de organismos presentan organelos "tipo acidocalcisomas"), indicando que estos compartimentos celulares fueron adquiridos antes de la divergencia entre células procariotas y eucariotas, manteniéndose a lo largo de la evolución [48]. Son organelos esféricos de unos 0,2 μ m en *T. cruzi*, identificados como gránulos electrón-densos, distribuidos a lo largo de toda la célula de forma azarosa. Presentan un contenido rico tanto en Ca²⁺, como en Mg²⁺, Na⁺ y en fósforo inorgánico (PP_i). A su vez contiene cadenas lineales de pocos o cientos de fosfatos (P_i) denominados polifosfatos (poliP), donde las más abundantes son poliP₃, poliP₄ y poliP₅. Se ha propuesto que esta acumulación de poliP en los acidocalcisomas tiene la finalidad de reducir el efecto osmótico de una gran cantidad de fosfato en el citoplasma [48].

Como funciones de los acidocalcisomas, además de la osmorregulación (que será abordada en profundidad en la siguiente sección) encontramos:

Almacenamiento de \mathbf{P}_i , \mathbf{PP}_i y poliP Se ha determinado que la concentración de poliP decrece rápidamente ante un estrés hiposmótico y aumentan ante uno hiperosmótico, en respuesta al estrés generado por cambios ambientales. En otros parásitos, las concentraciones de poliP también ha sido asociada a la virulencia de los mismos.

Almacenamiento de cationes Además de la alta concentración de Ca^{2+} , se almacenan otros cationes como Mg^{2+} , $Na^+ y K^+$. Con respecto al primero de ellos, se ha determinado que su concentración en acidocalcisomas en tripomastigotas y amastigotas extracelulares juega un papel importante en la capacidad de estos para invadir células.

Homeostasis del pH Las cadenas de poliP, además de participar de la osmorregulación y la virulencia del parásito, juegan un importante rol en la regulación del pH intracelular. Esta actividad reguladora esta mediada por la enzima de tipo V-H+-PPasa (pirofosfatasa que se usa como marcador de acidocalcisomas), la cual genera H⁺ producto de la hidrólisis de poliP.

En la Figura 10 podemos apreciar la estructura de los acidocalcisomas [44].



Figura 10 – Acidocalcisomas en epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Micrografías electrónicas de transmisión, mostrando el bolsillo flagelar (FP), los acidocalcisomas (AC), la vacuola contráctil (CV), el espongioma (SP), el núcleo (N), el kinetoplasto (K) y reservosomas (R). En la esquina superior izquierda muestra una ampliación de la zona del espongioma (túbulos marcados con flechas blancas), mientras que la esquina inferior derecha muestra la ampliación de un acidocalcisoma con una inclusión electrón-densa (flecha negra) y una periferia también electrón-densa. Escala de la imagen principal: 2,5 μ m, escala de ampliaciones: 0,2 μ m [44].

1.2.8. Osmorregulación mediada por CVC y acidocalcisomas

Una de las principales características de T. cruzi es la capacidad de sortear fluctuaciones extremas de osmolaridad desde el aparato digestivo del insecto vector, al medio ácido del fagolisosoma cuando invade una célula mamífera, al citosol de dicha célula una vez liberado del fagolisosoma. El estadio infectivo tripomastigota sanguíneo pasa de una osmolaridad de 600-700 mOsm/kg en la orina del triatomino, para encontrarse rápidamente con el fluido intersticial del mamífero con una osmolaridad mucho menor (300 mOsm). Claramente el parásito debe tener mecanismos fuertes de adaptación a medios hipo e hiperosmóticos [45].

Ante la reducción de la osmolaridad en el medio externo las células inicialmente aumentan su volumen pero pronto vuelven a su volumen normal mediante un proceso denominado descenso regulador del volumen (Regulatory Volume Decrease: RVC), que se logra por la liberación de varios iones inorgánicos (como Na⁺ and K⁺) y orgánicos (como aminoácidos) al medio extracelular. Este mecanismo se encuentra tanto en epimastigotas, como amastigotas y tripomastigotas [45]. Sin embargo, se ha determinado que por sí sola, la liberación de osmolitos no es suficiente para el regulación del volumen celular en *T. Cruzi*, y que es necesaria la acción del CVC para un completo proceso de RVC [44]. Se ha descrito que ante un estrés hiposmótico en epimastigotas, se produce una modulación en los niveles de AMPc y se produce una reorganización en los microtúbulos que afectan el tráfico de TcAQP1 (acuaporina de *T. cruzi*) desde acidocalcisomas a la vacuola contráctil [44].

Este proceso de osmorregulación también se encuentra mediado por los acidocalcisomas, donde el P_i proveniente de la hidrólisis de poliP, es transferido a la vacuola contráctil, generando un gradiente favorable para el ingreso de agua a la vacuola y de allí al exterior de la célula. Para ello, en condiciones hiposmóticas, los acidocalcisomas se fusionan al espongioma y le transfieren acuaporinas (proteínas de canal que participan del transporte de agua). Se ha propuesto que el mecanismo por el cual ocurre el RVC se debe a un aumento inicial en el volumen celular que produce un pico de concentración de AMPc intracelular, lo que resulta en una fusión de los acidocalcisomas a la vacuola contráctil dependiende de microtúbulos; esto produce una traslocación de acuaporinas al CVC. Simultáneamente, una elevación de amonio y su secuestro por los acidocalcisomas, genera la activación de polifosfatasas como V-H+-PPasa en estos organelos, que cliva poliP y libera P_i y otros osmolitos. El gradiente osmótico resultante secuestra agua del citosol con ayuda de las acuaporinas, la cual es eliminada a través del bolsillo flagelar.

En síntesis, el estrés hiposmótico activa una ruta de señalización dependiente de AMPc y de microtúbulos, que resulta en la transferencia de acuaporinas desde los acidocalcisomas a la vacuola contráctil [44]. Esto permite el secuestro y eliminación de agua vía CVC-bolsillo flagelar.

La Figura 11 muestra el modelo propuesto para el proceso de RVC en T. cruzi [45].



Figura 11 – Modelo propuesto para el proceso de descenso regulador de volumen (RVC) en *T. cruzi*. El incremento de volumen celular causa la activación de adenil ciclasa que provoca un pico en la concentración intracelular de AMPc. Esto activa proteinkinasas, liberación de aminoácidos y fusión de acidocalcisomas al CVC dependiente de microtúbulos, con la consiguiente traslocación de acuaporinas al CVC. Un aumento en el amonio y su secuestro en acidocalcisomas activa polifosfatasas que clivan poliP, liberando P_i y otros osmolitos de fosfatos, aminoácidos básicos y Ca²⁺. Como resultado, se produce un gradiente osmótico que secuestra agua en el CVC a través de la acción de acuaporinas, y la elimina por el bolsillo flagelar [45].

1.3. Proteínas con repetidos ricos en leucina (Leucine Rich Repeat proteins)

Las proteínas con motivos LRR (Leucine Rich Repeat) han sido identificadas en todo el árbol evolutivo, desde bacterias, virus, archaeas y eucariotas. Hasta la fecha se sabe que todo ser vivo tiene al menos una proteína LRR. El motivo LRR está descrito en 98000 proteínas [49]; 25.597 en PFAM, 20.085 proteínas en SMART, 35.060 proteínas en PROSITE y 43.912 proteínas en InterPRo [50].

Las proteínas LRR son receptores hormonales, receptores tirosina quinasa, moléculas de adhesión celular, factores de virulencia bacterianos, enzimas o glicoproteínas de unión a la matriz extracelular, entre otras. Todas las proteínas con motivos LRR están involucradas a través de interacciones proteína-proteína en diversos procesos como transducción de señales, adhesión celular, reparación de ADN, recombinación, transcripción, procesamiento de ARN, resistencia a enfermedades, reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos, apoptosis, autofagia y activación del sistema inmune innato entre otros. Además los dominios LRR pueden ser críticos para la morfología y dinámica del citoesqueleto [51], [52], [53], [54], [55], [49].

1.3.1. El motivo LRR

El motivo LRR consiste de regiones de 20 a 30 aminoácidos de largo y está formado por dos segmentos; un segmento conservado (denominado HCS: Highly Conserved Segment) y un segmento variable (VS: Variable Segment). El HCS puede ser de tipo LxxLxLxxNxL de 11 residuos o LxxLxLxxCxxL de 12 residuos. Para cada caso "x" corresponde a cualquier residuo, "L" es Leu, Val o Ileu, "N" corresponde a Asn, Thr, Ser o Cys, y "C" corresponde a Cys o Ser. Los motivos LRR forman una unidad estructural que consiste en una corta hebra- β y una variedad de estructuras secundarias conectadas por "loops". Tres residuos en las posiciones 3-5 del HCS forman la hebra- β pequeña. Las diferentes hebras- β de los múltiples repetidos se apilan de forma paralela, formando la cara cóncava del motivo. La naturaleza hidrofóbica de los residuos conservados del HCS contribuye a que la región cóncava de las LRR sea generalmente hidrofóbica. La cara convexa está formada por las estructuras secundarias aportadas por el VS como por ejemplo hélices- α , hélices 3_{10} o hélices poli-prolina II (PPII). Esta estructurales (el HCS junto con el VS) se pueden repetir en tándem de 2 a 97 veces en una proteína, dispuestas en forma de solenoide. La molécula resultante adopta en muchos casos una forma de herradura de caballo, o forma de banana ("banana shaped") en los casos donde los repetidos LRR no son numerosos [56], [50], [57], [58].

1.3.2. El segmento variable (VS) y las familias de proteínas LRR

El VS determina la familia a la que pertenece cada proteína, en función del tamaño del repetido, su secuencia y la estructura terciaria que forma. Hasta la fecha hay nueve familias de proteínas LRR caracterizadas; Típica, tipo RI (Inhibidor de Ribonucleasa), CC (contienen Cisteína), PS (específicas de plantas), tipo SDS22 (tipo SDS22 de *Saccharomyces cerevisiae*), Bacteriana, TpLRR (tipo LRR de *Treponema pallidum*), IRREKO y LRR no canónicas [50], [57], [58], [51], [49].

La tabla 1 muestra un resumen de las familias LRR y las secuencias consenso de cada tipo de repetido LRR [49].

Familia LRR	Largo repetido	HCS consenso	VS consenso
RI-like	28-29	LxxLxLxx(N/C)xL	xxxgoxxLxxoLxxzxxx
	28	LxxLxLxxNxI	GxxGxxxLxxxLxxNxx
	29	VxxLxLxxNxLL	xxxxxxxLxxxLxxxxxx
	30	V/LxxLxLxxNxL	gxxxgxxLxxxLxxxLxx
Cysteine-containg (CC)	25-27	LxxLxLxxCxxIz	TDxxoxxLazxcxx
CC_sub(GALA-type)	25	LxxLxLxxCxz(L/I)	tdxgOxxLaxz
SDS22-like SDS22-like_sub	21-23 23 22 24-25	VxxLxLxxNxI LxxLxLxxCxxL LxxLxLxxTxV LxxLxLxx(C/T/S)xzL	xxIxxLxzxLxx xxLxxLxxLxx xxLxPLxGLxx TDxxLxxLxxLxx
Bacteriana	20	LxxLxVxxNxL	ssLP(e/D)LPxx
	21	LxxLxVxxNxL	xxLPxxLPxx
	22	LxxLxVxx(N/C)xxL	xxLPxxLPxx
Plant-Specific (PS) PS_sub1 PS_sub2	23-25 24 24 23 24	LxxLxLxxNxL LxxLxLxxNxF LxxLxLxx(N/T)xV LxxLxLxxNxL LxxLxLxxCxxL	(S/t)gzxxIPxxLGxLx xGxLPxxLgxLxx xxLPxxLxxLxx xxLpxxLxxLxx SGxLPxxxWxxMxx
Típica	$\begin{array}{c} 20\text{-}27\\ 24 \end{array}$	LxxLxLxxNxL LxxLxLxxNxL	xxLpxxoFxzxLxx xxLpxx(A/T/S/o)FxxLxx
TpLRR	23-25	LxxIxLxzxxL	xxIgxxAFxxCxzx
	23	LaxaxLPxxV	xxaxxxaFxxCxx
	22	LxxLxLPxxV	xxIxxxAFxxNx
IRREKO	22	LxxLxLxxNxL	xxLDLxx(N/L/Q/x)xxx
	21	LxxLxCxxNxL	xxLDLxx(N/L/x)xx
SDS22-like no canónica	24	VgGxLxLxxNxxL	tDLxGLsnLts
	24	VgVdLxLxxNdL	tDLxGLsnLes
IRREKO no canónica	24	VgGxLxLxxNxaL	m tsVdFgsLts
	22	VgGxLxLxxNxL	m tsLdFgxLtx
Bacteriana no canónica	21	VkGdFDCSgNxL	tSLeGaPke
TpLRR no canónica	24	FxGxLxIPxxV	tsIxxxAFxxCxx

Tabla 1 – Secuencia consenso de los diferentes tipos de repetidos LRR. Referencias: x (cualquier aminoácido), o (aminoácido apolar), z (deleción frecuente), las letras en mayúscula representan una probabilidad de ocurrencia mayor al 30 % de dicho aminoácido en esa posición [49].

1.3.3. Familias de proteínas LRR

RI-LRR: Ribonuclease Inhibitor-like LRR

La proteína Inhibidor de Ribonucleasa porcina (pRI: porcine Ribonuclease Inhibitor) fue la primer proteína LRR de estructura tridimensional determinada por cristalografía en 1993 [59]. La estructura de la mayoría de las RI de vertebrados consta de 15 repetidos de 28-29 residuos cada uno, formando un motivo de orden mayor de 57 residuos de largo. Sin embargo, es también común encontrar RI-LRR con repetidos de sólo 28-29 residuos, sin formar supermotivos. La secuencia consenso de esta familia es LxxLxLxx(N/C)xLxxxgxxLxxoLxxzxxx [54], donde las mayúsculas representan una ocurrencia mayor al 50 % del residuo en este tipo de motivos, mientras que las minúsculas representan una ocurrencia entre un 30 % y un 50 %. "o" corresponde a un residuo no polar, "z" representa una deleción frecuente y "x" representa a un residuo no conservado. En subrayado se encuentra marcado el HSC [49].

CC-LRR: Cysteine-Containig LRR

Este motivo presenta una secuencia consenso es LxxLxLxC(z/x)ITDxxxxLaxzxxxx [54] que consta de unos 25-27 residuos. En negrita se encuentra marcado el HSC, "o" corresponde a un residuo no polar, "z" representa una deleción frecuente y "x" representa a un residuo no conservado. Existe una subfamilia descrita denominada GALA-LRR, de 24 residuos de largo, identificada inicialmente en proteínas Gala, de secuencia consenso LxxLxLxxCzLI(t/g)dxgOxxLaxz (presentes en bacterias y algunos organismos eucariotas) [60]. En este caso las mayúsculas y las minúsculas indican una identidad mayor al 60 % y entre un 20 % y 60 %, respectivamente [49].

LRR tipo SDS22

LRR Bacteriana

Su secuencia consenso del motivo LRR es LxxLxLxxNxLxxLP(e/d)LPxx [54], de 20-22 residuos de longitud. Esta familia, como su nompre lo indica, es frecuente en bacterias como Yersinia pestis y Shigella flexneri [49].

PS-LRR: Plant-Specific-like LRR

Su secuencia consenso es LxxLxLxxNxL(t/s)gzIPxxLGxLxzx [54], con un largo de 23-25 residuos. Las proteínas PS-LRR tienen su origen en plantas, pero no son específicas de estos organismos, ya que se las puede encontrar también en bacterias y otros organismos como *Leishmania spp*, donde la proteína PSA (Promastigote Surface Antigen), conocido factor de virulencia de este parásito es una proteína PS-LRR [49].

LRR Típica

Es la familia más abundante, siendo su secuencia consenso **LxxLxLxxNxL**xxDpxxoFxzxLxx [54], de unos 20-27 aminoácidos de largo, aunque el tamaño usual es de 24. En la cara convexa de la proteína, la estructura secundaria del VS Típico adopta mayormente la forma de hélices- α consecutivas, hélices- α más PPII, o PPII más hélices- α [57], [50]. Como ejemplo de esta familia tenemos a las proteínas TLR, importantes receptores del sistema inmune innato de vertebrados (ver imagen e de Figura 12).

TpLRR

Treponema pallidum fue el primer organismo en el cual se identificó este motivo, de allí su nombre [61]. Su secuencia consenso es LaxaLPxxVxxaxxaFxxCxx, donde "a" puede ser Ala, Val, Leu, Ile, Tyr o Met, con un largo de 23 residuos. Como características de este tipo de proteínas encontramos una secuencia HCS de 10 residuos de largo, una VS, muy similar a la secuencia de LRR-típica y generalmente presenta Pro en la posición 7. Esta familia de proteínas está presente en numerosas especies, incluyendo eucariotas como Trichomonas vaginalis y Entoameba, archaeas como Methanosarcina y bacterias como Mycoplasma [49].

IRREKO

El motivo IRREKO es un motivo típicamente bacteriano, encontrándose en proteínas como la InlJ. Su secuencia consenso puede ser LxxLxLxxNxLxxLDLxx(N/L/Q/x)xx o LxxLxCxxNxLxxLDLxx(N/L/x)xx[57], donde "D" es Asp y "Q" es Gln. El largo del motivo completo es de unos 20-22 aminoácidos. Las proteínas de esta familia tienen la particularidad de tener motivos de "periodicidad anidada" (IRREKO significa anidado en japonés); esto significa que los motivos LRR consisten en una alternancia de unidades de 10-11 residuos de cuya secuencia es LxxLxLxxNx(x/-), donde "-" representa una posible deleción. Su conformación suele ser una hebra- β extendida [50], [57], [49].

La Figura 12 muestra la estructura tridimensional de algunas proteínas LRR representativas de ciertas familias.



Figura 12 – Estructura tridimensional de proteínas LRR. (a) Inhibidor de ribonucleasa porcino (pRI), de la familia tipo RI [62] interactuando con su ligando, Ribonucleasa A, (b) Proteína GALA, subtipo de proteínas tipo CC-LRR [60], (c) y (d) InlA interactuando con su ligando E-cadherina [56] e InlB de *Listeria monocytogenes* [63], pertenecientes a la familia tipo SDS22, (e) TLR3, perteneciente a la familia Típica [56], (f) YopM de Yersinia pestis, perteneciente a la familia Bacteriana. Se puede ver en todas las proteínas la disposición en tándem de los repetidos formando una estructura tipo solenoide que da lugar, en algunos casos a una forma tipo herradura, mientras que en otros forma una estructura tipo banana. En cada repetido las flechas indican hebras- β generadas por los residuos 3-5 del HCS en la región cóncava de la proteína, mientras que los bucles indican hélices- α generadas por las regiones VS en la zona convexa de la proteína.

1.3.4. Evolución de las proteínas LRR

La relación evolutiva entre las proteínas LRR todavía no está clara, existiendo tres tipos de hipótesis:

1. Todas las familias de proteínas LRR surgieron independientemente en la evolución [64], [60].

- 2. Todas las familias tienen un origen común [65].
- 3. Al menos algunas de las familias LRR se originaron de forma independiente [51].

Matsushima y Kretsinger [49] realizaron un análisis tanto de la secuencia aminoacídica, como de la estructura de proteínas LRR, volcando los siguientes resultados:

- Los Supermotivos de LRR están formados por repetidos Bacterianos y Típicos, y se encuentran en proteínas como los TLR (Toll-Like Receptor), y "Proteoglicanos de LRR pequeños".
- El primer repetido del dominio Típico es generalmente Bacteriano.
- Existen proteínas, como RANGAP1 de perro y mono rhesus, cuyo dominio presenta repetidos tipo PS_sub1-LRR y RI-LRR.
- En insectos, las proteínas LRR generalmente tienen repetidos Típicos y tipo SDS22.
- IRREKO generalmente coexiste con repetidos Típicos y Bacterianos.
- En muchas proteínas coexisten IRREKO no canónicos con repetidos tipo SDS22 no canónicos.
- El patrón hidrofóbico de la secuencia consenso de PS-LRR de Leishmania es igual al de PS-LRR.
- Existen LRR que no pueden ser clasificadas en ninguna familia.
- Las proteínas LRR de virus son claramente diferentes de aquellas en procariotas y eucariotas.

Estudios evolutivos de las familias LRR han determinado que al menos las familias Típica, SDS22, Bacteriana, IRREKO y LRR No canónicas presentan un ancestro común [57], [58], [51], [52], [54].

En función de estos resultados, y siguiendo la línea de Andrade et al [65], Matsushima y Kretsinger proponen que todos los dominios LRR, canónicos y no canónicos, comparten un precursor común, cuya secuencia consenso es LxxLxLxxNx(x/-). Este precursor se encontraba en el ancestro que dio origen a todos los organismos eucariotas [49].

La dificultad de poder realizar un árbol evolutivo que relacione todas las familias LRR existentes a ese único precursor e inferir los patrones de duplicación para cada una radica en que existen otros mecanismos evolutivos, como la "transferencia horizontal de genes" (HGT: Horizontal Gene Transfer) y la conversión de genes, que han intervenido en la divergencia evolutiva de las familias LRR [49].

1.3.5. Las internalinas (Inls) de Listeria monocytogenes como ejemplo de proteínas LRR

La fagocitosis es un mecanismo mediado por vías de señalización activadas por receptores específicos en la membrana celular. Este mecanismo está limitado a una pequeña clase de células del Sistema Inmune especializadas, como son los macrófagos, neutrófilos y monocitos, quienes usan dicho mecanismo para la eliminación de patógenos o de restos celulares. Sin embargo, bacterias como *Listeria monocytogenes*, son capaces de invadir células no fagocíticas mediante un mecanismo muy similar a la fagocitosis, denominado "mecanismo de cremallera". El mismo es inducido mediante la interacción directa entre proteínas de la superficie de la bacteria y receptores en la superficie de la célula hospedera.

La bacteria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* es el agente etiológico de Listeriosis, enfermedad transmitida por carne o lácteos contaminados, que presenta una mortalidad de 30 %, atacando preferentemente pacientes inmunodeprimidos, embarazadas y recién nacidos. Una vez ingerida, *L. monocytogenes* puede colonizar el intestino y generar gastroenteritis. Además tiene la capacidad de cruzar la barrera intestinal y diseminarse a los ganglios linfáticos mesentéricos, el bazo y el hígado, así como cruzar las barreras placentaria y la hematoencefálica [66], [67]. *Listeria monocytogenes* tiene entonces, la capacidad de invadir células no fagocíticas, sobrevivir en células fagocíticas y traspasar numerosas barreras inmunólogicas.

La Figura 13 resume los diferentes pasos en la invasión y ciclo de vida de L. monocytogenes en el hospedero [68].



Figura 13 – Ciclo celular de *L. monocytogenes.* (1) *L. monocytogenes* se adhiere a la superficie de células epiteliales a través de la interacción de InlA e InlB de su superficie celular con E-cadherina y el receptor tirosin/kinasa Met, respectivamente. (2) En la internalización, es engullida en una vacuola parasitófora. (3) *L. monocytogenes* lisa la membrana de la vacuola a través de la secreción de una toxina denominada LLO (listeriolisin O). (4) *L. monocytogenes* usa la proteína ActA para explotar la maquinaria de polimerización de actina y facilitar su movimiento intracelular denominado "cola de cometa". (5) Utilizando esa misma motilidad a través del citoesqueleto de actina, induce su diseminación a otras células vecinas a través de la formación de una saliente en la membrana plasmática de la célula infectada. (6) Una vez internalizada por una célula vecina, *L. monocytogenes* se confina en una vacuona de doble membrana de la que escapa para reiniciar su ciclo de vida [68].

El mecanismo de entrada de *L. monocytogenes* a células no fagocíticas depende al menos de dos proteínas, Internalina A (InlA) e Internalina B (InlB), ambas proteínas pertenecientes a la "familia de Internalinas", compuesta por un total de 25 proteínas que comparten un péptido señal en el extremo N-terminal y una serie de repetidos LRR del tipo SDS22 [69] [66], [67]. Dado que el blanco de InlB (la proteína Met, una tirosin-kinasa) es una molécula ubicua en las células humanas, InlB puede mediar la internalización de *L. monocytogenes* en un amplio rango de células. Sin embargo lo mismo no ocurre con InlA, cuyo ligando se encuentra expresado en un número restringido de células, principalmente epiteliales [67].

La Figura 14 muestra la estructura tridimensional de algunas de las Internalinas representativas [70].



Figura 14 – Estructura de Internalinas de *L. monocytogenes.* (A) Estructura de InlB e InlH. (B) Estructura del complejo InlA-E-cadherina (verde), a la derecha se observa el mismo complejo con una rotación de 90°. (C) A la izquierda la estructura típica del repetido LRR de 22 residuos, indicando en rojo las hebras- β y en azul las hélices 3_{10} , en amarrillo los residuos del núcleo hidrofóbico. A la derecha, comparación entre las secuencias consenso de InlA e InlJ, donde los residuos conservados están marcados con letras de colores [70].

Internalina A (InlA) y E-cadherina

InlA es una proteína de unos 800 residuos de largo, con 15 repetidos LRR tipo SDS22, los cuales forman el sitio de reconocimiento del ligando; la proteína E-cadherina [67]. E-cadherina es una molécula transmembrana que se expresa en la cara basolateral de las células epiteliales, y es responsable de las "uniones adherentes" dependientes de Ca²⁺ entre dos células vecinas. A través de su dominio extracelular interactúa con otra E-cadherina de una célula vecina. El dominio intracelular de esta molécula interactúa con α y β cateninas, que la anclan al citoesqueleto de actina de la célula. Otras moléculas que participan de la interacción son la miosina tipo VIIa y vezatina (ligando de la anterior) [66].

Se ha determinado que en el momento de la invasión de L. monocytogenes, todas las proteínas anteriormente mencionadas son reclutadas al sitio de ingreso. La interacción inicial de InIA-E-cadherina activa la cascada de señalización que recluta los componentes para la producción de más uniones adherentes. Otro complejo, denominado Arp2/3 entra en acción, también reclutado por la actividad de InIA. Este complejo recluta y nuclea filamentos de actina formando una copa alrededor de la bacteria, facilitando su ingreso en la célula epitelial [67].

La maquinaria de endocitosis también entra en juego en esta interacción y es por lo tanto reclutada, ya que se ha identificado que las moléculas de caveolina y clatrina también son necesarias para el agrupamiento de E-cadherina en el sitio de ingreso [68], aunque este proceso es explotado principalmente por InIB.

La imagen (a) de la Figura 15 esquematiza las moléculas que participan en el proceso de internalización de L. monocytogenes a la célula epitelial [66].

Internalina B (InlB) y Met

Met es una tirosin-kinasa que al unirse con su ligando, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF: Hepatocyte Growth Factor) activan una cascada de señalización de supervivencia y proliferación, e inducen un reordenamiento del citoesqueleto que participa en el desarrollo, homeostasis y regeneración tisular. También se ha asociado a esta dupla con oncogénesis y progresión tumoral [70], [66].

Se ha determinado que los mecanismos moleculares subyacentes a la internalización de *L. monocy-togenes* mediada por InIB comprenden el reclutamiento de la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina, un proceso conservado en todas las células de mamíferos. Además de la endocitosis, la interacción InIB-Met activa una cascada de señalización que estimula el reordenamiento local del citoesqueleto de actina en el sitio de ingreso. En este proceso actúan proteínas como pequeñas GTPasas Rac y/o Cdc42, proteínas WASP/WAVE, y el complejo Arp2/3, entre otras. A su vez, las balsas lipídicas (lipid rafts) también son importantes para la invasión [70].

InlB juega un papel importante en la colonización de L. monocytogenes en el hígado y el bazo, pero no se ha determinado que participe en el proceso de atravesar la barrera intestinal [70].

La imagen (b) de la Figura 15 esquematiza las moléculas que participan en el proceso de internalización de L. monocytogenes a la célula epitelial [66].



Figura 15 – Esquemas de internalización de *L. monocytogenes.* (a) Internalización mediada por InlA. E-cadherinas establecen interacciones intercelulares para formar uniones adherentes. El dominio intracelular de esta molécula estalece interacciones transitorias con el citoesqueleto de actina a través de α y β cateninas. InlA interactúa con el dominio extracelular de E-cadherina reclutando α -catenina, miosina tipo VIIa y vezatina al sitio de ingreso. (b) Internalización dependiente de InlB. Esta molécula puede estar tanto en la superficie de la bacteria, como ser liberada al medio. InlB interactúa con Met induciendo la misma cascada de señalización que la producida entre Met y su ligando HGF. Esta cascada recluta e induce la actividad de la proteína fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K), la cual genera fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato (PIP3). La formación de PIP3 inicia la reorganiación del citoesqueleto de actina que favorece la internalizción de la bacteria. El reclutamiento de CbI induce la ubiquitinación de Met, desencadenando la endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina de este receptor, y con él, la internalización de *L. monocytogenes* [66].

Otras Internalinas

Se han asociado cuatro Internalinas al proceso infectivo de *L. monocytogenes*, pero ninguna de ellas actuando en el proceso de invasión como InlA o InlB. Estas proteínas son InlC, InlH, InlJ y Lmo2026.

- **InIC** Es una pequeña Internalina que se secreta a nivel intracelular. Su sobreexpresión aumenta la virulencia del parásito, y aunque su función no es clara todavía, se sugiere que puede estar participando cuando la bacteria está en la etapa intracitosólica y en el proceso de diseminación intercelular.
- InlH Su estructura es muy similar a la de InlB, pero Met no interactúa con ella. Tampoco es clara su función, sin embargo, se le reconoce un rol importante en la colonización del bazo y el hígado.

- **InlJ** Si bien no se ha identificado una influencia de esta Internalina en la entrada a células epitaliales, multiplicación o diseminación entre células, se determinó que mutantes con una deleción de InlJ tienen una virulencia significativamente atenuada.
- **Lmo2026** Es una internalina probablemente asociada a la multiplicación de *L. monocytogenes* en el cerebro [70].

Es claro que no todas las Internalinas de *L. monocytogenes* están implicadas directamente en el proceso de internalización en las células. Algunas de ellas participan en otros procesos que promueven la invasión y persistencia de este patógeno en el hospedero, como son la capacidad de atravesar diferentes barreras, colonización en diferentes órganos, multiplicación o diseminación a células vecinas [70]. Sin embargo, no queda dudas que esta familia está formada por proteínas que son importantes factores de virulencia. Probablemente, esa capacidad sea otorgada por la propia estructura LRR que otorga, como ya se mencionó anteriormente, una plataforma óptima para la interacción proteína-proteína.

1.3.6. Proteínas LRR en tripanosomátidos

PSA en Leishmania spp

Se ha estudiado una proteína con motivos LRR en *Leishmania spp*, el antígeno denominado PSA (Promastigote Surface Antigen), siendo una de las principales proteínas presentes en la superficie del parásito. Es una proteína de membrana que puede estar anclada a GPI o secretarse, y cuya "firma" consiste en una secuencia LRR específica, que pertenece a la familia PS-LRR. El rol que se ha descrito hasta la fecha de la PSA es la resistencia a la lisis por complemento, por lo que participa activamente en la interacción hospedero-patógeno, actuando como un importante factor de virulencia. Poseen 13 LRR que constituyen el 60 % de su secuencia y forman la región inmunodominante de la proteína. Un estudio filogenético de los genes PSA en el genoma de *Leishmania* mostró que éstos se distribuyen en 8 subfamilias que presentan divergencia tanto en la secuencia de los LRR como en su número y están distribuidos en varios cromosomas [71], [72], [73].

ESAG en Trypanosoma brucei

En *Trypanosoma brucei* se ha descrito la proteína con motivos LRR de tipo SDS22 codificada por el gen ESAG8. Los genes ESAG (Expressed Sequences Associated Genes) se encuentran asociados físicamente en las regiones teloméricas y se co-transcriben junto con los genes que codifican para las proteínas variables de superficie (VSG), principales proteínas responsables de la evasión del sistema inmune del hospedador [74].

2. Hipótesis

La virulencia de parásitos como T. cruzi depende de su capacidad para invadir células hospedadoras. La invasión requiere numerosas interacciones proteína-proteína, explotando los componentes de la célula hospedadora para facilitar su internalización y su persistencia en el proceso infectivo. La invasión a través de la inducción de reordenamientos del citoesqueleto en la célula hospedadora es una estrategia común entre varias bacterias tales como L. monocytogenes y parásitos como T. cruzi. El amplio espectro de funciones de las proteínas LRR, junto con el hecho de que muchas de estas proteínas de T. cruzi no presentan claras homologías con proteínas de mamíferos, las vuelven blancos potenciales atractivos para estudios funcionales y el diseño de agentes quimioterapéuticos.

Con los antecedentes presentados, nuestra hipótesis es que existen proteínas con motivos LRR cuyo rol es importante en la invasión, en los mecanismos de señalización y/o en la persistencia de la infección de T. cruzi.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Caracterización de proteínas con repetidos ricos en leucina de *Trypanosoma cruzi* a través de un abordaje bioinformático, funcional y proteómico, para determinar su rol en el ciclo de vida del parásito.

3.2. Objetivos específicos

- 1. Análisis bioinformático de proteínas de *T. cruzi* con motivos LRR, identificación y clasificación de estas secuencias en el genoma del parásito.
- 2. Obtención de parásitos sobreexpresantes, estudios de localización subcelular y de expresión en los diferentes estadios.
- 3. Caracterización funcional de las proteínas con LRR mediante ensayos de infección in vitro.
- 4. Identificación de interactores en el parásito, mediante purificación por afinidad de proteínas LRR asociadas a un tag, a partir de parásitos transfectantes.
4. Materiales

4.1. Reactivos químicos, fármacos y anticuerpos

4.1.1. Reactivos químicos

Tratamiento de ácidos nucleicos

- Agua destilada esteril, GIBCO
- Fenol, SIGMA
- Cloroformo
- Proteinasa K from Tritirachium album, Bio-Chemica: 2 mg/mL
- $\bullet\,$ SDS, SIGMA: 10 $\%\,\,({\rm m/v})$ en agua miliQ
- NaCl, SIGMA: 0,5 M
- dATP, THERMO: 10 mM
- dNTP mix, THERMO: 2,5 mM (cada uno)
- Agarosa, SIGMA: 1 % (m/v) en agua deionizada (agua MiliQ)
- Bromuro de etidio (BrEt): 0,05 $\mu \rm L/mL$ de solución de Agarosa 1 %
- ARNasa: 10 mg/mL
- 1 kb Plus DNA Ladder, THERMO
- Etanol: 70 %; 95 % absoluto

Tratamiento de proteínas

- Inhibidor de proteasas EDTA free, ROCHE: $0,1\,\%$ en buffer de lisis
- PMSF 100 mM: 0,1 % en buffer de lisis
- Triton X-100, SIGMA: 0,005%, 0,05%, 0,2%, 0,5% (v/v) en Buffer MME
- Tween20, SIGMA: 0.1 % (v/v) en PBS
- $\bullet\,$ BSA (seroalbúmina bovina), SIGMA: 1-2 $\%\,\,({\rm m/v})$ en PBS
- Reactivo de Bradford, SIGMA
- PageRuler Prestained Protein Ladder, THERMO: 3 $\mu \mathrm{L}$ por gel
- Membranas de Nitrocelulosa Healthcare Amersham Hybond -P Membranes, GE
- Placas auto-radiográficas, KODAK
- Iodoacetamida: 55 mM
- Tripsina: 1 $\mu g/\mu L$
- Ácido fórmico: 0,1 %

Inmunofluorescencia Indirecta

- Paraformaldehído (PFA): 4% (m/v)
- NH_4Cl_2 , SIGMA: 0,1 M
- Prolong Gold Antifade with DAPI, INVITROGEN: 5-10 $\mu \mathrm{L}$ por cubreobjeto

Cultivos de bacterias, celulares y de parásitos

- isopropil-β-D-tio- galactósido (IPTG): 0,1 M
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal): 20 mg/mL (m/v)
- Resazurina 500X: 100mM

4.1.2. Fármacos

- Ampicilina 50mM
- G418, SIGMA: 50 mg/mL
- Pen Strept Glutamin, GIBCO 100X: 1 % (v/v) en medio DMEM
- Calyculina A, ABCAM: 1-15 nM

4.1.3. Anticuerpos

Anticuerpos y diluciones utilizados en Western blots

Anticuerpos primarios:

IgG de ratón anti-HA (sc-7392, SantaCruz) Dilución 1:500-1:900 en PBS 1 % BSA

IgG de ratón anti- α -Tubulina (T5168, SIGMA) Dilución 1:50000 en PBS 1 % BSA

IgG de ratón anti-GFP (sc-9996, SantaCruz) Dilución 1:500 en PBS 1% BSA

IgG de ratón anti-3Flag (sc-166384, SantaCruz) Dilución 1:400 en PBS 1% BSA

IgG de conejo anti-TcCMF46 (no comercial, Genescript) Dilución 1:5800 en PBS 1% BSA

IgG de conejo anti-SODB (no comercial) Dilución 1:3000 en PBS 1 % BSA

Anticuerpos secundarios:

- IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a HRP (P0447, Dako Dilución 1:10000 en PBS 1 % BSA
- IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP (A6154, SIGMA Dilución 1:10000-15000 en PBS 1 % BSA

Anticuerpos y diluciones utilizados en Inmunofluorescencia Indirecta

Anticuerpos primarios:

- IgG de ratón anti-HA (sc-7392, SantaCruz) Dilución 1:50 en PBS 2% BSA
- IgG de ratón anti- α -Tubulina (T5168, SIGMA) Dilución 1:5000 en PBS 2 % BSA
- IgG de conejo anti-TcCMF46 (Genescript) Dilución 1:870 en PBS 2 % BSA

Anticuerpos secundarios:

- IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 488 (A11001, INVITROGEN) Dilución 1:1000 en PBS 2 % BSA
- IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a Cy3 (A10521, INVITROGEN) Dilución 1:1000 en PBS 2 % BSA
- IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 546 (A11010, INVITROGEN) Dilución 1:1000 en PBS 2 % BSA

4.2. Kits comerciales

Tratamiento de ácidos nucleicos

- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit, THERMO
- GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare
- Taq DNA ligase kit, INVITROGEN
- PureLink Hipure Plasmid Filter Maxiprep kit, INVITROGEN (K210017)

Tratamiento de proteínas

- Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate, THERMO
- Pierce Anti-HA Magnetic Beads, THERMO
- $\bullet\,$ NuPage Novex Gel System, THERMO: Geles desnaturalizantes Bis-Tris en gradiente $4\text{-}12\,\%$

4.3. Buffers y soluciones

4.3.1. Buffers

Tratamiento de ácidos nucleicos

Buffer TAE (Tris-Acetato EDTA) Tris-HCl, 40 mM, pH 7.6, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM
Buffer A Tris-HCl, 0,2 M, pH 8; EDTA 0,1 M

Tratamiento de proteínas

Buffer MME MOPS 10mM, EGTA 2mM, MgSO₄ 1mM

Urea Cracking Buffer Na₂HPO₄ 10mM, β -mercaptoetanol 1%, Urea 5M, SDS 1%

IP Lysis Buffer Tris 25 mM, pH 7,4 NaCl 150 mM, EDTA 1mM, NP40 1%, glicerol 5%

- Buffer de lisis 2D Tris base 40mM, Urea 7M, tiourea 2M, CHAPS $4\,\%$
- Loading Buffer 4X SDS 300 mM, Glicerol 40 %, DTT 400 mM, Bromofenol Blue (SIGMA) 6 Mm, Tris-HCl, 300 mM, pH 6,8
- Buffer de corrida electroforética Tris-Glicina-SDS 10 $\%\,$ 10X $\,$ Tris 25 mM, Glicina 0,25M, SDS $\,10\,\%\,$
- Buffer de transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa Tris-Base 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.0375 % (m/v), etanol 20 % (v/v)
- Buffer acetonitrilo/bicarbonato de amonio Acetonitrilo 30%, bicarbonato de amonio 50%

Buffer acetonitrilo/bicarbonato de amonio Acetonitrilo 50%, bicarbonato de amonio 50%

Buffer TFA/bicarbonato de amonio Acetonitrilo 50 %, TFA (ácido trifluoroacético) 0,1%

Cultivos celulares y de parásitos

 \mathbf{PBS} 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4 pH 7,4

HBS Hepes 21mM, NaCl 137mM, KCl 5mM, Glucosa 6mM, pH 7.4

4.3.2. Soluciones

Tratamiento de ácidos nucleicos

Solución fenol-cloroformo 24:1 (v/v)

Solución cloroformo-alcohol isoamílico

Solución I (Miniprep) Glucosa 50 mM, Tris-Cl, 25 mM, pH 8, EDTA, 10 mM, pH 8

Solución II (Miniprep) NaOH 0,2 M, SDS 1%

Solución III (Miniprep) Acetato de Potasio 3 M, 0,115 % Ácido acético glacial

Tratamiento de proteínas

PBS-Tween 20

PBS-Tween 20-BSA Tween 20 0,1 % (v/v), BSA 10g/L en PBS

Geles de Acrilamida 12% Acrilamida 12% (v/v), Tris-HCl, 0,38 M, pH 8,8, Dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% (v/v), Persulfato de amonio (PSA) 0,1% (v/v), N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamina (TEMED), 3 μL cada 15 mL

Solución de bloqueo de membrana de nitrocelulosa Leche descremada 5% (m/v) en PBS-Tween

Soluciones de revelado de Western blot Solución de revelado y Solución fijadora

Solución Etanol/ácido acético Etanol 40%, ácido acético 10%

Solución de tinción Coomassie coloidal Blue G-250 Sulfato de amonio 8 %, ácido fosfórico 0,8 %, Coomassie coloidal Blue G-250 0,08 %, metanol 20 %

Inmunofluorescencia Indirecta

Solución de bloqueo BSA 3 % (m/v) en PBS-Tween

Solución de permeabilización $\,$ Tritón X-100 $\,0,5\,\%$ en PBS $\,$

4.4. Líneas celulares

Bacterias XL1 Blue electrocompetentes *Trypanosoma cruzi*, cepa Dm28c [75]

- Células Vero (Células de riñón de mono verde africano)[76]
- Células HeLa (Células epiteliales de adenocarcinoma de cérvix de útero humano)[77]

4.5. Medios de cultivo

Medios de cultivo bacterianos

- Medio Luria Bertani (LB) (SIGMA) 20 g/L de agua deionizada (agua MiliQ). Esterilización por autoclavado
- Medio LB/Agar (para placas de cultivo bacteriano) 20 g/L LB, 15 g/L Agar en agua deionizada (agua MiliQ). Esterilización por autoclavado

Medios de cultivo de parásitos

LIT (Liver Infusion Tryptose) Infusión de Hígado 5 g/L, NaCl 4,4 g/L, KCl 0,4 g/L, Glucosa 2,2 g/L, Triptosa 5 g/L,Na_2HPO_4 (anhidro) 11,7 g/L , Extracto de Levadura 15 g/L, ajustado a pH 7,2. Se adiciona Hemina 25 mg/L , Estreptomicina 0,1 mg/mL

SFB (Suero fetal bovino), GIBCO

LIT SFB 10 % LIT suplementado con 10 % de SBF (v/v)

Medios de cultivo celulares

SFB (Suero fetal bovino), GIBCO

DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO

DMEM 2 % SFB DMEM suplementado con 2 % de SBF (v/v)

 $\mathbf{DMEM}~\mathbf{10}~\%~\mathbf{SFB}~$ DMEM suplementado con 10 % de SBF (v/v)

4.6. Vectores plasmídicos

- pGEM-T Vector Kit, PROMEGA
- pDIY-eGFP[78]
- pTREXn[79]

4.7. Enzimas de restricción

- *EcoRI*, THERMO (ER0271)
- *HIndIII*, THERMO (ER0501)
- Sall, THERMO (ER0645)
- Smal, THERMO (ER0661)
- SpeI, THERMO (ER1251)
- *XhoI*, THERMO (ER0691)

4.8. Oligonucleótidos diseñados

Gen	Primer	Secuencia del primer	Enzima	Amplicón (pb)
TcCLB.506945.280	LRR945.280EcoRI-F	AA <u>GAATTC</u> ATGTCGAAGGGTTACACGGTG	EcoRI	1662
	LRR945.280SpeI-R	AA <u>ACTAGT</u> CCATGCACATTCCAGTAAACCC	SpeI	
	LRR945.280HA-R	CTCGAGTTAAGCGTAATCCGGAACGTCGTAGGGGTA	XhoI	1689
		CCATGCACATTCCAGTAAAC		
TcCLB.507867.60	LRR867.60SmaI-F	AACCCGGGAATGCCCCATACTGCTGAAC	SmaI	1209
	LRR867.60Sall-R	AAGTCGACTGCCCTCCTCTTTCGATCG	SalI	
	LRR867.60HA-R	CTCGAGCTAAGCGTAATCCGGAACGTCGTAGGGGTA	XhoI	1236
		TGCCCTCCTCTTTCG		
TcCLB.506203.20	LRR203.20EcoRI-F	AAGAATTCATGGCTTCTGCAACGTCGGTG	EcoRI	633
	LRR203.20SalI-R	AAGTCGACGCGCCGCCGCTCCGCTTC	SalI	
	LRR203.20HA-R	CTCGAGTTAAGCGTAATCCGGAACGTCGTAGGGGTA	XhoI	660
		GCGCCGCCGCTCCGC		
TcCLB.504867.50	LRR867.50SalI-F	AAGTCGACATGTACTCCGTTATCCAGC	SalI	1899
	LRR867.50HindIII-R	AAAAGCTTACTCTGTCTTCAGCGTGC	HindIII	
TcCLB.511421.160	LRR421.160EcoRI-F	AAGAATTCATGATGAGCCGCATTCC	EcoRI	1362
	LRR421.160SpeI-R	AAAAGCTTACCAACCAGCATGTTCAATC	$_{\rm SpeI}$	
TcCLB.507841.30	LRR841.30EcoRI-F	AAGAATTCATGTCTGCTTTTGACTTGGCGG	EcoRI	897
	LRR841.30HA-F	GTCGACTCAAGCGTAATCCGGAACGTCGTA	XhoI	
		GGGGTAACGGTTTGGCAAATAAATGTC		
TcCLB.506773.160	LRR773.160EcoRI-F	AAGAATTCATGCGGATCGACCTCTCGC	EcoRI	1749
	LRR773.160SalI-R	AAGTCGACCAAAGGCGGAGGCGAATAG	SalI	
	LRR773.160HA-R	CTCGAGCTAAGCGTAATCCGGAACGTCGTAGGGGTA	XhoI	1766
		CAAAGGCGGAGGCGA		
TcCLB.510295.40	LRR295.40EcoRI-F	AAGAATTCATGAAACCGCAATCTGTTAC	EcoRI	847
	LRR295.40HindIII-R	AAAAGCTTAACTACTGTGGGGCAATTTG	HindIII	
	LRR295.40HA-R	CTCGAGCTAAGCGTAATCCGGAACGTCGTAGGGGTA	XhoI	874
		CTGTGGGCAATTTGAGCG		
TcCLB.507099.90	LRR099.90SmaI-F	AA <u>CCCGGG</u> AATGTACAGTAGAGTATTGGGCC	SmaI	1443
	LRR099.90SalI-R	AA <u>GTCGAC</u> TCTGCGGTATTTATCCAAATTCG	SalI	

 $\begin{array}{l} \textbf{Tabla 2} - \text{Primers diseñados para amplificar los genes LRR seleccionados. La región subrayada en la secuencia de cada primer corresponde al sitio de restricción para la enzima a utilizar en el subclonado del gen en el vector de expresión, mientras que en negrita se encuentra la secuencia para la expresión del tag HA en la región C-terminal de la proteína \\ \end{array}$

5. Métodos

5.1. Análisis bioinformático: Búsqueda y selección de proteínas LRR in silico

5.1.1. Búsqueda de secuencias LRR en Trypanosoma cruzi

El análisis bioinformático se realizó usando la cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, una cepa híbrida entre dos cepas; CL Brener Esmeraldo-like y CL Brener Non-Esmeraldo-like [80]. Ésta se encuentra bien caracterizada experimentalmente, lo que la convirtió en la primera cuyo genoma fue secuenciado [81]. Actualmente es una cepa de referencia para análisis bioinformático [80], y su genoma era el que se encontraba mejor anotado en el momento del análisis.

Una vez seleccionado el genoma a analizar, se realizó una búsqueda en la base de datos http: //tritrypdb.org[82], de la siguiente manera:

New Search/Genes/Protein features and properties/InterPro domain. Una vez allí, se selecciona la cepa CL Brener Esmeraldo-like de *Trypanosoma cruzi*, y en el parámetro "Specific Domain(s)" se colocan los textos "LRR" o "Leucine rich repeats". Este procedimiento se realizó para las bases de datos InterPro [83], PFAM [84], PROSITE PROFILES [85] y SMART [86].

El resultado final se obtiene uniendo todas las búsquedas; para cada nueva base de datos a interrogar, se selecciona la opción "Add Step", disponible en "My Strategies", y eligiendo luego la opción "Union" en el parámetro "Combine genes in step X with genes in step Y" (siendo X e Y los últimos dos pasos añadidos). Cada gen identificado se busca también en la línea Non Esmeraldo-like, dado que los genomas de ambas líneas están anotados por separado.

5.1.2. Selección de secuencias LRR con mayor identidad con Internalinas de Listeria monocytogenes

Del procedimiento 5.1.1, se obtiene un grupo de secuencias al cual se lerealizó un BLAST (Basic Linear Alignment Search Tool) con la secuencia de Internalinas A , B, C, J y H.

Este paso se agrega a los pasos anteriores de búsqueda en la base de datos tritrypdb.org [82]. El resultado se guarda como un archivo en formato FASTA de las secuencias proteicas con mayor identidad con Internalinas.

5.1.3. Aproximación in silico de la estructura de las proteínas LRR seleccionadas

Búsqueda de dominios LRR

Se realizó el análisis de la secuencia de las proteínas con la base de datos LRRSearch (http: //lrrsearch.com) para determinar el número, ubicación y tipo de dominios LRR que presentan las proteínas estudiadas. Este predictor utiliza un algoritmo denominado Position Specific Scoring Matrix (PSSM) para identificar la secuencia HCS (Highly Conserved Segment) de 11 residuos del repetido LRR, el cual es frecuentemente encontrado en los motivos LRR de un amplio rango de proteínas LRR, aún las más divergentes [87].

Se realizó también un análisis manual para cotejar la información, utilizando la estructura del VS (Variable Segment) de cada dominio para clasificar a los mismos dentro de las diversas familias de proteínas LRR [88], [57]. Las secuencias consensos pueden encontrarse en la tabla 1.

De forma paralela se analizan también las secuencias proteicas de las diferentes internalinas bacterianas, para analizar si aquellas que presentan mayor nivel de identidad con determinada internalina, también presenta el mismo tipo de repetidos LRR.

Búsqueda de otros dominios proteicos

Dado que las proteínas LRR suelen tener otros dominios asociados, aportando a la versatilidad de funciones que presenta este grupo [89], [90], [91], [92], [93], se buscaron otros dominios que puedan presentar las proteínas identificadas previamente como LRR en la base de datos InterPro (https: //www.ebi.ac.uk/interpro/)[83].

Búsqueda de SP, TM, anclaje GPI

Con el fin de determinar los posibles destinos subcelulares, se buscaron secuencias consenso para:

- Dominio TransMembrana (TMDomain: http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html)
- Péptido Señal (SignalPeptide: http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)
- Anclaje GPI (GPIAnchor: http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html)

5.1.4. Estrategia de clonado de secuencias LRR en vectores de expresión

Se optó por diferentes estrategias de clonado con el fin de contar con proteínas de fusión que expresen distintos tags. Esto permite seleccionar aquellos vectores que mejor expresen las proteínas de interés.

Clonado de secuencias en vector de sobreexpresión pDIY-eGFP

El pDIY-eGFP [78] es un vector de expresión en *Trypanosoma cruzi* derivado del vector pTREX, un vector que se integra en el genoma del parásito al presentar promotores ribosomales para la ARN polimerasa I, lo que promueve su recombinación en los loci ribosomales [94]. Esto permite una expresión de la proteína correspondiente al gen clonado en el vector. El pDIY-eGFP es una construcción muy versátil, ya que presenta numerosos tags asociados en la región polylinker, lo que permite realizar un constructo que dé como resultado la expresión de una proteína fusionada a uno o más tags. En la Figura 16 [78], se puede observar el diseño del vector entero (A) y de la región pDIY (B).

En función de la selección de tags que se desea fusionar a la proteína para ser luego expresado junto con ella, y de la secuencia propia de cada gen a clonar, es que se seleccionan los sitios de restricción a agregar en los primers que permitirán dicho clonado. Los primers que se diseñaron para amplificar las secuencias seleccionadas, contienen sitios de restricción para enzimas que se encuentran en la región polylinker. La selección de los sitios de restricción se realizó en función de dos caracteísticas principales; no estar presentes en las secuencias en cuestión, y que el corte en el vector y la ligación con el gen en esos sitios específicos permitan que la proteína que se exprese como resultado tenga asociados determinados tags elegidos (HA, 3-Flag, eGFP, o una combinación de los mismos), presentes en este vector.

Clonado de secuencias en vector de sobreexpresión pTREXn

El vector pTREXn deriva de pRIBOTEX [95], [79], pero presenta una región polylinker diferente al anterior. El esquema del vector pTREXn puede apreciarse en la figura 17. Dado que este vector no presenta integrada ninguna secuencia para la expresión de tags, fue necesario diseñar para cada gen un primer Reverse que contuviera, además de la secuencia 3' asociada a un sitio de restricción, la secuencia para la expresión del tag HA (TACCCCTACGACGTTCCGGATTACGCT) entre la secuencia y el sitio de restricción. De este modo se expresa una proteína de fusión asociada a HA en el extremo C-ter.



Figura 16 – Esquema de las principales características de los vectores pDIY [78]. A: esquema del vector completo, mostrando el promotor de β -lactamasa (P Bla), el gen de resistencia a Ampicilina (AmpR), el origen de replicación bacteriano (pUC ori) y la región polylinker donde se encuentran esquematizados los tags; en esta región los segmentos blancos representan al menos tres sitios de restricción consecutivos, el primer segmento negro corresponde a los tags que se pueden ubicar en el extremo 5': epítope FLAG triple (3-FLAG), con el sitio para clivaje por enterokinasa solapado (EK). Luego, dependiendo del pDIY seleccionado será el gen para la proteína fluorescente encontrado (pDIYeGFP si tiene el gen de enhaced GFP, pDIYmCherry si presenta el gen de monomeric Red, o pDIYmCerulean si presenta el gen de la proteína Cerulean monomérica). (En este esquema no aparece el gen de resistencia a G418, la región upstream y downstream del gen GAPDH, ni la secuencia promotora de ARNr usada para integrar el vector al genoma del parásito citemartinez1997pribotex). B: Secuencia completa de la región pDIY agregada al vector pTREX. La misma muestra el marco de lectura, los productos de la traducción del constructo, así como el codón Stop y los sitios de restricción.



Figura 17 – Esquema del vector pTREXn [79]. Se puede apreciar la región MCS (Multiple Cloning Site) conteniendo los sitios de restricción, la región Neo, que contiene el gen de resistencia a G418, AmpR representa el gen de resistencia a ampicilina, la región promotora de ARNr, que induce la integración del vector en el genoma.

5.1.5. Diseño de primers

Los primers fueron diseñados utilizando la página https://www.idtdna.com/site y construidos por la misma empresa (IDT), tomando como referencia la notación de las secuencias en la base de datos http://tritrypdb.org [82], utilizando para su diseño información de los genomas de CL Brener (Esmeraldo-like y Non Esmeraldo-like), Dm28c y Sylvio ya que esta última cepa comparte DTU (TcI) con nuestra cepa elegida, Dm28c, para los estudios *in vitro*.

Cada primer presenta un sitio de restricción agregado (antes del inicio de la secuencia para el primer Forward o primer 5' y luego la secuencia a expresar en el primer Reverse o primer 3', ya sea el último codón codificante de la proteína o la secuencia para el tag HA). Esto permite ligar los productos amplificados a los vectores en los sitios identificados en el paso 5.1.4.

Para el caso de aquellas secuencias a clonar el pTREXn, se agrega además la secuencia para expresar el tag HA en la región 3', al final de la proteína (sin el codón de terminación), lo que permite la expresión de una proteína sobreexpresante fusionada a este tag.

5.2. Aislamiento y tratamiento de ácidos nucleicos

5.2.1. Obtención de ADN genómico

El ADN genómico total fue obtenido mediante extracción con fenol-cloroformo modificada de Sambrook [96].

Los parásitos en estadio epimastigotas son lavados tres veces con PBS horas y colocados es un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Se colocan 5×10^8 parásitos en 900 μ L de buffer A (ver 4.3.1) adicionado con 50 μ L SDS 10% y 100 μ L de Proteinasa K (2 mg/mL). Se deja actuar ON (Over Night) a temperatura ambiente.

Al día siguiente se agrega 200 μL NaCl 0,5 M y 100 μL de solución fenol-cloroformo (24:1 v/v). Se mezcla por inversión.

La mezcla se centrifuga durante 5 minutos a 3000 rpm. Una vez retirada de la centrífuga, se pueden apreciar tres fases; una fase orgánica en el fondo (contiene ARN y lípidos), una interfase (proteínas) y la fase acuosa (contiene el ADN). La fase acuosa es retirada y se pasa a un nuevo tubo, descartando las otras dos fases.

A la fase acuosa se le agrega 100 μ L de solución cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifuga durante 5 minutos a 3000 rpm. La fase acuosa generada es transferida nuevamente a otro tubo al que se añaden 200 μ L de etanol absoluto a 4 °C, agitando por inversión. La mezcla se deja ON a -20 °C o durante 30 minutos a -80 °C.

Luego de centrifugar durante 10 minutos a 12000 rpm, se descarta el sobrenadante por inversión y el pellet es lavado cuidadosamente con etanol 70 %. A continuación, se retira el etanol, dejando secar el pellet durante unos minutos, y se lo resuspende en 200 μ L de agua destilada estéril (Gibco).

La cuantificación se realizó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm utilizando el equipo Nano Drop 1000 (Thermo).

5.2.2. Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo) en el buffer correspondiente. La concentración de cada oligonucleótido utilizada fue de 0,5 μ M y la de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 200 μ M cada uno, en un volumen final de 50 μ L.

En general la amplificación se realizó de la siguiente manera, según especificaciones del fabricante: -Un primer ciclo de desnaturalización del ADN genómico a 98 °C durante 5 minutos.

- 25 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 98 °C), hibridización (por lo general 30 segundos a 3 °C por debajo de la Tm más baja de los oligonucleótidos utilizados), extensión (a 72 °C durante 1 minuto por cada kpb a amplificar).

-Un último ciclo de extensión de 10 minutos a 72 °C.

5.2.3. Clonado de secuencias LRR en el vector pGEM-T

Cada producto de PCR fue purificado a partir de un gel de agarosa al 1% (m/v) utilizando GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, SIGMA) y ligado en el vector pGEM-T (Promega) según instrucciones de los fabricantes. El producto de ligación fue utilizado para transformar bacterias electrocompetentes *E. coli* XL1 Blue, como se detallará en la Sección 5.3.1.

5.2.4. Extracción de ADN plasmídico (Miniprep) del vector recombinante pGEM-T/genLRR

A las 24 h de la transformación y siembra de bacterias *E. coli* en placas LB/agar/Ampicilina/IPTG/X-Gal, se eligen colonias blancas y descartan las colonias azules. Dicha selección se basa en el método de

interrupción del gen lacZ del vector pGEM-T (y muchos otros vectores de clonado en bacterias)¹. Las colonias blancas seleccionadas son resuspendidas en 3 mL de medio LB/Ampicilina (LB 20 g/L, Ampicilina 50 μ g/ml) durante 24 h a 37 °C a 220 rpm. El medio es centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. Se remueve el sobrenadante por aspiración con pipeta y el pellet es resuspendido en 100 μ L de **Solución II**. Luego se agregan 200 μ L de **Solución III**, dejando reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agrega 150 μ L de **Solución III** y se mezcla nuevamente por inversión (15 veces) y se deja 5 minutos a temperatura ambiente.

El producto se centrifuga a 12000 rpm durante 5 minutos y se transfieren 400 μ L del sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml, agregando 1 μ L de RNAsa (10 mg/ml). Se incuba 30 minutos a 37 °C para que actúe la RNAsa. Posteriormente se agregan 800 μ L de etanol 100 % a 4 °C y se mezcla por inversión (15 veces). El producto se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos, donde se descarta el sobrenadante con pipeta y el pellet se lava con 500 μ L de etanol 70 % a 4 °C. Se centrifuga por 5 minutos a 12000 rpm y se retira el sobrenadante con pipeta, dejando secar el precipitado al aire. Dicho precipitado, conteniendo el ADN plasmídico, se resuspende en 30 μ L de agua Gibco.

Una vez culminada la extracción de ADN plasmídico se mide la concentración del mismo en NanoDrop 1000 V3.7.1 (Thermo) y verifica por gel de agarosa la presencia del plásmido. Utilizando un plásmido cerrado sin inserto como control, se eligen aquellos plásmidos cuya migración en el gel de agarosa sea menor que la del control, indicando un mayor tamaño molecular, y por ende, la posible presencia de inserto.

5.2.5. Secuenciación y análisis de plásmidos recombinantes seleccionados

Para cada caso, el plásmido recombinante pGEM-T fue seleccionado como se describió previamente en 5.2.4 y su secuenciación fue realizada por el servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo. El análisis de las secuencias se realizó manualmente, utilizando los programas Bioedit [97] y las bases de datos NCBI [98] y Tritrypdb.org [82], para evaluar que cada gen esté libre de mutaciones.

5.2.6. Clonado de secuencias LRR en vectores de expresión

Para la generación del vector de sobreexpresión recombinante, las construcciones pGEM-T/gen_LRR fueron digeridas con las enzimas de restricción correspondientes (*EcoRI*, *SpeI*, *SmaI*, *SalI*, *HindIII*) según especificaciones del fabricante (Invitrogen, Roche o NEB). Los fragmentos liberados fueron analizados en gel de agarosa, donde las bandas correspondientes a los insertos se cortaron y purificaron a partir del gel. El mismo procedimiento se realizó con los vectores de expresión, permitiendo así el clonado de las secuencias en dichos vectores.

La ligación se realizó con el Kit T4 DNA Ligase (Thermo), según especificaciones del fabricante. Para este clonado, fue necesario realizar una ligación control, compuesta por el vector abierto, sin gen. Esto se realizó porque los vectores de expresión no presentan la selección mediante lacZ, por lo que una ligación con el vector vacío oficia de control negativo, ya que al no presentar extremos complementarios (se usan dos enzimas de restricción diferentes en todos los casos para cortar el vector), no se espera religación.

5.2.7. Extracción de ADN plasmídico (Miniprep) de vectores de expresión recombinantes

A las 24 horas de la transformación y siembra de bacterias *E. coli* XL1 Blue en placas LB/agar/Ampicilina, se eligieron colonias que fueron resuspendidas en 3 mL de medio LB/Ampicilina durante 24 horas a 37 °C a 220 rpm. Se continuó con el procedimiento como se describe en 5.2.4

¹En numerosos vectores de clonado se encuentra el gen lacZ, perteneciente al operón Lac de numerosas bacterias. El producto de este gen es la enzima β -galactosidasa, la cual es capaz de hidrolizar el compuesto X-Gal en un producto insoluble de color azul. Dentro de dicho gen, en el vector, se encuentra la región polylinker con sitios de restricción, por lo que, de haber ligación con un inserto, se interrumpe el gen lacZ, y por lo tanto no se expresa la enzima en cuestión y el compuesto X-Gal no será hidrolizado, quedando así una colonia de color blanco. El color azul de una colonia es señal que el vector que se encuentra en dicha colonia de bacterias no presenta ningún inserto, mientras que una colonia blanca es indicio de que el gen está interrumpido y probablemente haya un inserto.

5.3. Cultivo y manipulación de bacterias

5.3.1. Transformación de bacterias electrocompetentes *E. coli* XL1 Blue, con el vector recombinante pGEM-T/genLRR

Las bacterias electrocompetentes XL1Blue fueron transformadas por electroporación (1 pulso a 500 V, 8 ms) con 3 μ L de producto de ligación en cuvetas de 1 mm de espesor. Luego del pulso, las bacterias fueron resuspendidas en medio LB (20 g/L en agua miliQ) precalentado a 37 °C e incubadas durante 1 hora a 37 °C con agitación de 550 rpm. Luego de este período, las bacterias fueron sembradas en placas de LB agar (LB 20 g/L, agar 15 g/L en agua miliQ) con el antibiótico de selección Ampicilina 50 μ g/mL, más 20 μ L de isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG) 1 M y 40 μ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) 2% (m/v). Se deja la placa con la siembra de bacterias ON en estufa a 37 °C.

5.3.2. Transformación de bacterias electrocompetentes $E. \ coli$ XL1 Blue con vectores de expresión recombinantes

Para cada caso se realizaron dos transformaciones, una con el producto de ligación pDIY-eGFP/gen_LRR [78], o el vector pTREXn/gen_LRR [79], y otra con su control (ligación conteniendo sólo el vector de expresión). Las bacterias electrocompetentes XL1Blue fueron transformadas por electroporación (1 pulso a 500 V, 8 ms) con 3 μ L de ligación en cuvetas de 1 mm de espesor. Luego del pulso, las bacterias fueron resuspendidas en medio LB precalentado a 37 °C e incubadas durante 1 hora a 37 °C con agitación de 550 rpm. Luego de este período, las bacterias fueron sembradas en placas de LB agar (LB 20 g/L, agar 15 g/L) con el antibiótico de selección Ampicilina 50 μ g/ml, dejándolas ON en estufa a 37 °C.

5.4. Cultivo y manipulación de parásitos

5.4.1. Cultivo de parásitos epimastigotas

En este proyecto se trabajó con la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* [75]. La forma epimastigota fue mantenida en cultivo a 28 °C en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con 10% de SBF (GIBCO).

5.4.2. Producción de líneas de Trypanosoma cruzi sobreexpresantes de secuencias LRR

La transfección se realizó lavando los cultivos de epimastigotas de la cepa Dm28c una vez con Buffer Fosfato Salino (PBS) estéril frio y dos veces más en buffer de electroporación HBS. Luego del último lavado, los parásitos se resuspendieron en HBS a una concentración de 50×10^6 parásitos/mL.

En una cuveta de electroporación de 4 mm se mezcló 450 μ L de la suspensión de parásitos con 100 μ g de plásmido en no más de 50 μ L y se dejó 10 minutos en hielo. La transfección se realizó en el sistema ECM 600® de BTX (Harvard Apparatus) utilizando como condiciones 450 voltios, 1300 μ F y 13 ohms, realizando dos pulsos de 22,5 ms cada uno. Luego de la electroporación los parásitos fueron conservados en hielo durante 10 minutos y posteriormente se transfirieron a un frasco de 25 cm² de tapa sin filtro (Corning) con 3 mL de LIT suplementado con 10% de SBF. Luego de 24 horas se agregó G418 (Gibco) a los cultivos a una concentración de 100 μ g/mL. Los parásitos fueron crecidos en concentraciones crecientes de G418 hasta llegar a 250 μ g/mL de G418.

Para cada caso se realizó además una transfección con el plásmido control (plásmido cerrado sin inserto), y otra con la línea Dm28c sin plásmido como control negativo. Luego de 1 mes de la transfección, las líneas establecidas² son evaluadas para determinar su sobreexpresión por Western blot y microscopía de epifluorescencia.

5.4.3. Cultivo de tripomastigotas celulares

La primera obtención de tripomastigotas celulares se realizó mediante la infección de células Vero. Las células fueron crecidas en frascos de 150 cm² y al alcanzar en 75 % de confluencia aproximadamente fueron infectadas con una relación 10/1 de epimastigotas a los cuales se los sometió a estrés nutricional³.

Las infecciones se realizaron durante 4 horas a 37 °C en medio DMEM. Luego de las 4 horas el medio fue reemplazado por DMEM con 2 % de SBF y las células fueron mantenidas a 37 °C en estufa con 5 % de CO_2 . Aproximadamente a los 4 días se observaron los amastigotas dentro de las células y a los 7-8 días se recolectaron del medio de cultivo los tripomastigotas derivados de células. Las subsiguientes infecciones en células Vero se realizaron con tripomastigotas derivados de células, siguiendo el mismo protocolo.

 $^{^{2}}$ Una línea establecida es aquella cuyos parásitos crecen en medio luego de tres pases sucesivos con la mayor dosis del fármaco de selección, lo que implica que son resistentes al fármaco de selección por poseer integrado en su genoma el plásmido que le confiere resistencia al mismo.

³Los epimastigotas son mantenidos 14-21 días sin diluciones ni cambios de medio; esto simula las condiciones de la región posterior del tracto digestivo del insecto vector, donde ocurre el viraje del estadio epimastigota al estadio tripomastigota metacíclico. Esto propicia dicho cambio de estadio, aumentando la probabilidad de parásitos metacíclicos y con ello, de infección de células VERO.

5.5. Obtención y tratamiento de proteínas

5.5.1. Obtención de extractos proteicos totales

Para la obtención de extractos proteicos totales los parásitos fueron lavados 3 veces en buffer PBS estéril y luego resuspendidos en buffer de lisis Urea Cracking Buffer, suplementado con un coctel de inhibidor de proteasas EDTA free (Roche) y PMSF. A continuación, se centrifugó 30 minutos a 12000 g a 4 °C. El sobrenadante fue conservado a -80 °C

5.5.2. Obtención de extractos de citoesqueleto y fracción citosólica de epimastigotas

Este método es una modificación del método de "obtención de ghosts" de Robinson [30]. Los parásitos en estadio epimastigota fueron lavados dos veces con PBS estéril. Luego se los centrifugó a 2800 rpm durante 8 minutos, se resuspendieron en 2 mL de PBS y fueron contados para fraccionarse. Cada fracción fue tratada con una concentración particular de Tritón X-100 en buffer MME. Las concentraciones a usar de Tritón X-100 son 0,005%; 0,05%; 0,2% y 0,5% en buffer MME. Las fracciones fueron resuspendidas en 1 mL de buffer MME (MOPS, MgSO₄, EGTA) a 4 °C con su correspondiente concentración de Tritón X-100, dejándolas 5 minutos en hielo. Posteriormente, se las trató durante 20 minutos con paraformaldehído (PFA) 4% (m/v). De cada fracción se extrajo una alícuota para IFI, dejando la otra para lisado de proteínas de citoesqueleto. Todas las fracciones se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C.

-El pellet de las fracciones para lisado de citoesqueleto fue resuspendido en Urea Cracking Buffer

-El sobrenadante de cada fracción de extracto de proteínas de citoesqueleto se guardó como "Citosol", realizando luego con los mismos una precipitación de proteínas con Acetona.

-El pellet Para IFI fue tratado con NH_4Cl_2 50 mM (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente y guardado en PBS para luego proceder al ensayo de IFI.

5.5.3. Precipitación de fracción citosólica con acetona

Por cada volumen de muestra se debe colocar 4 volúmenes de acetona fría (4 °C). Se deja actuar durante 1 hora a -20 °C. Posteriormente, se centrifuga a 13000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se vuelca y se deja secar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez seco el pellet, se le agrega 50 μ L de Urea Cracking Buffer, dejando actuar 30 minutos a temperatura ambiente. El lisado es guardado a -20 °C para su posterior procesamiento.

5.5.4. Extracción de proteínas para co-inmunoprecipitación

Los parásitos epimastigotas fueron lavados tres veces con PBS estéril. Se colocaron en 250 μ L de buffer Wash/lysis IP frío cada 1 × 10⁹ parásitos. Se dejó actuar 5 minutos en hielo. Luego fueron centrifugados 10 minutos a 3000 g a 4 °C. El sobrenadante se colectó a un nuevo eppendorf bajo el rótulo "SN" (sobrenadante). El pellet fue resuspendido en 250 μ L de buffer de lisis/IP y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. El sobrenadante fue colectado en un eppendorf y rotulado como "Pellet 1". El pellet fue guardado bajo el rótulo "Pellet 2". Se continuó con la imnunoprecipitación para las muestras "SN" y "Pellet 1", mientras el "Pellet 2" fue guardado a -20 °C como respaldo.

5.5.5. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se incubó 5 μ L de muestra o estándar con 150 μ L de reactivo de Bradford (Sigma). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos y como curva de calibracíon se empleó seroalbúmina bovina (BSA; Sigma), con un rango de concentración de proteína de 0 a 2 mg/mL. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente con el reactivo de Bradford se midió la absorbancia a 595 nm en lector de microplacas Multiskan EX (Thermo).

Los resultados de absorbancia en función de la concentración de la curva patrón son graficados, obteniéndose una recta cuya función es de tipo y = ax + b, donde y' es el valor de absorbancia medido,

x es el valor de la concentración de proteína, a corresponde al valor de la pendiente de la recta y b es el término independiente. De dicha recta se puede obtener la "línea de tendencia", de la cual se puede obtener los valores a y b. Para determinar los valores de concentración de las muestras a cuantificar se utiliza la absorbancia obtenida para dicha muestra, y junto con los valores obtenidos por la línea de tendencia, se despeja de la ecuación la concentración de la proteína asociada a esa absorbancia.

En otros casos, en lugar de cuantificar la cantidad de proteínas, se colocó una cantidad de lisado correspondiente a 5×10^6 parásitos por muestra.

5.5.6. Separación de proteínas mediante Electroforesis por SDS-PAGE

La separación de proteínas de acuerdo a su tamaño en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli [99]. Se utilizaron geles al 10 %, 12 % de acrilamida, en sistemas Might Small II for 8X9CM Gels (Amersham Biosciences) con fuente de electricidad Electrophoresis Power Supply-EPS601 (GE Headlthcare). Las corridas se hicieron a intensidad constante de 25-30 mA por gel, hasta que el frente de corrida llegara al final del gel.

Los geles desnaturalizantes Bis-Tris en gradiente 4-12% (Thermo) fueron corridos en el sistema Invitrogen NuPage® Novex® Gel System (Thermo), según recomendaciones del fabricante.

En todos los casos, las muestras fueron cargadas con buffer de carga para geles de acrilamida 1X preparado a partir del 4X.

Los tamaños de las proteínas fueron estimados por comparación con marcadores de peso molecular de Thermo SCIENTIFIC (26616 y 26619). Al finalizar la corrida, con cada gel se realizó uno de dos ensayos; extracción de proteínas del gel para Espectrometría de masa o transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa para inmunodetección por Western blot.

5.5.7. Tinción de gel con Coomassie coloidal Blue G-250 y visualización de perfil de bandas proteicas

El protocolo es una modificación del protocolo de Neuhoff [100].

Una vez obtenido el gel a teñir, el mismo fue fijado en una solución de 10% ácido acético y 40% etanol durante a lmenos 30 minutos. Pasado ese tiempo, se colocó el gel en la solución de tinción de Coomassie coloidal Blue G-250, asegurándonos que la solución cubriera todo el gel y se lo dejó en la misma toda la noche. Al otro día fue enjuagado numerosas veces con agua para remover el colorante residual.

Una vez realizado este procedimiento, el gel coloreado fue escaneado para el análisis del patrón de bandas de las líneas de parásitos interrogadas

5.5.8. Extracción y digestión de péptidos para evaluación por Espectrometría de masa

Los productos del Método de Co-Inmunoprecipitación (ver Método 5.6.3) fueron resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida. Para ello se realizó una corrida corta, donde se resolviera toda la muestra en unos 3 cm de gel. Pasada la corrida, el gel fue teñido brevemente con Coomassie Blue G-250. Luego se cortó cada banda en tres partes iguales, las cuales fueron debidamente rotuladas y se procedió a la realización del protocolo de extracción y digestión de los péptidos.

Las bandas fueron desteñidas con 2 lavados en buffer acetonitrilo 50 %, bicarbonato de amonio 50 % y 2 lavados en buffer acetonitrilo 30 %, bicarbonato de amonio 50 %. Luego se los trató 1 h con una solución 10 mM de DTT a 2000 rpm y 56 °C y 45 minutos con una solución de 55 mM de iodoacetamida a 2000 rpm a temperatura ambiente. La digestión fue realizada con 1 μ L de tripsina (1 μ g/ μ L) durante 16 h. Los péptidos fueron extraídos con buffer 50 % bicarbonato de amonio, 0,1 % TFA (ácido trifluoroacético) con agitación durante 1 h. Posteriormente las muestras fueron sonicadas 3 veces durante 5 minutos cada una y eluídas con buffer 50 % bicarbonato de amonio, 0,1 % TFA en viales de Orbitrap. Luego de secar con Speed-Vac, las muestras fueron resuspendidas en 10 μ L de ácido fórmico 0,1 % y sonicadas nuevamente 3 veces por 5 minutos cada una.

5.6. Técnicas inmunológicas

5.6.1. Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa Hybond-C (GE-Healthcare) utilizando la técnica de la electrotransferencia húmeda durante 3 horas en buffer de transferencia. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5 % (m/v) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

Luego de dos lavados con PBS-Tween 20 0.1%, las membranas fueron incubadas con la dilución adecuada de anticuerpo primario durante 1 horas a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4 °C. Luego las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 0.1% y se incubó con la dilución adecuada del anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente.

Luego de 3 lavados de 5 minutos con PBS Tween 0.1 % las membranas fueron incubadas con el reactivo Kit Super Signal R West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo), y posteriormente expuestas con placas autoradiográficas (KODAK) y reveladas, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El control de la carga para la normalización se realizó con una dilución 1:50000 del anticuerpo de ratón anti- α -Tubulina (T5168, Sigma).

Para los ensayos de Western blot fueron utilizados los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos primarios:

IgG de ratón anti-HA (sc-7392, SantaCruz) Dilución 1:500-1:900 en PBS 1% BSA IgG de ratón anti-α-Tubulina (T5168, Sigma) Dilución 1:50000 en PBS 1% BSA IgG de ratón anti-GFP (sc-9996, Santacruz) Dilución 1:500 en PBS 1% BSA IgG de ratón anti-3Flag (sc-166384, Santacruz) Dilución 1:400 en PBS 1% BSA IgG de conejo anti-TcCMF46 (Genescript) Dilución 1:5800 en PBS 1% BSA IgG de conejo anti-SODB (no comercial) Dilución 1:3000 en PBS 1% BSA

Anticuerpos secundarios:

- IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a HRP (P0447, Dako Dilución 1:10000 en PBS 1 % BSA
- IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP (A6154, Sigma Dilución 1:10000-15000 en PBS 1 % BSA

5.6.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Las IFIs fueron realizadas sobre:

- Epimastigotas Dm28c Wild Type y líneas sobreexpresantes
- "Ghost" de epimastigotas (ver Sección 5.5.2)
- Interacción células HeLa-tripomastigotas celulares (ver Sección 5.7.4)
- Invasión de tripomastigotas celulares a células HeLa (ver Sección 5.7.2)
- Infección de 72 horas de tripomastigotas celulares a células HeLa (ver Sección 5.7.3)
- Infección de 96 horas de tripomastigotas celulares a células HeLa (ver Sección 5.7.3)

Fijación, adhesión, permeabilización y bloqueo

Tanto los porta objetos con células como los parásitos fueron lavados tres veces con PBS y luego fijados con paraformal dehído al 4 % en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se los resuspendió en NH₄Cl₂ 0,1 M (Sigma) por 10 minutos a temperatura ambiente, para el bloqueo de los grupos al dehídos.

Para el caso de los parásitos, luego de dos lavados con PBS, fueron resuspendidos a una concentración de 1×10^6 parásitos/pocillo y se colocaron en una lámina de 8 o 10 pocillos pretratada con poli-lisina 0,1 mg/mL (Sigma). Luego de 20 minutos a temperatura ambiente se lava el portaobjetos con PBS 1X para retirar los parásitos no adheridos.

Las láminas con parásitos y los cubreobjetos con células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 (Sigma) 0,5 % en PBS durante 5 minutos y luego se lavaron 2 veces con PBS. Los bloqueos se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS BSA-3 % (Sigma).

Inmunodetección

Luego de dos lavados con PBS Tween 0,1% se incubaron con los anticuerpos de interés diluidos en PBS- BSA 2%-Tween20 0,1%.

Posteriormente, las láminas fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween 0.1% e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con la dilución adecuada de anticuerpos primarios, y posteriormente 1 hora con la dilución adecuada de anticuerpo secundario. Los preparados fueron montados con 5 μ L de FluoroshieldTM with DAPI (Sigma).

Para los ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta fueron utilizados los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos primarios:

IgG de ratón anti-HA (sc-7392, SantaCruz) Dilución 1:50 en PBS 2 % BSA

IgG de ratón anti- α -Tubulina (T5168, Sigma) Dilución 1:5000 en PBS 2% BSA

IgG de conejo anti-TcCMF46 (Genescript) Dilución 1:870 en PBS 2 % BSA

Anticuerpos secundarios:

- IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 488 (A11001, Invitrogen) Dilución 1:1000 en PBS 2 % BSA
- IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a Cy3 (A10521, Invitrogen) Dilución 1:1000 en PBS 2% BSA
- IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 546 (A11010, Invitrogen) Dilución 1:1000 en PBS 2 % BSA

Las imágenes fueron obtenidas utilizando los siguientes microscopios confocales, presentes en la Plataforma de Microscopía del Instituto Pasteur de Montevideo:

- Leica TCS SP5, usando un lente 63X de inmersión en aceite con los láser de excitación Argon (488 nm), HeNe (543 nm) y Diode (405 nm)
- Zeiss Axio Observer Z1, LSM 800, usando un lente 63X de inmersión en aceite con los láser Diode 405nm, 488nm, y SHG (561nm)

Una vez obtenidas las imágenes, su tratamiento y selección se hizo utilizando el programa Icy [101].

5.6.3. Co-Inmunoprecipitación con esferas magnéticos anti-HA

A cada muestra tratada con buffer IP se le colocó 25 μ L de Pierce Anti-HA Magnetic Beads (Thermo), previamente tratadas con buffer Wash/lysis IP Buffer, según especificaciones del fabricante.

Se colocó la muestra, junto con los beads en agitación continua y se dejó interactuar toda la noche a 4 °C. La mezcla fue colocada en el magneto y se esperó a que las esferas se unan al mismo. Se extrajo el sobrenadante, el cual fue guardado bajo el rótulo de "FT-1" (Flow through 1). Las esferas se lavaron dos veces con Wash/lysis IP Buffer y una vez con agua miliQ estéril. Luego, loas esferas fueron tratadas durante 5 minutos con 50 μ L de buffer de lisis 2D (elución). Nuevamente se colocó la mezcla en el magneto, se extrajo el buffer con la elución y se guardó a -20 °C.

En algunos casos, al material denominado FT-1 se le realizó una nueva co-inmunoprecipitación, apartando unos 40 μ L sin co-inmunoprecipitar. Todas las fracciones obtenidas fueron evaluadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot.

5.7. Cultivos celulares y ensayos in vitro

5.7.1. Cultivo de líneas celulares de mamífero

Las líneas celulares Vero y HeLa fueron cultivadas en medio Dulbecco's modified Eagles (DMEM, Gibco) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF, Gibco), en atmósfera húmeda con 5 % de CO_2 a 37 °C.

5.7.2. Ensayos de invasión celular

Para realizar los ensayos de invasión e infección celular, se utilizan Células HeLa. Dichas células fueron crecidas hasta una confluencia de 75 % en placas de cultivo de 12 pocillos con cubreobjetos circulares de 18 mm de diámetro, esterilizados por autoclavado. Cada pocillo fue infectado con tripomastigotas manteniendo una relación parásito-célula de 5:1.

La infección se realizó durante 4 horas a 37 °C en DMEM suplementado con 2% de SBF. Luego de las 4 horas, los cubreobjetos fueron fijados con etanol 95% durante 10 minutos. Las células fueron montadas sobre cubreobjetos con Prolong Gold Anti Fade con DAPI (Invitrogen). Se realizaron tres réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas para cada línea de parásito.

5.7.3. Ensayos de infección celular

Se realizó el mismo procedimiento explicado anteriormente en 5.7.2, pero las células infectadas no fueron fijadas a las 4 horas. Pasadas las 4 horas de interacción células-parásitos, el medio se reemplazó por medio fresco con 2 % de SBF y fueron mantenidas durante 72 horas en estufa a 37 °C y 5 % CO₂. Se realizaron tres réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas para cada línea de parásito. Una vez finalizadas las 72 horas, los cubreobjetos fueron fijados con etanol 95 % durante 10 minutos. Las células fueron montadas sobre cubreobjetos con Prolong Gold Anti Fade con DAPI (Invitrogen). Tanto en el ensayo de infección como en el de invasión celular, el número de células infectadas y el número de amastigotas por célula fue determinado con microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81), utilizando el filtro U-MNUA2 (DAPI). Las imágenes fueron analizadas con el programa Icy [101], mediante la visualización de los kinetoplastos y núcleos de los parásitos teñidos con DAPI, así como núcleos de las células HeLa. Para cada réplica, se contabilizó un aproximado de 300 células totales. Se obtuvo para cada imagen los siguientes datos:

- Número de células HeLa
- Número de células HeLa infectadas
- Amastigotas totales

Con los datos obtenidos para las 300 células de cada réplica (tres réplicas biológicas) se analizaron los siguientes parámetros (comparando cada línea sobreexpresante con su control):

$$\% infección = \frac{c\'elulas infectadas}{c\'elulas totales} \times 100$$
(1)

$$amastigotas/c\'elula = \frac{amastigotas \ totales}{c\'elulas \ infectadas} \tag{2}$$

$$indice \ de \ infecci\u00f3n = \frac{amastigotas/c\u00e9lula \times \% \ infecci\u00f3n}{c\u00e9lulas \ totales}$$
(3)

Para las IFIs de infecciónes a 96 horas se realizó el mismo procedimiento, pero las infecciones se mantuvieron durante 96 horas, y luego de la fijación con etanol 95% durante 10 minutos, se procedió a la Inmunofluorescencia indirecta.

5.7.4. Ensayos de interacción célula-parásito

Para estos ensayos se utilizaron también células HeLa, que al igual que en los ensayos anteriores fueron crecidas hasta una confluencia de 75 % en placas de cultivo de 12 pocillos con cubreobjetos circulares de 18 mm de diámetro, esterilizados por autoclavado. Cada pocillo fue infectado con tripomastigotas celulares, manteniendo una relación parásito-célula de 5:1, permitiendo la interacción durante 30 minutos.

Una vez finalizada la interacción, los cultivos fueron fijados con etanol 95% durante 10 minutos, pasando posteriormente a realizar ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta.

5.7.5. Curvas de crecimiento de epimastigotas de líneas sobreexpresantes de secuencias LRR de *Trypanosoma cruzi*

Las curvas de crecimiento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* de líneas sobreexpresantes de secuencias LRR se realizaron en frascos de 25 cm², con 5 mL de parásitos en medio LIT con 10 % SFB. Se partió de una concentración de 1×10^6 parásitos/mL y se contó en cámara de Neubauer cada 24 horas durante 13 días. Cada muestra se realizó por triplicado.

5.7.6. Amastigogénesis

De un cultivo de células VERO infectado con tripomastigotas celulares, se extrajo el sobrenadante al cuarto día de infección y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, para extraer tripomastigotas celulares que emergieron de las células infectadas. Se los resuspendió en medio DMEM y se los colocó en la estufa a 37 °C, 5% de CO₂, contándose la cantidad de amastigotas y tripomastigotas en los tiempos 0, 2 y 4 horas. Con los datos se realizó una gráfica representando la relación amastigota/tripomastigota, para determinar si hay cambios en la diferenciación de tripomastigotas a amastigotas en esas condiciones entre el sobreexpresante y su control. Se realizaron 4 réplicas biológicas, con dos réplicas técnicas cada una.

5.8. Otras técnicas

5.8.1. Espectrometría de masa

Los productos del Método de Co-Inmunoprecipitación (ver Método 5.6.3) fueron resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se realizó el protocolo de extracción y digestión de los péptidos.

Los productos son enviados a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo, donde son analizados en uno los siguientes equipos:

- Espectrómetro de masa LTQ Velos + ETD, Thermo
- Espectrómetro de masa Q exactive (Q-Orbitrap), Thermo

Los resultados obtenidos de este procedimiento fueron analizados con el programa *PatternLab for Proteomics* [102], que analiza datos de proteómica obtenidos por métodos tipo "Shotgun" a través de la obtención de péptidos generados por la proteólisis de proteínas con Tripsina.

La identificación se logra comparando los datos de masa sobre carga (m/z) generados experimentalmente con espectros teóricos presentes en bases de datos que se usan como referencia [102].

En nuestro caso, para realizar las búsquedas generamos una base de datos de las cepas CL Brener Esmeraldo y Non Esmeraldo-like de *Trypanosoma cruzi* para ambas líneas transfectentes. Para el caso de pDIY-TcPP1r y su control, fue agregada manualmente la proteína GFP (que se espera esté presente).

5.8.2. Determinación de viabilidad con Calyculin A

Los ensayos de viabilidad utilizando Resazurina son de amplio uso para determinar la acción de diversos fármacos sobre líneas de *Trypanosoma cruzi*. El mismo es un ensayo colorimétrico cuantitativo que usa la oxidación/reducción de la resazurina como indicador de la citotoxicidad de compuestos en cultivos parasitarios. La detección de cambios de la oxidación (azul) a la reducción (rosado) del colorante resazurina son indicadores de funcionamiento de las células. Este ensayo está basado en el protocolo de Rolón et al [103].

Inicialmente se debió realizar tres pases consecutivos de parásitos en estadio epimastigota cada cuatro días⁴, dejando en cada pase una concentración de 10×10^6 parásitos/mL.

Al cuarto día, se contaron los parásitos y se colocaron en una concentración de 6×10^6 parásitos/mL (concentración 2X) en 6 mL de medio LIT suplementado con 10% SFB. En placas de 96 pocillos se colocaron 100 μ L de parásitos y 100 μ L de una de las siguientes soluciones:

- Medio LIT suplementado con 10% SFB (controles de crecimiento sin fármaco).
- Medio LIT suplementado con 10% SFB y Calyculina A en un rango de 1 nM y 15 nM, donde 10 nM es el valor de IC₅₀ determinado para *Trypanosoma cruzi* [104] (la concentración debe ser 2X).

Algunos pocillos contenían sólo LIT suplementado con 10% SFB, para ser usados como medida de blanco. Como resultados, en cada pocillo había 200 μ L de medio con 3 × 10⁵ parásitos; unos sin fármaco (controles) y otros con una concentración 1X de Calyculina A. Se colocó la placa en estufa a 28 °C y se dejó durante 72 h. Pasado ese tiempo, se colocó en cada pocillo 50 μ L de Resazurina 1 mM (solución 5X) y se midió la absorbancia a 490 y 595 nm, y se vlvió a medir la absorbancia aproximadamente a las 5 h o cuando se observó el desarrollo de color.

⁴Estos pases que se realizaron con los parásitos en fase exponencial (entre 50×10^6 y 80×10^6 parásitos/mL), permiten que los mismos se encuentren metabólicamente activos y en la mayor tasa de replicación, dos parámetros esenciales para determinar la viabilidad en presencia de un fármaco.

La Ecuación 4 indica el cálculo utilizado para determinar el porcentaje de actividad de epimastigotas (%AE), donde en el numerador se encuentran los datos de los parásitos tratados con fármaco (CalyA) y en el denominador los datos de los parásitos no tratados (Control):

$$\% AE = \frac{A_{490} - (A_{595} \times R_O)CalyA}{A_{490} - (A_{595} \times R_O)Control} \times 100$$
(4)

 R_{O} es el factor de corrección de Resazurina en el medio libre de parásitos, calculándose como indica la Ecuación 5

$$R_O = \frac{A_{490}}{A_{595}} \tag{5}$$

Para cada concentración de fármaco, los resultados fueron graficados. El ensayo se realizó por triplicado, y en cada ensayo cada concentración de fármaco tiene tres réplicas biológicas. El control negativo y el de medio tienen seis réplicas técnicas cada uno por ensayo.

6. Resultados

6.1. Análisis bioinformático: Búsqueda y selección de proteínas LRR in silico

6.1.1. Búsqueda de secuencias LRR en Trypanosoma cruzi

Con el fin de identificar secuencias LRR que se encuentran en el genoma de *Trypanosoma cruzi*, se realizó la búsqueda bioinformática detallada en la Sección 5.1.1.

Brevemente, utilizando como base de datos el genoma de la cepa CL Brener Esmeraldo-like que se encuentra en la base de datos http://tritrypdb.org [82], se realizó una búsqueda de secuencias con dominios descritos como "LRR o Leucine rich repeat" en las bases de datos InterPro [83], PFAM [84], PROSITE PROFILES [85] y SMART [86].

De esa búsqueda se obtuvo un total de 63 secuencias con motivos LRR descritas para la cepa CL Brener Esmeraldo-like, donde la mayoría de ellas también están presentes en CL Brener Non Esmeraldo-like de *Trypanosoma cruzi*. Dichas secuencias se observan en la Tabla 3, así como algunos datos asociados a las mismas (como la descripción de la proteína producida, la función asociada a dicha proteína, el peso molecular predicho y el largo de la proteína).

Gene ID CL Bre-	Gene ID CL	Product Description	$\mathbf{M}\mathbf{W}$	Protein	Computed GO Fun-
ner Esmeraldo-like	Brener NE-like			\mathbf{Length}	ctions
T CLD 440047 00	T CI D F06100 60	1 /1 / 1 / 1 1	00000	100	11
TcCLB.449247.20	TCCLB.506123.60	hypothetical protein, conserved	20902	192	null
1CCLB.303479.20	ICCLD.300833.170	(pseudogene)	22192	198	nun
TcCLB 503531.10	***	hypothetical protein, conserved	24585	228	null
TcCLB.503579.20	Tc0CLB.507517.10	hypothetical protein, conserved	47809	449	protein binding
TcCLB.503613.79	TcCLB.511165.20	hypothetical protein	20185	176	null
TcCLB.503671.30	TcCLB.508153.30	leucine-rich repeat-containing pro-	43945	382	protein binding
TcCLB.503981.9	not found (pseudo-	hypothetical protein, conserved	24354	221	null
	gen)	(pseudogene)	0000 -		
TcCLB.504867.50	TCCLB.510943.110	Basal body protein	69907	632	protein binding
TCULB.505807.150	TCCLB.507017.20	membrane proteome 30	38538	351	null
TcCLB.506135.30	TcCLB.3503721.20	hypothetical protein, conserved	77613	697	protein binding
TcCLB.506203.20	TcCLB.508645.30	dynein light chain, putative	29217	255	protein binding
TcCLB.506213.40	TcCLB.511287.60	hypothetical protein, conserved	122924	1099	null
TcCLB.506413.50	TcCLB.511237.80	hypothetical protein, conserved	64129	583	null
TcCLB.506493.40	TcCLB.510121.120	hypothetical protein, conserved	77774	712	null
TcCLB.506493.9	TcCLB.510121.90	CHAT domain containing protein, putative	98429	881	null
TcCLB.506513.50	TcCLB.508919.70	calcium/calmodulin-dependent protein kinase, putative	60926	545	ATP binding, protein binding, protein kinase activity, transferase activity, transferring phosphorus-containing groups
TcCLB.506529.320	TcCLB.510887.70	hypothetical protein, conserved	80310	730	null
TcCLB.506605.210	TcCLB.508859.40	leucine-rich repeat protein (LBBP) putative	45697	415	null
TcCLB.506649.110	TcCLB.510121.120	hypothetical protein, conserved	25053	229	null
TcCLB.506693.50	TcCLB.508153.650	ribonuclease inhibitor-like protein,	51120	456	null
		putative	=1.00=	0.10	
TcCLB.506733.90	TcCLB.511857.10	hypothetical protein, conserved	71667	643	protein binding
TcCLB.506753.80	Tc0CLB.510355.240	hypothetical protein, conserved	37344	341	null
TeCLB.506773.160	TcCLB.508799.40	hypothetical protein, conserved	63651	582	protein binding
10018.306779.110	1cclb.311153.90	dual specificity phopshatase, pu- tative	53600	475	phosphatase acti- vity, protein bin- ding, protein tyrosi- ne/serine/threonine phosphatase activity
TcCLB.506801.120	TcCLB.511907.240	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase, putative	114490	1034	ATP binding, protein binding, protein kinase activity, transferase activity, transferring phosphorus-containing groups
TcCLB.506925.270	TcCLB.508601.100	hypothetical protein, conserved	111159	979	protein binding
TcCLB.506941.70	TcCLB.511511.70	hypothetical protein, conserved	168945	1488	protein binding
TcCLB.506943.69	TcCLB.509065.79	hypothetical protein, conserved	29450	266	null
TcCLB.506945.280	***	Component of Motile Flagella Pro- tein 46	64527	553	protein binding
TcCLB.507099.90	***	hypothetical protein, conserved	53964	481	protein binding
TcCLB.507603.140	TcCLB.509429.210	leucine-rich repeat protein (LRRP), putative	74342	662	protein binding
TcCLB.507669.14	TcCLB.509879.30	hypothetical protein, conserved	47019	431	protein binding
TcCLB.507711.190	TcCLB.509641.70	hypothetical protein, conserved	97891	874	null

TcCLB.507737.40	TcCLB.509933.20	hypothetical protein, conserved (fragment)	16631	152	null
TcCLB.507841.30	TcCLB.508269.70	hypothetical protein, conserved	40158	356	protein binding
TcCLB.507867.60	TcCLB.510629.420	protein phosphatase 1, regulatory subunit, putative	45821	402	protein binding
TcCLB.508205.4	***	hypothetical protein, conserved	18661	170	null
TcCLB.508271.4	TcCLB.506127.20	hypothetical protein, conserved	27785	251	metal ion binding, pro- tein binding
TcCLB.508307.20	TcCLB.511629.10	Leucine-rich repeat domain contai- ning protein	92598	835	protein binding
TcCLB.508347.90	TcCLB.507615.90	hypothetical protein, conserved	231122	2138	null
TcCLB.508357.23	***	hypothetical protein, conserved	43039	393	null
TcCLB.508489.10	TcCLB.511495.30	hypothetical protein, conserved	71432	652	protein binding
TcCLB.509067.50	TcCLB.508711.20	hypothetical protein, conserved	70693	642	protein binding
TcCLB.509151.90	TcCLB.508175.200	hypothetical protein, conserved	102232	934	null
TcCLB.509599.170	TcCLB.506327.60	hypothetical protein, conserved	45870	407	protein binding
TcCLB.510091.60	TcCLB.510421.310	hypothetical protein, conserved	103863	923	null
TcCLB.510101.250	TcCLB.506297.80	hypothetical protein, conserved	96166	869	protein binding
TcCLB.510127.70	TcCLB.508271.30	leucine-rich repeat protein 1 (LRRP1), putative	60406	561	null
TcCLB.510283.80	TcCLB.503823.50	hypothetical protein, conserved	41013	366	null
TcCLB.510295.40	TcCLB.506007.30	Protein C21orf2 homolog, putative	31016	277	protein binding
TcCLB.510315.4	TcCLB.508153.650	hypothetical protein, conserved (fragment)	28199	253	null
TcCLB.510523.20	TcCLB.511817.60	hypothetical protein, conserved	34678	308	null
TcCLB.510611.50	TcCLB.506791.79	hypothetical protein, conserved	65648	601	null
TcCLB.510737.60	Tc0CLB.510663.40	hypothetical protein, conserved	32308	292	protein binding
TcCLB.510761.22	***	hypothetical protein, conserved	39890	360	protein binding
TcCLB.510773.100	***	Flagellar Member 4	179711	1641	protein binding
TcCLB.511315.30	TcCLB.511755.40	hypothetical protein, conserved	53056	470	null
TcCLB.511421.150	***	leucine-rich repeat-containing pro- tein	45874	411	null
TcCLB.511421.160	***	hypothetical protein, conserved	49855	453	protein binding
TcCLB.511539.9	TcCLB.508707.310	hypothetical protein, conserved	29457	265	protein binding
TcCLB.511573.10	TcCLB.506229.40	leucine-rich repeat protein, putati- ve	25266	222	protein binding
TcCLB.511589.240	TcCLB.511229.90	hypothetical protein, conserved	82003	736	null
TcCLB.511801.10	TcCLB.508601.100	leucine rich repeat	90209	815	protein binding

Tabla 3 – Genes LRR obtenidos por la búsqueda *in silico* en *Trypanosoma cruzi* CL Brener Esmeraldo-like. En negrita se encuentran los genes con productos descritos. Referencia: NE-like; Non Esmeraldo-like

Analizando la Tabla 3 se pueden identificar 44 secuencias cuya descripción es "hypothetical protein, conserved". De éstas, 19 tienen descrita la función de "protein binding", mientras que el resto no tiene una función asociada. Por otro lado, 10 secuencias contienen descripción de "leucine rich repeat", de las cuales la mitad tiene descripción de "protein binding", y la otra mitad no presenta función descrita. Por último, 9 secuencias tienen descripción de producto, y 6 de ellos son "putativos". Dentro de este último grupo, sólo uno de ellos, el TcCLB.506203.20, presenta bibliografía asociada (aunque la misma es en estudios realizados en *Trypanosoma brucei*).

Todos estos datos indican que la mayoría de las proteínas con motivos LRR no han sido estudiadas desde un punto de vista experimental en *Trypanosoma cruzi*, y que la anotación de las 63 secuencias LRR obtenidas de la búsqueda se debe a:

- Predicción de repetidos en las bases de datos de dominios proteicos (InterPro [83], PFAM [84], PROSITE PROFILES [85] y SMART [86])
- Anotación de función por identificación en ortólogos de tripanosomátidos más estudiados a nivel experimental (como es el caso de *Trypanosoma brucei*).

6.1.2. Selección de secuencias LRR con mayor identidad con Internalina A de *Listeria* monocytogenes

Una vez obtenidas todas las secuencias identificadas como LRR en *Trypanosoma cruzi*, en la base de datos Tritrypdb.org se realizó un BLAST (Basic Alignment Search Tool) con la secuencia de Internalina A (InlA) de *Listeria monocytogenes* (GenBank accession number WP_010989462.1), (ver Sección 5.1.2). El resultado del BLAST se encuentra en la Tabla 4. Con estos parámetros de búsqueda, se obtuvieron 16 secuencias de las 63 secuencias LRR, que son las secuencias con las que se procede en este trabajo. Manualmente se agregó la secuencia TcCLB.510295.40, que se encuentra en las 63 secuencias identificadas con motivo LRR, pero no en la selección de secuencias con mayor identidad con InlA. Sin embargo, en la información aportada por la base de datos tritrypdb.org, esta proteína tendría un 48% de identidad con InlA.

Gene ID	source_id	Organism	Score	E-Value
TcCLB.504867.50	TcCLB.504867.50:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	47.8	1E-5
TcCLB.506203.20	TcCLB.506203.20:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	49.7	1E-6
TcCLB.506773.160	TcCLB.506773.160:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	57.4	1E-8
TcCLB.506925.270	TcCLB.506925.270:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	52.4	5E-7
TcCLB.506941.70	TcCLB.506941.70:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	90.1	1E-18
TcCLB.506945.280	TcCLB.506945.280:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	60.8	8E-10
TcCLB.507099.90	TcCLB.507099.90:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	44.3	9E-5
TcCLB.507603.140	TcCLB.507603.140:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	42	6E-4
TcCLB.507841.30	TcCLB.507841.30:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	51.2	6E-7
TcCLB.507867.60	TcCLB.507867.60:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	49.7	2E-6
TcCLB.508307.20	TcCLB.508307.20:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	62.8	3E-10
TcCLB.509151.90	TcCLB.509151.90:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	47	2E-5
TcCLB.509599.170	TcCLB.509599.170:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	64.3	4E-11
TcCLB.510737.60	TcCLB.510737.60:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	43.9	1E-4
TcCLB.511421.160	TcCLB.511421.160:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	43.5	2E-4
TcCLB.511539.9	TcCLB.511539.9:mRNA	T. cruzi CL Brener Esmeraldo-like	53.5	6E-8

 $\label{eq:table_$

Para esta búsqueda se determinó un E-value<1E-4 como "threshold". El valor de este parámetro fue elegido en función del bajo grado de identidad entre InlA y las proteínas de *T. cruzi*, ya que, por un lado, son organismos con una gran distancia evolutiva, y por otro, los propios repetidos LRR tienen una gran plasticidad que les permite contener diferentes tipos de aminoácidos en las regiones consenso [88], [57], [105] y aún así mantener una estructura tridimensional propia del motivo. Esto se traduce en secuencias con un bajo grado de identidad a nivel de secuencia, pero un importante grado de similitud a nivel de estructura tridimensional y función.

6.1.3. Aproximación in silico de la estructura de las proteínas LRR seleccionadas

Identificación y clasificación de repetidos LRR

Las 17 secuencias con mayor identidad con InlA fueron analizadas más a fondo a nivel de sus secuencias proteicas, para identificar y clasificar los posibles repetidos LRR predichos en las mismas. Para ello se realizó, por un lado, la identificación de repetidos LRR a través del predictor http://lrrsearch.com [87], y por otro, una clasificación manual, analizando cada repetido identificado con las secuencias consenso de cada familia LRR, utilizando como referencia la Tabla 1, que contiene las secuencias consenso caracterizadas para las diferentes familias de proteínas LRR [50], [57], [58], [51], [49].

Para completar el análisis de secuencia, se tomó en cuenta la información acerca de la estructura secundaria que adoptan las regiones altamente conservadas de los motivos LRR, que indican que la estructura secundaria de los residuos 3 al 5 (LxxLxLxxNxL) adopta una conformación de tipo hebra β [57], [88]. Utilizando el predictor de estructura secundaria APSSP2 [106], se pudo identificar para la mayoría de los casos una coincidencia entre la predicción de hebras β con los residuos 3 a 5 de los repetidos LRR predichos en las secuencias de las proteínas analizadas (datos no mostrados), mientras que fueron predichos otros repetidos, que no fueron identificados por el predictor lrrsearch.com, probablemente por la ausencia en la mayoría de los casos del residuo N en la posición 9 del HCS. Sin embargo fueron tomados en cuenta debido a que la plasticidad de estos repetidos permite que, si bien su secuencia puede estar un poco alejada de la secuencia consenso, por su posición en el motivo (recordemos que los repetidos se disponen en tándem) y su estructura secundaria, sean potenciales repetidos LRR.

La clasificación de secuencias LRR en grupos se hizo tomando en cuenta la relación evolutiva entre tipos de repetidos LRR tipo SDS22, Bacteriano y Típico [57], (Matsushima, N. et al, 2001), (B. Kobe, J. et al, 1994), [52], [54].

Los grupos fueron determinados de la siguiente manera:

Grupo 1 Proteínas con un sólo tipo de repetido.

Grupo 2 Proteínas con dos tipos de repetidos, siendo uno de ellos tipo SDS22 (S).

Grupo 3 Proteínas con tres tipos de repetidos Típico (T), Bacteriano (B) y tipo SDS22 (S).

Grupo 4 Proteínas con repetidos CC-like (C) y Ri-like (R).

Existen, además de InlA, otro tipo de internalinas en *Listeria monocytogenes*, las cuales también presentan repetidos LRR; a saber, InlB (GenBank accession number WP_010989463.1), InlC (GenBank accession number CAA65088.1), InlH (GenBank accession numberABC26494.1) e InlJ (GenBank accession number WP_010990081.1)[98]. Las secuencias de estas proteínas también fueron analizadas para clasificarlas en los grupos previamente mencionados.

Como resultado se obtuvo la Tabla 5

Internalina	LRR descritos	Tipo LRR	Grupo
InlA	14	S(14)	1
InlB	6	S(5)	1
InlC	5	B(1)	1
InlH	6	B(6)	1
InlJ	14	I(5) S(1)	2

Tabla 5 – Identificación y clasificación de repetidos LRR en internalinas de *Listeria monocytogenes*. Referencias: I (IRREKO); T (Typical); B (Bacterial); S (SDS22-like); C (CC-like); R (RI-like)

Las 17 secuencias seleccionadas en función de su identidad con InlA con E-value menores a 1E-4 muestran porcentajes de identidad con InlA menores al 40%, presentando identidad fundamentalmente en las regiones correspondientes a los repetidos. Dentro de las proteínas seleccionadas, la mitad de ellas tienen menos de un 30% de identidad con InlA (TcCLB.507867.60, TcCLB.504867.50, TcCLB.507603.140, TcCLB.506941.70, TcCLB.508307.20, TcCLB.509151.90, TcCLB.511539.9 y la secuencia TcCLB.510295.40, que al hacer BLAST con el predictor de la página de NCBI [98], presenta un alineamiento menor al reportado en tritrypdb.org). De estas secuencias, las que presentan menor porcentaje de identidad (TcCLB.508307.20 con un 26% y TcCLB.509151.90 con un 22%), no presentan repetidos LRR de tipo SDS22, teniendo sólo descritos del tipo CC-like y RI-like.

De las 17 secuencias analizadas, 5 presentan un solo tipo de repetidos LRR, mientras que 10 secuencias presentan dos tipos de repetidos, donde uno de ellos es del tipo SDS22, siendo el otro del tipo Típico o Bacteriano.

La presencia de repetidos de tipo SDS22 en las proteínas, es importante a la hora de tener mayor identidad con InlA, ya que las proteínas cuya identidad con InlA supera el 30% presentan repetidos identificados en su mayoría (o en su totalidad) como tipo SDS22.

Se puede observar que InlA presenta 14 repetidos LRR y son todos del tipo SDS22, como se ha descrito previamente en estudios acerca de esta proteína [67]. Es esperable, por lo tanto, que aquellas proteínas LRR que comparten identidad con ella, presenten también en su estructura repetidos tipo SDS22. Esto ocurre con 13 de las 16 proteínas identificadas con mayor identidad con InlA. De hecho, en las proteínas TcCLB.506203.20, TcCLB.506945.280 y TcCLB.507841.30 todos los dominios que pudieron ser clasificados fueron de este tipo. Sin embargo, cabe destacar lo siguiente:

- En ninguna proteína fue posible clasificar la totalidad de los repetidos descritos, lo que muestra que en el caso de *T. cruzi* existen repetidos que se alejan de las secuencias consenso descritas para otros organismos.
- La proteína TcCLB.511421.160 sólo tiene identificados repetidos LRR del tipo Bacteriano. Sin embargo, se pudo clasificar sólo 3 de los 7 repetidos descritos, lo que implica que probablemente haya repetidos del tipo SDS22 aunque no se hayan identificado en esta instancia.

Búsqueda de otros dominios proteicos

Continuando con el análisis *in silico*, dado que las proteínas LRR suelen tener otros dominios asociados, aportando a la versatilidad de funciones que presenta este grupo [89], [90], [91], [92], [93], se buscaron otros dominios que puedan presentar las proteínas identificadas previamente como LRR en la base de datos InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/)[83].

En la Tabla 6 se puede apreciar que 7 de las 18 proteínas no tienen dominios anotados, mientras que de las 9 restantes, 5 presentan dominios de tipo dineína, mientras que 2 de ellas tienen dominio "C21 orf2", descrito como dominio implicado en la reorganización del citoesqueleto y regulación de la forma celular. Por lo tanto, casi la mitad de las proteínas seleccionadas presentan motivos relacionados con la dinámica del citoesqueleto.

Búsqueda de SP, TM, anclaje GPI

Existen otros dominios en las proteínas que permiten dar cuenta de ciertas propiedades como su localización subcelular. Tal es el caso de los dominios transmembrana (TM), el péptido señal (SP) y el anclaje GPI, siendo este último frecuentemente usado en organismos protozoarios como mecanismo de anclaje de proteínas a la superficie celular [107]. Con estos antecedentes, se decidió buscar estos dominios en las secuencias LRR seleccionadas (ver Sección 5.1.3). Esta búsqueda arrojó como resultado los siguientes datos (que se observan en la Tabla 6):

- En ninguna proteína se identificó anclaje GPI, por lo que ninguna de ellas estaría integrada a la membrana celular mediante este tipo de modificación, lo que no implica que no estén asociadas con la membrana mediante algún otro mecanismo.
- Sólo la proteína TcCLB.506203.20 presenta SP, y además presenta un dominio transmembrana. Esto implica que esta proteína está asociada a la membrana celular, o la membrana de algún organelo.
- Las proteínas TcCLB.506203.20, TcCLB.507841.30 y TcCLB.509151.90 presentan dominio TM.
- Las proteínas TcCLB.506941.70 y TcCLB.508307.20 presentan dominio transmembrana.

La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos.

Gene Id	Id Grupo N° de T LRR		Tipo LRR	Otros dominios	TM	\mathbf{SP}	Anclaje GPI
TcCLB.504867.50	3	14	I(1) T(1) B(1) S(3)	No	No	No	No
TcCLB.506203.20	1	7	S(3)	Dynein light chain	(4-22)	(1-29)	No
TcCLB.506773.160	2	11	B(1) S(5)	No	No	No	No
TcCLB.506925.27	2	9	B(1) S(1)	No	No	No	No
TcCLB.506941.70	3	12	B(1) T(1) S(2)	IQ motif EF-hand binding	(949-966) (1144-1161)	No	No
TcCLB.506945.28	1	8	S(6)	Outer arm Dynein light chain 1	No	No	No
TcCLB.507099.90	2	8	B(1) S(2)	Protein Phosphatase regulatory subunit 7	No	No	No
TcCLB.507603.14	2	13	B(2) S(3)	No	No	No	No
TcCLB.507841.30	1	7	S(2)	Outer arm Dynein light chain 1 (axonemal)	(36-60)	No	No
TcCLB.507867.60	2	12	T(2) S(5)	Protein Phosphatase regulatory subunit	No	No	No
TcCLB.508307.20	4	30	C(14) R(5)	No	(9-33)	No	No
TcCLB.509151.90	4	23	C(12) R(3)	Outer arm Dynein light chain 1	(423-439)	No	No
TcCLB.509599.170	2	11	T(2) S(4)	No	No	No	No
TcCLB.510737.60	2	5	B(1) S(2)	Protein C21 orf2 [Ciliogenesis (LRRC76)]	No	No	No
TcCLB.511421.160	1	11	B(3)	No	No	No	No
TcCLB.511539.9	2	9	T(1) S(2)	Outer arm Dynein light chain 1 (Nischarin)	No	No	No
TcCLB.510295.40	2	4	T(1) S(1)	Protein C21 orf2 [Ciliogenesis (LRRC76)]	No	No	No

Tabla 6 – Análisis de secuencia proteica de los genes con identidad significativa con InlA. Referencias: I (IRREKO); T (Typical); B (Bacterial); S (SDS22-like); C (CC-like); R (RI-like). Los números entre paréntesis corresponden a la cantidad de motivos de ese tipo identificados manualmente en la proteína. En las columnas TM (Trans Membrane domain) y SP (Signal Peptide), los números entre paréntesis corresponden a las posiciones aminoacídicas en la proteína donde se encuentra predicho cada dominio.

Identidad con otras Internalinas de $Listeria\ monocytogenes\ y$ selección final de proteínas LRR

Para finalizar el análisis bioinformático general, para el grupo entero (de 63 secuencias) se interrogó la identidad con las demás internalinas de *Listeria monocytogenes* mediante BLAST. Estos resultados se encuentran en la Tabla 7.

Gen	InlA	InlB	InlC	InlH	InlJ	Identidad significativa
TcCLB.506945.280	35	34	30	30	30	Todas
TcCLB.507867.60	28	36	36	30	NS	InlA e InlB
TcCLB.506203.20	32	34	34	NS	27	InlA, InlB e InlC
TcCLB.507099.90	30	NS	NS	NS	NS	InlA
TcCLB.506773.160	30	30	31	NS	30	InA, InlB e InlC
TcCLB.504867.50	28	27	NS	NS	37	InlJ
TcCLB.511421.160	33	NS	30	30	NS	InlA, InlC e InlH
TcCLB.506925.27(32	NS	NS	NS	NS	InlA
TcCLB.506941.70	28	27	34	29	NS	InlB
TcCLB.507841.30	31	27	30	28	NS	InA
TcCLB.507603.140	NS	NS	NS	NS	NS	No
TcCLB.508307.20	26	26	NS	28	NS	No
TcCLB.509151.90	22	NS	NS	NS	NS	No
TcCLB.509599.17(31	NS	NS	29	NS	InlA
TcCLB.510737.60	34	29	NS	NS	NS	No
TcCLB.511539.9	29	NS	NS	30	NS	InlH
TcCLB.510295.40*	27	48	27	25	27	InB

Tabla 7 – Identidad significativa con otras Inl de *Listeria monocytogenes*. La identidad significativa corresponde a una identidad mayor al 30% y un E-value<1E-4. Referencia: NS (No significativa). *: esta secuencia fue agregada manualmente, ya que no aparece en el BLAST con InlA, pero si está en las 63 secuencias con repetidos LRR, y en su información se identifica un 48% de identidad con InlA

La selección final de proteínas se hizo en función de una identidad igual o mayor al 30 % con una o más internalinas, y un E-value<1E-4, dando como resultado la Tabla 8, que contiene las principales características que se pudo determinar a través del análisis *in silico*, como el alineamiento con Inls, el grupo en que se encuentran y otros dominios anotados, entre otras características.

Gen	$\begin{array}{l} {\bf Identidad} \\ {\bf Inl} > {\bf 30}\% \end{array}$	Grupo	Descripción	\mathbf{TM}	\mathbf{SP}	Otros dominios
TcCLB.506945.280	Todas	1	Component of motile flagella protein 46	No	No	Outer arm Dynein light chain 1
TcCLB.507867.60	InlA e InlB	2	Protein phosphatase 1, regulatory subunit, putative	No	No	Protein Phosphatase regulatory subunit
TcCLB.506203.20	InlA, InlB e InlC	1	Dynein light chain, putative	(4-22)	(1-29)	Dynein light chain
TcCLB.507099.90	InlA	2	Hypothetical protein, conserved	No	No	Protein Phosphatase regulatory subunit 7
TcCLB.506773.160	InA, InlB e InlC	2	Hypothetical protein, conserved	al protein, No No ved		No
TcCLB.504867.50	InlJ	3	Basal body protein			
TcCLB.511421.160	InlA, InlC e InlH	1	Hypothetical protein, conserved	No	No	No
TcCLB.507841.30	InA	1	Hypothetical protein, conserved	(36-60)	No	Outer arm Dynein light chain 1 (axonemal)
TcCLB.510295.40*	InB	2	Protein C21orf2 homolog, putative	No	No	Protein C21 orf2 (Ciliogenesis (LRRC76))

Tabla 8 – Selección final de genes con mayor identidad con internalinas de *Listeria monocytogenes*. De dichos genes se describen algunas de sus características más importantes, como descripción del producto en tritrypdb.org (al inicio y final del proyecto), si presentan dominio transmembrana, péptido señal u otros dominios descritos.

La Figura 18 muestra el resultado final de todas las búsquedas en MyStrategies, estrategia que se encuentra disponible en el siguiente link: http://tritrypdb.org/tritrypdb/im.do?s=c95d2d3b15c32a7d [82]. Es importante destacar, que al ingresar en el link, se va a obtener el conjunto de configuraciones de las búsquedas incluidas en esa estrategia, pero los resultados de la misma pueden variar, dado que la base de datos está en continua actualización. Por esto los datos obtenidos fueron además descargados y se encuentran a entera disposición.

6	⊟ Hide search strategy panel											
Ī	(Genes)						Strategy:	Estrategia búsque	da LRR en CL B	rener Esmeraldo-like y alineamiento con ir	nterandinas 🛛 🖾	
		InterPro Dom	PROSITE Profile 28 Genes	SMART 46 Genes	BLAST InIA	BLAST InIB	BLAST InIC	BLAST InIH 32 Genes	BLAST InIJ		View Description Rename	
	PFAM									Add Step	Duplicate Save As	
	48 Genes Step 1	60 Genes Step 2	60 Genes Step 3	63 Genes Step 4	16 Genes Step 5	11 Genes Step 6	11 Genes Step 7	10 Genes Step 8	4 Genes Step 9		Share Delete	
Ш												

 $\label{eq:Figura 18} \textbf{Figura 18} - \texttt{Estrategia completa de búsqueda de secuencias LRR en $Trypanosoma cruzi CL Brener Esmeraldo-like con mayor identidad con Inls de $Listeria monocytogenes.}$

6.2. Generación de vectores de expresión y evaluación de líneas sobreexpresantes establecidas de T. cruzi

Realizada una identificación de secuencias de proteínas LRR en *T. cruzi*, una primera aproximación *in silico* y selección de secuencias de interés, de la creación de estrategia de clonado en vectores de expresión y diseño de primers (ver Sección 6.1), los próximos pasos consistieron en la amplificación, clonado, transfección e identificación de sobreexpresión de las proteínas de interés.

6.2.1. Estrategia de clonado de secuencias LRR en vectores de expresión

Del análisis bioinformático anterior surge que un gran número de las proteínas seleccionadas presentan anotaciones relacionadas con componentes o reguladores del citoesqueleto. Para realizar estudios funcionales, la siguiente etapa fue obtener líneas de *T. cruzi* que sobreexpresaran las proteínas de interés.

Una vez seleccionadas aquellas secuencias LRR de interés para este proyecto, se procedió a definir las estrategias de generación de líneas sobreexpresantes de dichas proteínas en la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi*.

Como no existen antecedentes de que las secuencias LRR seleccionadas hayan sido estudiadas en T. cruzi, no contamos con anticuerpos específicos para su detección en ensayos *in vitro*. Es por ello que en todos los casos, la estrategia fue expresar las secuencias LRR asociadas a algún tag (3-Flag, eGFP, HA) que nos permitiera detectar las proteínas de fusión en los parásitos sobreexpresantes.

Para todas las secuencias, el vector de destino seleccionado fue pDIY-eGFP [78], mientras que un grupo de 6 secuencias tiene además el vector pTREXn como destino [95], [79]. El primero de ellos presenta numerosos tags asociados en la región "polylinker", lo que permite realizar un constructo que de como resultado la expresión de una proteína fusionada a uno o más tags (3-Flag, eGFP y HA fueron los tags seleccionados en este proyecto para generar proteínas de fusión). El segundo vector mencionado no presenta integrada ninguna secuencia para la expresión de tags, por lo que fue necesario diseñar para cada secuencia un "primer Reverse" que contuviera la secuencia para la expresión del tag HA entre la secuencia de la proteína (sin el codón de terminación) y el sitio de restricción. De este modo se expresa una proteína de fusión asociada a HA en el extremo C-ter.

La Tabla 9 muestra el diseño de clonado de las secuencias seleccionadas en uno o ambos vectores de expresión.

Proteína	Largo (aa)	PM (kDa)	Tags asociados (tamaño en kDa)	PMf (kDa)	Vector
TcCLB.506945.280	553	$64,\!6$	HA $(3 \text{ kDa}) + 3$ -Flag (3 kDa)	70,6	pDIY-GFP
			HA (3 kDa)	$67,\!6$	pTREXn
TcCLB.507867.60	402	45,7	HA(3 kDa) + 3-Flag $(3 kDa) + GFP(27 kDa)$	78,7	pDIY-GFP
			HA (3 kDa)	48,7	pTREXn
TcCLB.506203.20	255	29,2	HA(3 kDa) + 3-Flag $(3 kDa) + GFP(27 kDa)$	62,2	pDIY-GFP
			HA (3 kDa)	32,2	pTREXn
TcCLB.504867.50	632	69,8	3-Flag (3 kDa)	72,8	pDIY-GFP
TcCLB.511421.160	453	49,9	3-Flag (3 kDa)	52,9	pDIY-GFP
TcCLB.507841.30	356	40,3	HA (3 kDa) + 3-Flag (3 kDa) + GFP (27 kDa)	73,3	pDIY-GFP
			HA (3 kDa)	43,3	pTREXn
TcCLB.506773.160	582	63,5	HA $(3 \text{ kDa}) + 3$ -Flag $(3 \text{ kDa}) + \text{GFP} (27 \text{ kDa})$	96,5	pDIY-GFP
			HA (3 kDa)	66,5	pTREXn
TcCLB.510295.40	277	30,9	3-Flag (3 kDa)	63,9	pDIY-GFP
			HA (3 kDa)	33,9	pTREXn
TcCLB.507099.90	481	53,8	HA $(3 \text{ kDa}) + 3$ -Flag $(3 \text{ kDa}) + \text{GFP} (27 \text{ kDa})$	86,8	pDIY-GFP

 $\label{eq:tables} {\bf Tabla 9} - {\bf Tamaño \ predicho, tags \ asociados \ y \ vectores \ de \ destino \ de \ las \ proteínas \ LRR \ seleccionadas. \ La \ predicción \ de \ los \ tamaños \ se \ obtuvo \ en \ el \ sitio \ https://web.expasy.org/compute_pi/$

6.2.2. Amplificación por PCR

La amplificación de las secuencias LRR seleccionadas permitió su posterior clonado en los vectores de expresión correspondientes.

Para ello se usaron los primers sintéticos diseñados (que se encuentran en la Sección 5.1.5) y como molde se usó ADN genómico de epimastigotas de la cepa Dm28c. En la Figura 19 se muestran las fotografías de los geles de agarosa al 1%, donde se visualizan todos los productos de las reacciones de PCR realizadas (junto con sus blancos correspondientes), luego de la electroforesis para separar los productos de amplificación, comparados con el Marcador de Peso Molecular (MPM) que se muestra a la derecha de dicha imagen.



Figura 19 – Resultados de las amplificaciones por PCR. A: TcCLB.506945.280 (1662 pb), B: TcCLB.506945.280HA (1689 pb), C: TcCLB.507867.60 (1209 pb), D: TcCLB.507867.60HA (1236 pb), E: TcCLB.506203.20 (633 pb), F: TcCLB.506203.20HA (660 pb), G: TcCLB.504867.50 (1899 pb), H: TcCLB.511421.160 (1362 pb), I: TcCLB.507841.30HA (897 pb), J: TcCLB.506773.160 (1749 pb), K: TcCLB.506773.160HA (1766 pb), L: TcCLB.510295.40 (847 pb), M: TcCLB.510295.40HA (874 pb), N: TcCLB.507099.90 (1443 pb), MPM: Marcador de Peso Molecular.

Tomando en cuenta la Tabla 2, que contiene el tamaño en pares de bases de cada amplicón, se determinó que en todos los casos, el producto de PCR presentaba el tamaño esperado. Los blancos además demostraron que no hubo contaminación de la mezcla de reacción en prácticamente todos los casos.

Con respecto a los productos de la PCR de la secuencia TcCLB.506203.2, como en ambos aparecen múltiples bandas, se decidió correr todo el producto de PCR y cortar la banda del gel correspondiente al tamaño esperado, para luego purificarla, utilizando el kit CFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

6.2.3. Producción de líneas de Trypanosoma cruzi sobreexpresantes de proteínas LRR

Una vez obtenidas las secuencias de interés mediante las reacciones de PCR, las mismas fueron clonadas en el vector de amplificación pGEM-T. Luego de realizar la transformación de bacterias electrocompetentes con el constructo pGEM-T_secuenciaLRR, mediante una extracción de ADN plasmídico y posterior secuenciado, se clonaron aquellas secuencias sin errores de amplificación. Estas secuencias fueron nuevamente clonadas en sus vectores de destino correspondientes, con el fin de obtener plásmidos de expresión recombinantes con las secuencias LRR seleccionadas. Luego de un segundo proceso de transformación de bacterias electrocompetentes, extracción de ADN plasmídico y secuenciación del mismo, se procedió a transfectar parásitos epimastigotas de la cepa Dm28c con todos los plásmidos de expresión recombinantes cuya secuencia estuviera libre de cambios, con el fin de obtener líneas sobreexpresantes de las secuencias LRR de interés. Como resultado de este proceso se establecieron las siguientes líneas transfectantes:

pDIY-eGFP: Línea control del vector de expresión pDIY-eGFP, expresa los tags 3-Flag, eGFP y HA. **pDIY-TcCMF46:** Expresa la proteína sobreexpresante TcCLB.506945.280 (de ahora en más denomi-

nanda TcCMF46, ver 6.4.1) fusionada a los tags 3-Flag y HA.

pDIY-TcPP1r: Expresa la proteína sobreexpresante TcCLB.507867.60 (de ahora en más denominada TcPP1r, ver 6.3.1) fusionada a los tags 3-Flag, eGFP y HA.

pDIY-203.20: Expresa la proteína sobreexpresante TcCLB.506203.20 fusionada a los tags 3-Flag, eGFP y HA.

pTREXn: Línea control del vector de expresión pTREXn, no expresa tags.

pTREXn-TcCMF46HA: Expresa la proteína sobreexpresante TcCMF46 fusionada a HA.

6.2.4. Determinación de sobreexpresión por Western Blot

Una vez establecidas las líneas sobreexpresantes, así como las líneas control de vectores vacíos, se procedió a realizar extractos proteicos para identificar si las líneas establecidas en cuestión sobreexpresan proteínas LRR, asociadas a los tags previamente seleccionados (ver Tabla 9).

Brevemente, para obtener los extractos proteicos totales de las diferentes líneas a evaluar, los parásitos epimastigotas fueron lisados en una relación de 2×10^6 parásitos/ μ L de buffer de lisis "Urea cracking buffer". Estos extractos obtenidos fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al ser expuestos a un campo eléctrico de intensidad constante (25-30 mA por gel), de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli [99]. Al finalizar la corrida, las proteínas separadas por tamaño fueron transferidas a una membranas de nitrocelulosa para inmunodetección por Western blot.

Dicha inmunodetección constó en exponer a la membrana a una dilución 1:500 del anticuerpo que detecta el tag HA fusionado a todas las proteínas sobreexpresantes. La Figura 20 muestra el resultado del Western blot obtenido, interrogando la presencia de HA en las siguientes líneas:

- 1. Dm28c Wild Type
- 2. pDIY-eGFP
- 3. pDIY-203.20
- 4. pDIY-TcPP1r
- 5. pDIY-TcCMF46
- 6. pTREXn
- 7. pTREXn-TcCMF46



Western Blot anti-HA (1:500)

Figura 20 – Identificación de sobreexpresión por Western blot de líneas transfectantes de *T. cruzi*. Inmunodetección de HA (1:500) en Dm28c Wild Type (WT) y en los transfectantes pDIY-eGFP vacío (VV: Vector Vacío), pDIY-203.20, pDIY-TcPP1r, pDIY-TcCMF46, pTREXn vacío (VV), y pTREXn-TcCMF46HA. En cada carril se sembró la cantidad de proteína correspondiente a 10×10^6 parásitos.

Analizando la Figura 20 se puede observar que las líneas Dm28c Wild Type y pTREXn (carriles 1 y 6, respectivamente) no muestran ningún patrón de bandas, lo que garantiza que las bandas identificadas contienen, en cada caso, el tag interrogado.

La expresión de los tres tags fusionados en la línea pDIY-eGFP (carril 2) migra a unos 35 kDa, consistente con su PM teórico (33 kDa).

La línea pDIY-203.20 (carril 3) presenta dos bandas, donde la banda de mayor tamaño migra por encima de los 55 kDa, pudiendo ser, por lo tanto, la proteína de fusión (con un PM teórico final de 62,2 kDa).

Para el caso de pDIY-TcPP1r (carril 4), se detectan dos bandas que migran cercanas a los 100 kDa y una que migra por encima de los 70 kDa. La banda que migra cercana a los 70 kDa puede ser la proteína sobreexpresante TcPP1r (cuyo PM teórico es de 78,7 kDa), mientras que las bandas cercanas a los 100 kDa podrían ser producto de algún tipo de modificación post-traduccional.

En cuanto a pDIY-TcCMF46 (carril 5) y pTREXn-TcCMF46HA (carril 7) se identifica una banda que migra cercana a los 70 kDa para ambos casos, consistente con sus PM teóricos finales (70,6 kDa y 67,6 kDa, respectivamente). Se puede observar, además, una pequeña diferencia de migración, que es coherente con la presencia del tag 3-Flag en el sobreexpresante pDIY-TcCMF46 que no se encuentran en pTREXn-TcCMF46HA, siendo la primer proteína sobreexpresante unos 3 kDa más grande que la segunda.

Podemos concluir de esta Figura, entonces, que todos los transfectantes expresan la proteína sobreexpresante en cuestión.

De las líneas establecidas e identificadas como sobreexpresantes, se decide continuar con la caracterización de aquellas que sobreexpresan las proteínas TcPP1r y TcCMF46, por lo que en las siguientes secciones se mostrarán los resultados de estudios realizados sobre las siguientes líneas establecidas:

- pDIY-eGFP
- pDIY-TcPP1r
- pDIY-TcCMF46
- pTREXn
- pTREXn-TcCMF46HA

6.3. Proteína TcPP1r: Protein Phosphatase regulatory subunit 1 (TcCLB.507867.60)

Como su nombre lo indica, la proteína TcPP1r (Protein Phosphatase regulatory subunit 1, de acuerdo con la anotación), participaría en la regulación de la proteína PP1 (Protein Phosphatase 1). Sin embargo, hasta la fecha no existen datos experimentales acerca de TcPP1r que avalen esta notación (por eso en la descripción aparece como putativa) y nada se sabe acerca de su acción sobre TcPP1.

6.3.1. Análisis in silico de la estructura de TcPP1r

Comparación de secuencias entre Sds22 de S. pombe y TcPP1r

Buscando en la información aportada por la base de datos tritrypdb.org sobre TcPP1r, se identifica a la proteína Sds22 de *Schizosaccharomyces pombe* como una proteína con la que comparte cierto grado de identidad, por lo que decidimos realizar una comparación de secuencias aminoacídicas entre estas dos proteínas.

La Figura 21 muestra dicha comparación entre Sds22 de *S. pombe* y TcPP1r. En ambas secuencias se identifican en amarillo aquellos repetidos LRR predichos por el predictor lrsearch [87] y APSSP2 [106], mientras que en gris sólo los repetidos LRR inferidos a partir del análisis de la estructura secundaria por el predictor APSSP2, en función de la estructura secundaria que adoptan dichos repetidos.

TcPP1r (Protein phosphatase 1 regulatory subunit, Trypanosoma cruzi: 402 residuos)

MSHTAEHGMEEADMKAEKREKLRKGLQALFAAKNTCVHKDSDEESAEEELLSGGQGSRECHTTPEAVLTIDTKSKVIEINNVRLFSLDEVELEKFT D<mark>CISLSLRKNLI</mark>HELSPFPEDLAAR<mark>LEELDLFDNKI</mark>RKVRDFFSTIRCMGESTLKENVTGAFGH<mark>LTKLDLSYNQI</mark>RNIGGLEPLAST<mark>LRELYLVE</mark> NKIKEIKNLDSLLN<mark>LELLELGGNRI</mark>REIGPGLAKLTK<mark>LKQLWLGKNKI</mark>ASIGTSLQTLVS<mark>LEILSLQANRL</mark>TSIEPDNFLGPDANPH<mark>LRELYLSE</mark> NGL</mark>KCIQNLGHLPM<mark>VQLIDFSFNPI</mark>SVINEDVINPRNMPQ<mark>LIEFWLTDGKI</mark>EKWDELGKLSGFKNT<mark>LRTVYLERNPI</mark>EEDKRYRDKVYMQLPFLE QIDSWPIVNKGNLEADRKRRA

Predicción estructura secundaria:

(a)

SDS22 SCHPO (Protein phosphatase 1 regulatory subunit SDS22 Schizosaccharomyces pombe: 332 residuos)

MSNVSSEDGIAPETQLIIDDPDVQQIDADEDLLDDVPDDVDCVELIQSRIQSMASLGLERFKNLQSLCLRQNQIKKIESVPETLTELDLYDNLIVR IENLDNVKNLTYLDLSFNNIKTIRNINHLKGLENLFFVQNRIRRIENLEGLDRLTNLELGGNKIRVIENLDTLVNLEKLWVGKNKI QKLSLLSIQSNRITQFENLACLSHCLRELYVSHNGITSFSGIEVLENLEILDVSNNMIKHLSYLAGLKNLVELWASNNELSSFQEIEDELSGLKK LETVYFEGNPLQKTNPAVYRNKVRLCLPQLRQIDATIIPKTSKQFP

Predicción estructura secundaria:

(b) TCCLB.507867.60 SKVIEINNVRLFSLDEVELEKFTDCISLSLRKNLTHELSPFPEDLAARLEELDLFDNKIRKVRDFFSTIRCMGESTLKENVTG LQSLCLRQNQIKKIESVFET----LTELDLYDNLIVRIENLDNVKN-LTYLDLSFNNIKTIRNINHLKG-------SDS22_SCHPO TCCLB.507867.60 AFGH<mark>LTKLDLSYNQI</mark>RNIGGLEPLAST<mark>LRELYLVENKI</mark>KEIKNLDSLLN<mark>LELLELGGNRI</mark>REIGPGLAKLTK<mark>LKQLWLGKNKI</mark> ----<mark>LENLFFVQNRI</mark>RRIENLEGLDR-<mark>LTNLELGGNKI</mark>RVIENLDTLVN<mark>LEKLWVGKNKI</mark>TKFENFEKLQK-<mark>LSLLSIQSNRI</mark> SDS22 SCHPO TCCLB.507867.60 ASIGTSLQTLVSLEILSLQANRLTSIEPDNFLGPDANPHLRELYLSENGLKCIQNLGHLPMVQLIDFSFNPISVINEDVINPR TQFENLACLSHCITELYVSHNGITSFSGIEVLEN-----LEILDVSNNMIKHLSYLAGLKNLVELWASNNELSSFQEIEDELS SDS22 SCHPO TCCLB.507867.60 NMPQLIEFWLTDGKIEKWDELGKLSGFKNTLRTVYLERNPIEEDKRYRDKVYMQLPFLEQIDSWPIVNKGNLEADRKRRA GLKKLETVYFEGNPLQKTNPAVYRNK----VRLCLPQLRQIDATIIPKTSKQFP SDS22 SCHPO

(c)

Figura 21 – Comparación de estructura secundaria de las proteínas Sds22 S. pombe (GenBannk accession number NP_593824.1) y TcPP1r. (a): Secuencia de la proteína Sds22 y predicción de su estructura secundaria. (b) Secuencia de las proteína TcPP1r y predicción de su estructura secundaria.(c): Comparación entre ambas secuencias. Referencias: Los guiones representan InDels, marcadas en amarillo se encuentran las regiones HCS de los repetidos LRR predichos para cada una de las proteínas en lr
rsearch.com [87] y según el predictor de estructura secundaria APSSP2 [106]. Las regiones HCS en amarillo corresponden a aquellas identificadas en ambos predictores, mientras que las que están marcadas en gris corresponden a las que sólo fueron identificadas por APSSP2. En la predicción de estructura secundaria, H: Hélice α , C: coiled coil, E: hebra β

El análisis comparativo entre la secuencia de TcPP1r (http://tritrypdb.org/tritrypdb/app/ record/gene/TcCLB.507867.60) [82] y Sds22 de *S. pombe* (GenBank accession number NP_593824.1) [98], muestra que, si bien presentan una identidad de secuencia de 36 %, existe una importante identidad a nivel de estructura secundaria. Como muestra la Figura 21, insertando unos pocos "gaps" (indicados con guiones), los repetidos LRR en ambas moléculas predichos por http://lrrsearch.com [87] y el predictor de estructura secundaria APSSP2 [106], se localizan en los mismos lugares. Estos "gaps" representan InDels, es decir, deleciones de residuos en la secuencia donde se encuentran los guiones, o inserciones en la otra secuencia. Por lo tanto, dada la importante similitud estructual entre TcPP1r y Sds22, es probable que TcPP1r en *T. cruzi* presente una función similar a la descrita en levaduras, por lo que nuestro siguiente paso fue buscar información acerca de esta familia de proteínas.
Las proteínas de la familia PP1r

Las proteínas de la familia PPr (Protein Phosphatase regulatory) han sido bien caracterizadas en numerosos organismos. Tal es el caso de la subunidad reguladora de fosfatasa Sds22 de *Schizosaccharomyces pombe*. La misma es una proteína que consiste casi enteramente en repetidos LRR de 22 residuos [108] (de hecho, su secuencia es tan característica que define a una de las 9 familias de motivos LRR; el motivo LRR tipo SDS22). Esta proteína es esencial para la transición metafase/anafase en *S. pombe*. Se ha propuesto que su presencia potencia la actividad de PP1 (proteína tipo Serine/Threonine Protein Phosphatase que juega un papel crucial en la regulación de eventos relacionados con la división celular en organismos eucariotas), evento esencial para la mitosis [108]. La Figura 22 muestra la predicción de la estructura tridimensional de Sds22 de *S. pombe* https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P22194 [109]. Al realizar una búsqueda de la localización subcelular de Sds22 de *S. pombe* en la base de datos Uniprot (http://www.uniprot.org/uniprot/P22194 [110]), se observa que la misma se encuentra localizada en el núcleo.



Figura 22 – Estructura tridimensional de la proteína Sds22 de *S. pombe.* (a) y (b): diferentes vistas de la proteína, mostrando sus regiones HCS, donde se pueden ver las hebras- β (indicadas con flechas) en la región cóncava y los VS en la región convexa, donde se pueden distinguir motivos tipo α -hélice. El color rojo indica residuos hidrofóbicos, mientras que el azul indica residuos hidrofílicos (https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P22194 [109])

6.3.2. Determinación de sobreexpresión y localización subcelular de TcPP1r mediante IFI

Dado que PP1r de levaduras ha sido localizada en el núcleo, quisimos ver si en el caso de *T. cruzi* la proteína presentaba una localización similar. Para ello se realizó una Inmunofluorescencia Indirecta sobre parásitos en el estadio epimastigota de pDIY-TcPP1r y su control, pDIY-eGFP, interrogando en ambos la presencia y localización del tag HA. En este ensayo la visualización de la proteína sobreexpresante se debe en parte por inmunodetección del tag HA fusionado a la proteína (ver 5.6.2), y por otra parte, por la detección de fluorescencia de la proteína sobreexpresante fuionada a eGFP en el canal verde. Para el caso de los epimastigotas de la línea pDIY-eGFP, la detección de los tags ocurre de la misma forma.







Figura 23 – Detección de expresión de tags en epimastigotas transfectantes pDIY-eGFP. (a) y (b): El canal rojo muestra la inmunodetección del tag HA, el canal verde muestra la expresión de eGFP, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge).



Figura 24 – Detección de TcPP1r en epimastigotas transfectantes pDIY-TcPP1r. (a) y (b): El canal rojo muestra la inmunodetección del tag HA, fusionado a la proteína TcPP1r, el canal verde muestra la expresión de eGFP, fusionada a la proteína TcPP1r, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge).

Como control negativo se puede observar la imagen (a) de la Figura 50 (ver Sección 10.2, disponible en Anexos), que muestra la inmunodetección del tag HA en epimastigotas Wild Type de la cepa Dm28c.

La Figura 23 muestra la expresión de los tags de la línea de transfectantes pDIY-eGFP. Se puede observar que la localización de la proteína de fusión parece ser citosólica, flagelar y nuclear, no hallándose en el kinetoplasto, y su disposición parece ser de tipo granular. Por otro lado se aprecia que la expresión

de dicha proteína de fusión no es homogénea dentro de la línea, habiendo parásitos con una alta tasa de expresión de tags, mientras otros parásitos tienen una expresión más leve.

Con respecto a la línea pDIY-TcPP1r, la Figura 24 muestra la expresión de la proteína TcPP1r, fusionada a los tags HA (canal rojo) y eGFP (canal verde). La localización subcelular de la proteína de fusión parece ser citosólica y flagelar, con una disposición más homogénea que la disposición de los tags en la línea control. A su vez, no se encuentra en el kinetoplasto, y a diferencia del control, parece estar excluida del núcleo.

Por último, en las imágenes se puede observar que la mayoría de los parásitos muestran colocalización de los tags (lo que es esperable), aunque algunos mostraron mayor expresión de uno de ellos. Esto puede ser indicio de cierto grado de proteólisis. Por otro lado, la expresión de la proteína TcPP1r sobreexpresante no es homogénea en la línea, al igual que para la línea pDIY-eGFP.

En ambos casos (línea pDIY-eGFP y pDIY-TcPP1r), la heterogeneidad en la expresión puede deberse a una característica intrínseca del vector de expresión pDIY-eGFP. Se ha reportado para el caso del vector pTREX (vector derivado de pRIBOTEX del cual derivan directamente todas las versiones del vector pDIY [78]) que luego de dos semanas de transfección, el número de parásitos fluorescentes disminuye considerablemente, aún en presencia del fármaco de selección [111].

6.3.3. Búsqueda de interactores de TcPP1r

Ya que los motivos LRR constituyen dominios de interacción proteína-proteína, para aproximarnos más a conocer la función que cumple PP1r en el parásito, y en particular conocer si esta proteína interacciona con PP1 (tal como ha sido descrito en otros organismos), llevamos a cabo un ensayo de inmunoprecipitación para identificar las proteínas que interactúan con TcPP1r, de forma que la identificación de las mismas nos permita aproximarnos más a la posible función y a la localización subcelular de esta proteína.

Brevemente, para la realización de este ensayo, epimastigotas de las líneas pDIY-eGFP y pDIY-TcPP1r fueron tratados con buffer de lisis conteniendo 0.5% o 1% de NP40 y centrifugados para la obtención de extractos proteicos citosólicos. La carga relativamente baja de detergente y de iones de este buffer permite que se mantengan muchas de las interacciones no covalentes entre proteínas, incluyendo aquellas entre la proteína sobreexpresante TcPP1r y sus interactores.

Una vez realizada la extracción de proteínas citosólicas, se procedió a la Inmunoprecipitación, donde los extractos interactuaron con beads magnéticos conjugados a anticuerpos anti-HA. Durante este tiempo se espera que el tag HA fusionado a la proteína TcPP1r sobreexpresante (asociada a sus interactores) se una a su anticuerpo (conjugado a lo beads magnéticos). Dicha unión (HA-anticuerpo-bead) permite que se pueda capturar y purificar del extracto citosólico a la proteína TcPP1r y sus posibles interactores.

Los productos de Inmunoprecipitación de pDIY-eGFP y pDIY-TcPP1r fueron evaluados por Western blot, utilizando el anticuerpo que detecta HA, permitiéndonos identificar la proteína de fusión en el material de inmunoprecipitación.

La Figura 25 muestra el resultado obtenido del Western blot realizado para identificar la eficiencia de la inmunoprecipitación:



Western Blot anti-HA (1:900)

Figura 25 – Evaluación de eficiencia de Inmunoprecipitación por Western blot. Los carriles impares contienen las muestras Flow through (FT), mientras que los carriles pares contienen las muestras de las inmunoprecipitaciones. El primer par de carriles comprende el tratamiento con NP40 0,5%, mientras que el segundo par es correspondiente al tratamiento con NP40 1%. La inmunodetección fue realizada con el anticuerpo anti-HA (dilución 1:900).

Una vez evaluada la Inmunoprecipitación, se seleccionaron los extractos correspondientes al tratamiento con buffer de lisis IP con 1% de NP40, dado que como se muestra en la Figura 25, no se logró extraer la proteína de interés. Para ambas líneas se prosiguió con la evaluación del patrón de bandas mediante tinción con Coomassie. Mediante la realización de otro gel, los extractos fueron separados por electroforesis, llevando a cabo una corrida corta, de forma que los productos de inmunoprecipitación se separen menos de 3 cm. Posteriormente, cada carril fue cortado en tres porciones, generando tres bandas por muestra (con dos réplicas por línea).

La Figura 26 muestra el gel teñido con Coomassie, donde las flechas indican las bandas diferenciales de pDIY-TcPP1r con respecto a pDIY-eGFP.



Figura 26 – Extractos de inmunoprecipitacion de pDIY-eGFP y pDIY-TcPP1r teñidos con Coomassie Blue G-250. Las muestras evaluadas corresponden a las inmunoprecipitaciones de extractos obtenidos mediante el tratamiento con NP40 1%. Las flechas indican bandas diferenciales que se encuentran en la línea sobreexpresante y no en la línea control.

Posteriormente, cada porción de gel fue digerida con Tripsina, obteniéndose péptidos de las proteínas que fueron inmunoprecipitadas. Dichos péptidos fueron extraídos del gel y analizados con el Espectrómetro de masa LTQ Velos + ETD, en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo, con el asesoramiento técnico de Rosario Durán y Madelón Portela.

Los resultados obtenidos de este procedimiento fueron analizados con el programa *PatternLab for Proteomics* [102], que analiza datos de proteómica obtenidos por métodos tipo "Shotgun", que permiten analizar proteínas de forma indirecta, a través de la obtención de datos de los péptidos generados por la proteólisis con Tripsina de dichas proteínas. Estos péptidos permiten, a la vez, una identificación y cuantificación de las proteínas presentes en una muestra determinada. La identificación se logra comparando los datos de masa sobre carga (m/z) generados experimentalmente con espectros teóricos presentes en bases de datos que se usan como referencia, mientras que la cuantificación es brindada mediante la aplicación de algoritmos como el "Peptide Spectrum Matching" (PSM), y filtros estadísticos, generando análisis de muestras estadísticamente significativos [102].

En nuestro caso, para realizar las búsquedas generamos una base de datos de las cepas CL Brener Esmeraldo y Non Esmeraldo-like de *Trypanosoma cruzi*, además de agregar manualmente la proteína GFP (que se espera esté presente).

La Tabla 10 muestra los datos obtenidos de analizar dos réplicas biológicas para cada línea. La tabla contiene aquellas proteínas que se encontraron en ambas réplicas de pDIY-TcPP1r, pero no estaban presentes en ninguna réplica del control.

Protein ID	Descripción	Características a destacar
	*	
Tc00.1047053506201.30	Serine/threonine-protein phosphatase	Subunidad beta de PP1 [104]
Tc00.1047053508815.110	Serine/threenine-protein phosphatase	Subunidad catalítica de PP1 [104]
Tc00.1047053510629.420	Protein phosphatase 1, regulatory subunit	Alelo de PP1r en CL Brener Non Esmeraldo-like
Tc00.1047053507867.60	Protein phosphatase 1, regulatory subunit	TcPP1r
Tc00.1047053506203.20	Dynein light chain, putative	

Tabla 10 – Posibles interactores de TcPP1r. Los resultados que se observan en la Tabla son producto del análisis de la Co-Inmunoprecipitación de pDIY-eGFP y pDIy-TcPP1r (con dos réplicas biológicas por ensayo). Las proteínas que se encuentran en la Tabla son proteínas que fueron identificadas en ambas réplicas sobreexpresantes, y no se encontraron en ninguna réplica control. Los datos asociados a las proteínas se obtuvieron de la base de datos http://tritrypdb.org [82].

Inicialmente, la identificación de TcPP1r, demuestra que la Inmunoprecipitación fue exitosa.

De las 5 proteínas identificadas; dos de ellas corresponden a proteínas PP1 de Trypanosoma cruzi; una de ellas es PP1 β [104] y la otra corresponde a la subunidad catalítica de PP1. La presencia de estas proteínas sugiere que estas subunidades de TcPP1 interaccionan con TcPP1r y, por lo tanto TcPP1r participaría en la formación de la holoenzima PPP1, actuando como una unidad reguladora o PPP1R [112].

Por otro lado, se ha demostrado que la proteína $PP1\beta$ es particularmente abundante en células espermáticas, tanto en el soma como en el flagelo, en células como las neuronas está generalmente asociada a microtúbulos, y durante la interfase suele presentar localización citoplasmática y nucleolar [112]. Estos datos refuerzan lo analizado anteriormente en los estudios de localización celular y en los ensayos de infección; esta proteína se localiza en el citoplasma y el flagelo, y podría participar en la modulación de actividades citosólicas de TcPP1 como la reorganización del citoesqueleto o la traducción de proteínas.

La última proteína identificada es TcCLB.506203.20, una proteína que está descrita como una cadena liviana de dineína. La presencia de esta proteína en el interactoma de TcPP1r reafirma la hipótesis de una posible modulación de la dinámica del citoesqueleto, mediada por la interacción TcPP1/TcPP1r, bajo forma de PPP1 [112].

Determinación de viabilidad con Calyculina A

De nuestros resultados de co-inmunoprecipitación surge que PP1r podría, a través de la interacción con PP1, regular la actividad de ésta última. Ya que se conoce que Calyculina A es un inhibidor específico de PP1 en varios organismos, incluido *T. cruzi*, se decidió realizar un ensayo que probara si la línea sobreexpresante de TcPP1r presenta una diferencia con respecto a la línea control (pDIY-eGFP) en la respuesta a Calyculina A. De existir tal diferencia, la misma puede ser un indicador de la acción de TcPP1r sobre TcPP1.

En *T. cruzi*, el uso de Calyculina A demostró que TcPP1 es importante para los procesos de división celular y mantenimiento de la forma celular; en cultivos de epimastigotas, en presencia de este fármaco en concentraciones cercanas a su IC_50 (10 nM), los parásitos detienen su replicación, y se generan cambios en su morfología [104].

Con estos antecedentes, se decidió realizar este ensayo (ver Método 5.8.2) para identificar si los sobreexpresantes de TcPP1r presentan una respuesta diferente ante el efecto de este fármaco inhibidor de TcPP1.

Brevemente, epimastigotas transfectantes de las líneas pDIY-eGFP y pDIY-TcPP1r fueron expuestos a concentraciones de Calyculina A en el rango de 1-15 nM durante 72 h. Pasado ese tiempo, la actividad de los parásitos fue medida mediante el ensayo de viabilidad con Resazurina (ensayo colorimétrico cuantitativo que usa la oxidación/reducción de la Resazurina como indicador de la citotoxicidad de diversos compuestos), determinando la supervivencia de ambas líneas a las concentraciones de Calyculina A a la que fueron expuestos.

Los resultados obtenidos de dicho ensayo, se observan en la Gráfica 27



Figura 27 – Ensayo de supervivencia a Calyculina A de epimastigotas sobreexpresantes de TcPP1r. Se grafica el porcentaje de crecimiento (con respecto a la línea crecida en ausencia de fármaco) con respecto al logaritmo de la concentración nanomolar de Calyculina A. Marcados con asteriscos se encuentran aquellos datos estadísticamente significativos (p-Valuej0,05

Estos resultados muestran una pequeña diferencia entre la supervivencia de pDIY-TcPP1r con respecto a pDIY-eGFP, donde los parásitos sobreexpresantes parecen ser más susceptibles a este fármaco. Estos resultados sugieren que TcPP1r actúa inhibiendo a TcPP1, disminuyendo así la capacidad replicativa de epimastigotas ante la presencia de un inhibidor de TcPP1.

6.3.4. Ensayos funcionales de TcPP1r

Dados los resultados obtenidos en los ensayos anteriormente analizados, que sugieren fuertemente la existencia de interacción entre TcPP1r y TcPP1, y que la misma sería de tipo reguladora, se realizaron una serie de ensayos funcionales, para determinar si existen diferencias producidas por la sobre expresión de esta proteína sobre ciertos procesos que ocurren a lo largo del ciclo de *Trypanosoma cruzi*, en los cuales podría participar este complejo (bajo la forma de holoenzima PPP1). Dentro de estos procesos a estudiar se encuentran la tasa de crecimiento de epimastigotas, la capacidad replicativa en amastigotas, la capacidad de invasión y la capacidad infectiva.

Curvas de crecimiento de epimastigotas sobreexpresantes de TcPP1r

Ya que se ha descrito en otros organismos que estas proteínas reguladoras de la actividad fosfatasa están implicadas en procesos relacionados con el ciclo celular, se realizaron curvas de crecimiento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, con la finalidad de identificar si la sobreexpresión de TcPP1r afecta de alguna manera la capacidad replicativa de parásitos en este estadio.

Para ello, brevemente, se partió de cultivos de parásitos epimastigotas con una concentración de 1×10^6 parásitos/mL y se contó en cámara de Neubauer cada 24 horas horas durante 13 días.

Las líneas interrogadas en este ensayo fueron las siguientes:

- Dm28c Wild Type
- pDIY-eGFP
- pDIY-TcPP1r

La Figura 28 muestra los resultados obtenidos.



Figura 28 – Curvas de crecimiento de epimastigotas sobreexpresantes de TcPP1r. Como controles se observan las curvas de epimastigotas Dm28 c
 Wild Type y la de pDIY-eGFP.

Estos resultados demuestran que todas las líneas estudiadas presentan una curva de crecimiento similar. No se encuentran diferencias significativas en las curvas de crecimiento del transfectante sobreexpresante con respecto a su control, ni con respecto a Dm28c Wild Type, lo que indica que la sobreexpresión de TcPP1r no afectaría el proceso de replicación, al menos en el estadio epimastigota.

Estos datos son consistentes con los obtenidos en la localización celular de la proteína sobreexpresante, la cual no fue encontrada en el núcleo, donde ocurren la mayor parte de los procesos reguladores del ciclo celular.

Ensayos de infección

Con el objetivo de identificar la influencia de la proteína TcPP1r en procesos como la capacidad de invasión, de replicación en el estadio amastigota y la capacidad infectiva de los parásitos, se realizaron ensayos de infección (ver Método 5.7.3) para las línea transfectante pDIY-PP1r y su control, pDIY-eGFP.

Brevemente, cultivos de células HeLa fueron incubadas durante 4 horas con tripomastigotas celulares. Una vez transcurrida la interacción, se removió el medio conteniendo los tripomastigotas que no invadieron células y se mantuvieron los cultivos durante 72 horas, momento en el cual fueron fijados y montados para su posterior procesamiento por microscopía de fluorescencia. Para cada línea transfectante se realizaron tres réplicas biológicas

Para cada línea se obtuvieron los siguientes datos:

- Número de células HeLa infectadas
- Número de amastigotas totales

Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas de la Figura 29.



Figura 29 – Ensayos de infección de sobreexpresantes TcPP1r. Los datos graficados corresponden al análisis por microscopía de fluorescencia de un aproximado de 300 células por réplica para cada línea, donde se analizan los parámetros %infección (a), número de amastigotas/célula (b) e índice de infección (c)

Al comparar los datos obtenidos para pDIY-TcPP1r, con respecto a su control, se obtuvieron los siguientes resultados:

Porcentaje de células infectadas: (p-value: 0,43)

- 28% de células infectadas con pDIY-eGFP.
- 23 % de células infectadas con pDIY-TcPP1r.

Número de amastigotas por célula: (p-value: 0,65)

- 8,5 amastigotas pDIY-eGFP por célula infectada.
- 7,5 amastigotas pDIY-TcPP1r por célula infectada.

Índice de infección: (p-value: 0,64)

- pDIY-eGFP tiene un índice de infección de 0,49.
- pDIY-TcPP1r tiene un índice de infección de 0,43.

Si bien estos datos no son estadísticamente significativos, se observó para todos los parámetros analizados, que la línea sobreexpresante de TcPP1r mostró tener una capacidad infectiva levemente menor que la línea control. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de TcPP1r podría influir levemente en la capacidad infectiva de los parásitos, ya sea inhibiendo la capacidad de sobrevida y/o replicativa de los parásitos en el estadio amastigota o inhibiendo la capacidad infectiva en el estadio tripomastigotas. Una posibilidad de dicho efecto puede ser que aquellos procesos en los que participe TcPP1 incidan indirectamente en el ciclo celular o el proceso infectivo, por lo que su sobreexpresión no genere cambios significativos en dichos procesos.

6.4. Proteína TcCMF46: Component of Motile Flagella 46 (TcCLB.506945.280)

La proteína con ID TcCLB.506945.280, es uno de los pocos casos de cambio de notación desde el comienzo del proyecto, ya que la misma estaba anotada como "Hypothetical protein", para cambiar luego a "Component of Motile Flagella 46". Esta proteína, de ahora en más llamada TcCMF46 (Component of Motile Flagella 46 de *T. cruzi*), sería por lo tanto una proteína asociada al flagelo. Sin embargo, no ha sido estudiada experimentalmente en *T. cruzi* hasta la fecha, por lo que su anotación se debe al estudio de su ortóloga en *T. brucei*, donde ha sido caracterizada su localización y parcialmente su función.

6.4.1. Análisis in silico de la estructura de TcCMF46

Como su nombre lo indica, TcCMF46 (Component of Motile Flagella 46) es una proteína que pertenecería al flagelo, estructura que participa activamente en procesos como la motilidad del parásito, la nutrición y la citocinesis (ver 1.2.6). Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, dicha notación no corresponde a estudios experimentales realizados en esta proteína, sino que deriva de estudios realizados en la proteína homóloga en *T. brucei*; TbCMF46.

Cuando en la base de datos tritrypdb.org [82] se busca información acerca de TcCMF46 (http:// tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/TcCLB.506945.280#InterPro) [82] y TbCMF46 (http: //tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/Tb927.6.5030#InterPro) [82], se identifica otra proteína con la que presentan cierta identidad de secuencia; DRC3 del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. Esta alga presenta dos flagelos, y es un organismo de referencia para el estudio de esta estructura dada la existencia de mutantes establecidos para diferentes secuencias asociadas al flagelo [32] y el hecho de que el núcleo estructural (la estructura 9+2) de cilias y flagelos se encuentra conservado desde protistas hasta mamíferos [31].

Con estos antecedentes, se realizó una comparación a nivel de secuencia de las proteínas TcCMF46, TbCMF46 y DRC3 de *C. reinhardtii* (GenBank accession number EDP03601) [98], que se muestran en la Figura 30, utilizando el predictor http://lrrsearch.com [87], con el fin de identificar la localización de los repetidos LRR en cada una.

DRC3 (Chlamydomonas reinhardtii: 524 residuos)

MPSLERLIAEVEPNVITESLTRECIQIQGGEPDTAANKKRTMPFRDVECLAFSFKNLACVDNLRGLDTLTKLQLDNQTTKIENLAHLTNLTWLDL SFNKITAISGLETLTKLVDLSLFNNQTAKIENLDTLVNLNVLSLGNNQLSQLDNVMYLRQFKQLRLVNLAGNPTCKSHDYRSYVLSHIKDLIYLD YRRVNPADVQAAREQHQDEMIELQEREEQQSQEEKLNAERESHEKLMKQANLEGVETLIDDMVKEDLEWPRLSQVPSLLDPWNEIRDKFNTYTDEF KVAILEQHNKKKAEYEEWLGVVRSYLDEKDAEARKLIVEYEKAKKRTARVVVDQPLMAESQIDNLKVKLMALKDQLMAIEMEAVEVLDGLVQEFDR AYSELAEINKGQYNGYFTQVRDLQNSFFNQLTSVAMTVFEKYNQENSDIESLPEEARTLLQDKDSLMNALQASHDAHMGKIDSLEDRLVSNELRSA NDLTSSNATWATKRNRDRISEIINYLERNVLELEELAGEEEGGEM

Predicción estructura secundaria:

(a)

TbCMF46 (Trypanosoma brucei: 552 residuos)

MSKGYTVYSLMHQPQETVINESLIRECIYLPTARVTDEERMRFVCAREEVQRKKRAKAAMETMELRNVTTLLASYRRIGRIENLVGLGN<mark>LTKLALD NNLT</mark>TTINNLGHLKK<mark>LQWLDLSFNQT</mark>TEISGLEELTE<mark>LDTLSLFANKI</mark>SVLQGMDTLTK<mark>LTSLSIGNNI</mark>EALEDAARYLHRITS<mark>LRVLTLKGNR</mark> MERQPLYRTRLLAFVPSLQFLDGLIVRRSEVVKAREEQREHLMPIDEEDQRIASELKAQQDAEDIRKDYQRFNCPDETKFYDE<mark>LFHLEVDGRSI</mark>SE ILRLDVFAMLSKDLIEKFQVEFTEKAKDLAETMKAIRAKRDADERVFQSTADRYKHNNAEASKKIIKEFEKELKVHIPRTSGKHDSNGKELPQEVI VRFEKRLQEVRHQLMEKEADQYDALESLNAGTIAKWKGDAVDVILQTAFENFLKMEVDFHAGLRKLFDTVFEMRQKQEHQSDTYHQLKQEESLLTV VDNKEEYLKFLGDWFEARRKRLEELEQFYVKNEENLLNERSARILKDEQCRHRNRMNEIHEFVEQMSLWVHSC

Predicción estructura secundaria:

(b)

TcCLB.506945.280 (Trypanosoma cruzi: 553 residuos)

MSKGYTVVSVMKQTQETVINESLIRDCIYLPPACTTEEERLRFVGVREENQRHQRVKTTMETMELHKVTTLLASYRRIGKIENLVGLCNLTKLALD NNNISVVCNLGHLKKLQWLDLSFNQITEICGLEDLVELETLSLFSNNISVIQGLETLKKLTSLSLGNNRIEALEDAARYLHRLGSLRILTLKGNR MEKQPHYKLRLLAFVPTLQFLDGCVIDPNEVVSAREEQRENLMPVDEEDERAAEVAKVEQELEKARKDYERFNCPDETNFYDELFHLELDGRGWVE LLRVDIIASLSKELLEKYQMEFTEKARELTEAMKAIRTRRDEDESAFNTASARYRQKNADACKAIIKQFEKEVKAHIPRTMWCREVDTGAIPSEVL SQLQIRLREVRHQLLEKEADQYDALESLNAGTIGKWKGDGIDVILQTAFENFLKMEADFQVALRQLFDSVFEMRQKQEHATDSYHLIKQDESIMAI IDNKEDYQKFLGDWFELRRKRLEEMEQMYISNEEKLLRERSTRILDEEQSRHRARLNEIHEFVEQMKGLLECAW

Predicción estructura secundaria:

(c)

Figura 30 – Comparación de estructura secundaria de las proteínas DRC3 de *C. reinhardtii*, TbCMF46 y TcCMF46. (a) Secuencia de la proteína DRC3 y predicción de su estructura secundaria. (b) Secuencia de las proteína TbCMF46 y predicción de su estructura secundaria. (c) Secuencia de las proteína TcCMF46 y predicción de su estructura secundaria. Referencias: Marcadas en amarillo se encuentran las regiones HCS de los repetidos LRR predichos para cada una de las proteínas en lrrsearch.com [87] y según el predictor de estructura secundaria APSSP2 [106], mientras que en gris están marcados aquellos repetido predichos solamente por APSSP2 y en verde aquellos predichos sólo por lrrsearch.com. En la predicción de estructura secundaria, H: Hélice α , C: coiled coil, E: hebra β .

En cuanto al tamaño, las tres son similares, teniendo TcCMF46 553 residuos, TbCMF46 552 residuos, mientras que DRC3 presenta 524 residuos.

A nivel de alineamiento, TcCMF46 y TbCMF46 comparten un 70% de su secuencia, mientras que TcCMF46 y DRC3, comparten un 26% de su secuencia (datos no mostrados). Sin embargo, a nivel de estructura secundaria, es evidente la relación entre estas proteínas. Mientras que DRC3 presenta 6 repetidos LRR descritos, TbCMF46 presenta 7 repetidos y TcCMF46 presenta 8. El primer posible repetido

de DRC no parece estar en las demás proteínas, pero todas comparten la localización de los repetidos 2-5 (tomando como referencia a DCR3). Todos los repetidos presentes en TbCMF46 se encuentran en TcCMF46 (ver Figura 30), y TcCMF46 presenta uno más. Esto demuestra que, si bien esta proteína no se encuentra altamente conservada a nivel de secuencia en estos tres organismos (aunque la relación evolutiva entre *T. brucei* y *T. cruzi* queda de manifiesto por el alto grado de identidad), sí lo hace a nivel de estructura secundaria, lo que le brinda en última instancia su función.

Tomando este análisis en consideración, decidimos buscar información acerca de la función y localización subcelular que DRC3 presenta en *C. reinhardtii*, con el fin de tener un primer acercamiento hacia la posible función y localización de TcCMF46.

DRC3 es una proteína que pertenece al complejo N-DRC o "Nexin-Dynein Regulatory Complex" [32], antes llamado DRC [113]. Este es un complejo macromolecular formado por al menos 12 proteínas [32]. Como se mencionó en la Sección 1.2.6, los N-DRC están conectados con los brazos externos de dineínas ("outer dynein arms" u ODAs) a través de conectores de brazos externos de dineínas y regula tanto los ODAs como los brazos internos de dineínas ("Inner Dynein Arms" o IDAs). Dichos complejos son importantes nexos en el axonema, dado que conecta cada doblete de microtúbulos ("Doublet MicroTubule" o DMT) con sus DMTs vecinos, a través de uniones con nexina [32], [34]. Es esta conexión entre N-DRC, IDAs, ODAs y el "Radial Spoke" (RS) la que produce el doblamiento del flagelo, y con él, su desplazamiento.

La Figura 8 [32] en la Sección 1.2.6, muestra la estructura de N-DRC en el axonema en un corte transversal, indicando la posición de DRC3 en verde.

Estos datos, junto con el análisis comparativo entre TcCMF465, TbCMF46 y DRC3 sugieren que TcCMF46 sería una proteína asociada al flagelo, particularmente al axonema, y que participaría en la regulación de su motilidad.

6.4.2. Generación del anticuerpo policional anti-TcCMF46

Dado que la proteína TcCMF46 es una de las seleccionadas para realizar estudios funcionales y de localización subcelular, se decidió generar un anticuerpo policional de la misma en conejo. Para ello, se analizó la secuencia de la proteína en busca de un péptido que tuviera cualidades antigénicas y poco grado de identidad con proteínas de mamíferos. Una vez elegido el péptido, el laboratorio Genescript generó y purificó el anticuerpo.



Western Blot anti-TcCMF46

Figura 31 – Determinación de especificidad del anticuerpo policional anti-TcCMF46 por Western blot. Dilución final de uso para Western blot 1:5800. Extractos totales de epimastigotas Dm28c Wild Type (WT), pDIY-eGFP (VV: Vector Vacío) pDIY-TcCMF46, pTREXn VV (Vector Vacío) y pTREXn-TcCMF46HA. En todos los casos se sembró la cantidad de proteína correspondiente a 10×10^6 parásitos. La banda que se observa en los carriles 3 y 5 corresponden a la proteína TcCMF46 sobreexpresante.

Luego de una puesta a punto, se eligió la dilución 1:5800 para inmunodetección de la proteína sobreexpresante mediante ensayos de Western blot. Sin embargo, la proteína endógena no pudo ser detectada por Western blot, aunque aumentáramos la cantidad de antígeno por muestra.

La Figura 31 muestra un Western blot 1:5800 del anticuerpo policional sobre extractos totales de preteínas, donde se detecta la proteína sobreexpresante en pDIY-TcCMF46 y pTREXn-TcCMF46HA, ya que las bandas corren a la altura esperada (70,6 kDa y 67,6 kDa, respectivamente), y con la diferencia de tamaño ya comentada anteriormente entre estas proteínas sobreexpresantes. Se observa además que no hay detección de TcCMF46 en Dm28c Wild Type (carril 1), en pDIY-eGFP (carril 2), ni pTREXn (carril 4), donde la marca correspondería únicamente a la expresión de la proteína endógena.

6.4.3. Determinación de sobreexpresión y localización subcelular de TcCMF46 mediante IFI

Con la finalidad de identificar la localización subcelular de la proteína TcCMF46 en diversas etapas del ciclo de *Trypanosoma cruzi*, se realizaron diversos ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta, con el anticuerpo policional anti-TcCMF46, el cual permitió la identificación de la localización subcelular de la proteína endógena en parásitos no sobreexpresantes (Dm28c Wild Type, pDIY-eGFP y pTREXn), además de la localización de la proteína sobreexpresante. Esto permite a su vez, identificar si para el caso de los sobreexpresantes, dicha sobreexpresión de la proteína la deriva hacia otras regiones celulares.

Utilizando los antecedentes de su notación, para identificar si la proteína presenta una disposición asociada al citoesqueleto, se decidió realizar los ensayos de Inmunofuorescencia Indirecta interrogando a la vez la localización de la proteína TcCMF46 y de α -Tubulina, uno de los principales componentes del citoesqueleto, al ser la unidad fundamental de los microtúbulos (ver Sección 1.2.5).

Para la Inmunofluorescencia Indirecta, se utilizó la dilución 1:870 del anticuerpo policional anti-TcCMF46 para la imnunodetección de la proteína TcCMF46, y las imágenes fueron obtenidas con un ajuste fijo de parámetros para que fueran comparables entre las diferentes líneas.

Los controles realizados para determinar la especificidad de los anticuerpos utilizados se encuentran en la Sección Anexos (Figuras 50 y 52).

Determinación de localización subcelular de TcCMF46 en epimastigotas

Nuevamente, siguiendo los pasos del método 5.6.2, se realizó la Inmunofluorescencia con el anticuerpo policional de conejo anti-TcCMF46 en epimastigotas de las siguientes líneas:

- Dm28c Wild Type (ver Figura 32)
- pTREXn (ver Figura 33)
- pDIY-TcCMF46 (ver Figura 34)
- pTREXn-TcCMF46HA (ver Figura 35)

Se analizó primero la localización de la proteína endógena en las líneas Dm28c Wild Type y pTREXn. Para todos los casos se usó como referencia la imagen (a) de la Figura 5 [25], que muestra una representación 2D y 3D de la estructura del estadio epimastigota, para identificar la posible localización subcelular de la proteína.



(a): Dm28c Wild Type



(b): Imagen (a) sin canal verde



(c): Dm28c Wild Type



(d): Imagen (a) sin canal verde

Figura 32 – Detección de TcCMF46 en epimastigotas Wild Type Dm28c. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.





(b): imagen (a) sin canal verde





(d): Imagen (c) sin canal verde

Figura 33 – Detección de TcCMF46 en epimastigotas transfectantes pTREXn. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.

Inicialmente se pudo identificar que en IFI se detecta la proteína endógena, a pesar de no detectarse en los ensavos de Western blot.

En estas líneas, se observó que la proteína endógena colocaliza mayoritariamente con α -Tubulina. Se puede determinar además, que su concentración es mayor a los lados de la célula, rodeando el núcleo y el kinetoplasto (en el caso de los epimastigotas, el kinetoplasto se encuentra en una posición anterior con respecto al núcleo [114], [115], lo que se puede observar en la imagen (a) de la Figura 5 [25]). Esta localización se puede apreciar con nitidez en la imagen (c) de la Figura 32.

También en algunos casos se la puede ubicar en la región que corresponde al bolsillo flagelar, por delante del kinetoplasto (ver imágenes (a) y (b) de Figura 32). Es por ello que para cada foto se realizó una superposición sin α -Tubulina, que pudiera identificar la relación espacial entre TcCMF46, el núcleo

y el kinetoplasto, e identificar que efectivamente estos tres componentes tienen una relación espacial. Retomaremos esta idea en análisis posteriores.



(d): Imagen (c) sin canal verde

Figura 34 – Detección de TcCMF46 en epimastigotas transfectantes pDIY-TcCMF46. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.



(a): pTREXn-TcCMF46HA



(b): imagen (a) sin canal verde



(c): pTREXn-TcCMF46HA



(d): Imagen (c) sin canal verde

Figura 35 – Detección de TcCMF46 en epimastigotas transfectantes pTREXn-TcCMF46HA. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.

En cuanto a pDIY-TcCMF46 (ver Figura 34) y pTREXn-TcCMF46HA (ver Figura 35), claramente hay un mayor nivel de expresión que en las líneas no sobreexpresantes, Incluso se observa más intenso el flagelo en estas líneas, lo que indica que hay mayor cantidad de proteína allí. Por otro lado, el patrón de localización en las líneas sobreexpresantes es prácticamente igual al de la proteína endógena; colocalización mayoritaria con α -Tubulina, y mayor concentración a los lados de la célula, rodeando el núcleo y el kinetoplasto.

La proteína homóloga en *Trypanosoma brucei* (TbCMF46), presenta una función y localización que están asociadas específicamente al flagelo del parásito (de allí su nombre: Component of Motile Flagella 46 [41]). Sin embargo, TcCMF46 no parece tener una localización exclusiva en el flagelo, aunque sí está presente. Esto puede ser resultado de la divergencia evolutiva entre estos organismos; si bien ambas proteínas tienen un alto grado de homología (70 %, ver Sección 6.1.3) y se ubican asociadas al citoesqueleto, sus funciones y localización pueden haber variado (al menos sutilmente) una vez que estos organismos tomaron caminos evolutivos diferentes.

Determinación de localización subcelular de TcCMF46 en tripomastigotas

Las imágenes de tripomastigotas celulares de las líneas pTREX
n y pTREXn-TcCMF46HA fueron obtenidas realizando ensayos de interacción con c
élulas HeLa. Brevemente, cultivos de células HeLa fueron infectados con tripom
astigotas celulares, manteniendo una relación parásito:
célula de 5:1, permitiendo la interacción durante 30 minutos. Una vez finalizada la interacción, los cultivos fueron fijados y se procedió a realizar ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta, interrogando las proteínas TcCMF46 y α -Tubulina.





(b): imagen (a) sin canal verde





(d): Imagen (c) sin canal verde

Figura 36 – IFI de interacción de células HeLa y tripomastigotas celulares pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.

Al igual que en epimastigotas, la proteína endógena en tripomastigotas colocaliza en gran parte con α -Tubulina. Sin embargo, no es clara la relación espacial que se logra observar en epimastigotas entre la proteína y el kinetoplasto (el cual, en el caso de los tripomastigotas, se sitúa posterior al núcleo [114], [115], ver la imagen (b) de la Figura 5 [25]). Para el caso de la línea sobreexpresante, la localización de la proteína parece se más homogénea en toda la célula (ver imágenes (c) y (d) de Figura 36), lo cual puede ser un efecto de la propia sobreexpresión.

Determinación de localización subcelular de TcCMF46 en amastigotas

En este análisis se tomó como referencia de la estructura y localización de organelos en amastigotas, la imagen (c) de la Figura 5 [25]. En este estadio, al igual que en epimastigotas, el kinetoplasto se encuentra en posición anterior con respecto al núcleo [114], [115].

Para identificar la localización de la proteína TcCMF46 en amastigotas de las líneas pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta en las siguientes situaciones:

- Invasión de células HeLa (4 horas horas post-interacción): Figura 37
- Infección de células HeLa (72 horas post-invasión): Figura 38
- Infección de células HeLa (96 horas post-invasión): Figura 39

En todos los casos, cultivos de células HeLa fueron infectados con tripomastigotas celulares, manteniendo una relación parásito:
célula de 5:1, permitiendo la interacción durante 4 h. En el ensayo de invasión, los parásitos fueron removidos y los cultivos fijados inmediatamente, procediéndose al ensayo de IFI, mientras que en los ensayos de infección, los cultivos fueron mantenidos durante 72 o 96 h, para luego ser fijados y procederse al ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta. En todos los casos se realizó la inmunodetección interrogando las proteínas TcCMF46 y α -Tubulina.





(b): imagen (a) sin canal verde





(d): Imagen (c) sin canal verde

Figura 37 – IFI de invasión de células HeLa con amastigotas intracelulares pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.





(b): imagen (a) sin canal verde





(d): Imagen (c) sin canal verde

Figura 38 – IFI 72 horas pos-invasión de células HeLa con amastigotas intracelulares pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.





(b): imagen (a) sin canal verde





Figura 39 – IFI 96 horas pos-invasión de células HeLa con amastigotas intracelulares pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA. (a) y (c). Las imágenes (a) y (b) corresponden a la línea pTREXn, mientras que la imagen (c) corresponde a pTREXn-TcCMF46HA. En (a) y (c), el canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b): Corresponde a las imagen (a) pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.

Para el caso de los amastigotas en los ensayos de invasión, al igual que sucede con los tripomastigotas, sólo se logra determinar la colocalización casi completa con α -Tubulina, pero no se ve una clara relación espacial con el núcleo o el kinetoplasto (esto ocurre tanto con la línea pTREXn, como con pTREXn-TcCMF46HA).

Sin embargo, si analizamos las imágenes a las 72 y 96 horas post-infección, al igual que en epimastigotas, en amastigotas intracelulares se puede ver una disposición más concentrada en la región correspondiente al bolsillo flagelar (ver imágenes (a) y (b) de Figura 38), pero a diferencia de lo observado en los estadios anteriores, no hay una clara colocalización con α -Tubulina, e incluso parece tener cierta disposición citosólica y granular. Esto ocurre en ambas líneas, por lo que no se debe a un efecto de la sobreexpresión de la proteína sobreexpresante o de la fusión a tags.

6.4.4. Determinación de localización subcelular de TcCMF46 por Western Blot

Con los antecedentes obtenidos mediante IFI, que mostraron una colocalización con α -Tubulina, y con ello, su asociación al citoesqueleto, llevamos a cabo el método de extracción de proteínas de citoesqueleto para la línea sobre presante (pTREXn-TcCMF46HA) y su control (pTREXn), detallado en 5.5.2.

La Figura 40 muestra los Western blot con el anticuerpo anti-HA, realizados sobre los extractos de citoesqueleto de pTREXn-TcCMF46HA y pTREXn a diferentes concentraciones de Tritón X-100.

Como control de presencia de proteínas en el extracto citosólico, se realizó la inmunodetección de la proteína Superóxido dismutasa B o SODB, utilizando un anticuerpo específico generado previamente en el laboratorio, que se aprecia en los Western blot inferiores de ambas imágenes. Esta es una conocida metaloenzima citosólica ubicua en organismos aeróbios, que participa en la detoxificación de radicales superóxido, catalizando su conversión a oxígeno y peróxido de hidrógeno [116].



Figura 40 – Determinación de localización subcelular de TcCMF46 por Western blot. Inmunodetección con anti-HA (imágenes superiores, dilución 1:900) y anti-SodB (imágenes inferiores, dilución 1:3000) de transfectantes pTREXn (a) y pTREXn-TcCMF46HA (b) de extractos de citoesqueleto (CE) y extractos citosólicos (CS) a diferentes concetraciones de Tritón X-100. Como control se siembra extractos de parásitos sin tratamiento con Tritón X-100 (extractos totales: ET). En ambos casos se sembró la cantidad de proteína correspondiente a 10×10^6 parásitos para los extractos totales y de citoesqueleto, mientras que se sembró un aproximado de 50×10^6 parásitos para los extractos citosólicos.

En la imagen (b) de la Figura 40 se puede identificar que la proteína TcCMF46HA se encuentra tanto en la muestra de extractos totales de proteínas (ET), como en las fracciones de citoesqueleto (CE) de todas las muestras tratadas con Tritón X-100, sin importar la concentración de dicho detergente usada para la extracción de citoesqueleto. Por otro lado, no se la encuentra en las fracciones citosólicas (CS) correspondientes.

La presencia de SODB se puede identificar mayoritariamente en la fracción citosólica y en menor medida en la fracción de citoesqueleto. Esto prueba que la falta de detección de TcCMF46HA en esta fracción se debe a que se encuentra asociada al citoesqueleto, y no en el citosol. Otra cosa a destacar de estos resultados, especialmente observando los extractos correspondientes a pTREXn (imagen (a) de la Figura 40) es que, si bien SODB se encuentra en todos los extractos (citosólicos y de citoesqueleto) a medida que aumenta la concentración de Tritón X-100, disminuye la cantidad de SODB en los extractos de citoesqueleto y aumenta en los de citosol. Esto demuestra que, a mayores concentraciones de este detergente, mejor es la separación de proteínas del citoesqueleto y del citosol, y por ende, mayores deben ser las fuerzas de interacción en las proteínas que se mantienen unidas al citoesqueleto.

Los resultados obtenidos mediante este ensayo confirmaron lo observado en la Inmunofluorescencia indirecta; TcCMF46 es una proteína asociada al citoesqueleto del parásito.

6.4.5. Determinación de localización subcelular de TcCMF46 en "ghosts" o fantasmas de epimastigotas mediante IFI

Ya en la Sección 6.4.4, se determinó que la proteína sobreexpresante TcCMF46HA se encuentra asociada al citoesqueleto en epimastigotas, y se corroboró en la Sección 6.4.3 que dicha localización la presenta la proteína endógena, y se mantiene en los estadios amastigota y tripomastigota celular.

Para lograr una mejor caracterización de la asociación de CMF46 con el citoesqueleto decidimos realizar estudios de Inmunofluorescencia Indirecta que permitieran identificar la localización subcelular de la proteína en ausencia de material citosólico, quedando solamente el material asociado al citoesqueleto. En este procedimiento (modificado del protocolo de Robinson [30]), los parásitos en estadio epimastigota son tratados con concentraciones de 0,005% (Figura 41), 0,2% (Figura 42) o 0,5% (Figura 43) de Tritón X-100 en buffer MME, obteniéndose lo que Bordier denominó en 1982 como "Plasma membrane cytoskeleton complex" o "Ghosts" [117] (ver Método 5.5.2). Posteriormente, siguiendo los pasos del

método 5.6.2, se realizó la Inmunofluorescencia con el anticuerpo policional de conejo anti-TcCMF46 y con el anticuerpo monocional de ratón anti- α -Tubulina







(b): imagen (a) sin canal verde



(c): pTREXn-TcCMF46HA



(d): Imagen (c) sin canal verde

Figura 41 – Citoesqueleto de epimastigotas pTREX
n y pTREX
n-TcCMF46HA obtenidos con 0,005 % Triton X-100. Las imágenes (a) y (b) corresponden a la línea pTREX
n, mientras que las imágenes (c) y (d) corresponden a pTREX
n-TcCMF46HA. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.





(b): imagen (a) sin canal verde





(d): Imagen (c) sin canal verde

Figura 42 – Citoesqueleto de epimastigotas pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA obtenidos con 0,2% Triton X-100. Las imágenes (a) y (b) corresponden a la línea pTREXn, mientras que las imágenes (c) y (d) corresponden a pTREXn-TcCMF46HA. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.



(d): Imagen (c) sin canal verde

Figura 43 – Citoesqueleto de epimastigotas pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA obtenidos con 0,5 % Triton X-100. Las imágenes (a) y (b) corresponden a la línea pTREXn, mientras que las imágenes (c) y (d) corresponden a pTREXn-TcCMF46HA. (a) y (c): El canal rojo muestra la inmunodetección de la proteína TcCMF46, el canal verde muestra la inmunodetección de α -Tubulina, el canal de UV muestra al núcleo y kinetoplasto (AN: Ácidos Nucleicos) por tinción con DAPI y el último canal muestra la superposición de los tres anteriores (Merge). (b) y (d): Corresponden a las imágenes (a) y (c), respectivamente, pero sin el canal verde, con el fin de identificar la relación de localización entre el kinetoplasto y la proteína TcCMF46.

Inicialmente se puede observar cómo, a medida que se aumenta la concentración de Triton X-100, se pierde la morfología celular.

En la concentración más baja utilizada (0,005 % Triton X-100) los epimastigotas se pueden diferenciar unos de otros, si bien todos perdieron su forma característica. Esto se debe a la presencia del corset subpelicular de microtúbulos [30], [26], que probablemente mantenga su estructura a esta concentración de detergente. A medida que se aumenta la concentración de detergente, las únicas estructuras que se mantienen y se pueden identificar son flagelos, núcleos y kinetoplastos. Se puede observar, ademas, que, si bien la mayoría de las células perdieron la forma, el flagelo se mantiene unido al kinetoplasto, y este al núcleo, por lo que en la mayoría de los casos, independientemente de la concentración de detergente utilizada, se mantienen los tres componentes unidos.

Analizando ahora la localización de la proteína TcCMF46 en las Figuras correspondientes al tratamiento de la línea pTREXn (que muestran la disposición de la proteína endógena), se identifica con claridad que la misma se encuentra en su mayor concentración en la región del bolsillo flagelar. Si bien esto es visible en los diferentes tratamientos con Triton X-100, es más marcado en las imágenes (a) y (b) de las Figuras 42 (línea pTREXn tratada con 0,2% de Tritón X-100) y 43 (línea pTREXn tratada con 0,5% de Tritón X-100).

Además de esta localización, TcCMF46 parece estar asociada también al flagelo y al corset subpelicular de microtúbulos, colocalizando con α -Tubulina. Esto es especialmente notorio en las imágenes (a) y (b) de la Figura 41 (línea pTREXn tratada con 0,005 % de Tritón X-100). Sin embargo, su disposición parece ser más granular que la de α -Tubulina.

Para el caso de los ensayos con pTREXn-TcCMF46HA, se observa básicamente el mismo patrón de localización que con pTREXn, y con excepción de las imágenes (c) y (d) de la Figura 43 (línea pTREXn-TcCMF46HA tratada con 0,5 % de Tritón X-100), no es claro el mayor nivel de expresión de TcCMF46. Para este último caso, su sobreexpresión parece haberla derivado hacia el flagelo, dado que se la ve en mayor abundancia en esta estructura, con respecto a su control.

6.4.6. Ensayos funcionales de TcCMF46

Continuando con la caracterización de TcCMF46, se realizó una serie de ensayos funcionales, para determinar la acción de esta proteína sobre ciertos procesos que ocurren a lo largo del ciclo de *Trypanosoma cruzi*, como replicación (en epimastigotas y amastigotas), capacidad de invasión y capacidad infectiva, entre otros.

Curvas de crecimiento de epimastigotas sobreexpresantes de TcCMF46

Con el objetivo de determinar si la sobre expresión de TcCMF46 afecta de alguna manera la capacidad replicativa de parásitos en el estadio epimastigota, realizamos el ensayo de curva de crecimiento de epimastigotas. Para ello, brevemente, se partió de cultivos de parásitos epimastigotas con una concentración de 1 × 10⁶ parásitos/mL y se contó en cámara de Neubauer cada 24 horas durante 13 días.

El ensayo se realizó sobre las siguientes líneas:

- DM28C Wild Type
- pDIY-eGFP
- pDIY-TcCMF46
- pTREXn
- pTREXn-TcCMF46HA

La Figura 44 muestra los resultados obtenidos.



Figura 44 – Curvas de crecimiento de epimastigotas sobreexpresantes de TcCMF46. Se observan las curvas de crecimiento de las líneas sobreexpresantes de TcCMF46 en ambos vectores; pDIY-eGFP y pTREXn. Como control se observa, además de las líneas controles de vectores, la curva de epimastigotas Dm28c Wild Type.

Los resultados de este ensayo muestran que no se observaron diferencias significativas en las curvas de crecimiento de los transfectantes sobreexpresantes con respecto a Dm28c Wild Type, ni con respecto a las líneas control de vectores, lo que indica que TcCMF46 no estaría participando en el proceso de replicación, al menos en el estadio epimastigota.

Ensayos de infección

Una vez analizado el efecto de la sobreexpresión de TcCMF46 en la replicación del estadio epimastigota, se prosiguió con ensayos funcionales que permitieran el análisis de la influencia de dicha sobreexpresión en otros procesos, esta vez en el contexto de la infección, como su capacidad infectiva, la capacidad de invasión del parásito en el estadio tripomastigota celular, así como de replicación en el estadio amastigota intracelular.

Al igual que en los ensayos de infección para el estudio de TcPP1r, cultivos de células HeLa fueron incubados durante 4 horas con tripomastigotas celulares. Una vez transcurrida la interacción, se removió el medio conteniendo los tripomastigotas que no invadieron células y se mantuvieron los cultivos durante 72 horas, momento en el cual fueron fijados y montados para su posterior procesamiento por microscopía de fluorescencia. Para cada línea transfectante se realizaron tres réplicas biológicas.

Las líneas transfectantes estudiadas fueron:

- pDIY-eGFP
- pDIY-TcCMF46
- pTREXn
- pTREXn-TcCMF46HA

Para identificar la influencia de la sobreexpresión de TcCMF46 en los procesos anteriormente mencionados, se analizaron parámetros como el %*infección* (ver Ecuación 1), *promedio de amastigotas/célula* (ver Ecuación 2) e *índice de infección* (ver Ecuación 3).

Para cada línea se obtuvieron los siguientes datos:

- Número de células HeLa infectadas
- Número de amastigotas totales

Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas de la Figura 45.



Figura 45 – Ensayos de infección de líneas sobreexpresantes de TcCMF46. Los datos graficados corresponden al análisis por microscopía de fluorescencia de un aproximado de 300 células por réplica para cada línea (a): Gáfica de *%infección* (b): Gáfica de *número de amastigotas/célula* (c) Gáfica de *índice de infección*. En todas las gráficas se marcan con un asterisco aquellos datos que son estadísticamente significativos (p-Value<0,05)

Al comparar cada línea sobreexpresante con su control, se obtienen los siguientes datos:

%infección en las líneas de pDIY: (p-value: 0,49)

- pDIY-eGFP presenta un 27,9 % de células infectadas.
- pDIY-TcCMF6 presenta un 32,6 % de células infectadas.
- *%infección* en las líneas de pTREXn: (p-value: 0,002)
-
 pTREX
n presenta un $32,3\,\%$ de células infectadas.
- pTREXn-TcCMF46HA presenta un 56,1 % de células infectadas.

Número de amastigotas por célula en las líneas de pDIY: (p-value: 0,74)

- pDIY-eGFP presenta un promedio de 8,5 amastigotas por célula infectada.
- pDIY-TcCMF46 presenta un promedio de 9,2 amastigotas por célula infectada.
- Número de amastigotas por célula en las líneas de pTREXn: (p-value: <0,0001)
- pTREXn presenta un promedio de 7,0 amastigotas por célula infectada.
- pTREXn-TcCMF46HA presenta un promedio de 10,2 amastigotas por célula infectada.

Índice de infección en las líneas de pDIY: (p-value: 0,41)

- pDIY-eGFP tiene un índice de infección de 0,78 .
- pDIY-TcCMF46 tiene un índice de infección de 1,1.
- *Índice de infección* en las líneas de pTREXn: (p-value: 0,0004)
- pTREXn tiene un índice de infección de 0,67.
- pTREXn-TcCMF46HA tiene un índice de infección de 1,8.

Analizando los datos se pudo determinar en todos los casos un aumento en los parámetros de infección estudiados entre los sobreexpresantes y sus controles respectivos. Estos datos indican entonces, que las líneas sobreexpresantes de TcCMF46 son más infectivas que las líneas control; infectan mayor cantidad de células, presentan una mayor tasa de replicación dentro las células, generando mayor cantidad de amastigotas por célula, y presentan, por lo tanto, un mayor índice de infección.

Ensayos de invasión celular

Dado que en los ensayos de infección los valores con mayor diferencia fueron los de porcentaje de células infectadas (% infección), se decidió realizar ensayos de invasión (ver Método 5.7.2), para identificar si estas diferencias se debían a diferencias en la capacidad de invasión de los tripomastigotas sobreexpresantes de TcCMF46, con respecto a su control. Este ensayo se realiza únicamente con pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA, ya que es la dupla cuyos resultados del ensayo de infección fueron estadísticamente significativos.

Brevemente, cultivos de células HeLa fueron infectados con tripomastigotas celulares, manteniendo una relación parásito:célula de 5:1, permitiendo la interacción durante 4 horas. Pasado dicho tiempo, los parásitos fueron removidos y los cultivos fijados inmediatamente. El número de células infectadas y el número de amastigotas por célula fue determinado con microscopio de epifluorescencia y las imágenes fueron analizadas con el programa Icy [101], mediante la visualización de los kinetoplastos y núcleos de los parásitos teñidos con DAPI, así como núcleos de las célula HeLa. Para cada réplica, se contabilizó un aproximado de 300 células totales.

De forma similar al análisis de infección, del ensayo de invasión se determinan los siguientes parámetros:

- Número de células HeLa
- Número de células HeLa infectadas

Estos datos fueron utilizados para analizar el % invasión, de la misma manera que se determinó el % infección en el ensayo de infección (ver Ecuación 1). Los resultados se pueden observar en la Gráfica 46.



Figura 46 – Ensayos de invasión de pTREXn-TcCMF46HA. Al igual que para los ensayos de infección, se analizó por microscopía de fluorescencia un aproximado de 300 células por réplica para cada línea, determinándose así el % invasión para cada línea.

Los datos obtenidos para %*invasión* muestran la misma tendencia que en el ensayo de infección. Si bien estos resultados no son estadísticamente significativos (p-value: 0,056) se confirma la hipótesis que TcCMF46 participa en la invasión del parásito a la célula de mamífero, dado que su sobreexpresión le otorga mayor capacidad de invadir células a los parásitos tripomastigotas.

Amastigogénesis

Una vez analizados los parámetros obtenidos en los ensayos de infección, identificamos que existe una mayor diferencia en los porcentajes de infección que en el promedio de amastigotas/célula cuando comparamos a las líneas sobreexpresantes con sus controles respectivos. Con el fin de identificar si esta menor diferencia se debe a un efecto de la sobreexpresión de TcCMF46 sobre la capacidad de los parásitos de realizar el cambio de estadio tripomastigota a amastigota en condiciones axénicas, se realizó el ensayo de amastigogénesis.

La Figura 47 muestra el análisis de datos del Método 5.7.6. De los datos obtenidos, se graficó el *Ratio Amastigotas/tripomastigotas*, para las líneas transfectantes:

- pTREXn
- pTREXn-TcCMF46HA



Figura 47 – Ensayos de amastigogénesis de líneas transfectantes de *T. cruzi*. Se puede observar para los transfectantes pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA el viraje de estadio tripomastigota celular a amastigota para los tiempos 0, 2 horas y 4 horas. Para cada caso se realizan 4 réplicas biológicas.

Al comparar cada línea sobreexpresante con su control, se obtienen los siguientes datos:

Ratio Amastigota/Tripomastigota 2 horas (p-value: 0,41):

- 1,3 para pTREXn.
- 0,76 para pTREXn-TcCMF46HA.

Ratio Amastigota/Tripomastigota 4 horas (p-value: 0,25):

- 2,1 para pTREXn.
- 1,1 para pTREXn-TcCMF46HA.

Si bien estos datos no son estadísticamente significativos, muestran que tanto a las 2 horas como a las 4 horas de incubar los tripomastigotas a 37 °C, pTREXn-TcCMF46HA tiene una menor tasa de amastigogénesis que su control, lo que indica que la proteína TcCMF46 podría regular negativamente la capacidad de los parásitos de diferenciarse del estadio tripomastigota a amastigota en condiciones axénicas.

6.4.7. Búsqueda de interactores de TcCMF46

Para lograr identificar posibles interactores de TcCMF46 que nos permitan aproximarnos más a su posible función y a la localización subcelular de esta proteína, realizamos ensayos de "pull-down" o co-inmunoprecipitación.

Brevemente, epimastigotas de las líneas pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA fueron tratados para la obtención de extractos nativos enriquecidos en citoesqueleto. Nuevamente, se espera que la carga relativamente baja de detergente y de iones de este buffer permita que se mantengan interacciones no covalentes entre la proteína sobreexpresante TcCMF46HA y sus interactores. La Co-Inmunoprecipitación fue llevada a cabo con "beads" magnéticos conjugados a anticuerpos anti-HA, con el fin de capturar y purificar los complejos conteniendo a la proteína TcCMF46HA y sus interactores.

Los productos de Inmunoprecipitación fueron evaluados por Western blot, utilizando el anticuerpo que detecta HA, permitiéndonos identificar la proteína de fusión en el material de inmunoprecipitación.

La Figura 48 muestra el resultado obtenido del Western blot realizado:



Figura 48 – Evaluación de eficiencia de Inmunoprecipitación por Western blot. Los carriles impares contienen las muestras "Flow Through" (FT), mientras que los carriles pares contienen las muestras de las inmunoprecipitaciones (IP). Para cada transfectante, el primer par de carriles comprende el tratamiento con NP40 0,5 %, mientras que el segundo par es correspondiente al tratamiento con NP40 1%. La inmunodetección fue realizada con el anticuerpo anti-TcCMF46 (dilución 1:5800).

Como puede observarse en la Figura 48, a pesar de que a ambas concentraciones de NP-40 utilizadas, no toda la proteína logra ser inmunoprecipitada puesto que también está presente una cierta proporción en el material no unido, en particular con 1 % NP-40 se logra inmunoprecipitar una mayor cantidad de TcCMF46. Por lo tanto elegimos esta última condición para los posteriores ensayos.

Una vez evaluada la Inmunoprecipitación, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en las condiciones antes señaladas y parte de los productos fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie, donde el patrón de bandas en la línea sobreexpresante fue comparado con el de la línea control.

La Figura 49 muestra la evaluación de ambos extractos, mediante la tinción con Coomassie, donde las flechas indican las bandas diferenciales de pTREXn-TcCMF46HA con respecto a su control.



Figura 49 – Extractos de inmunoprecipitación de pTREX
n y pTREXn-TcCMF46HA teñidos con Coomassie Blue G-250. Las muestras evaluadas corresponden a las inmunoprecipitaciones de extractos obtenidos mediante el tratamiento con NP40 1 %. Las flechas indican bandas diferenciales que se encuentran en la línea sobre
expresante y no en la línea control.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa *PatternLab for Proteomics* [102], utilizando como referencia las bases de datos utilizadas de las cepas CL Brener Esmeraldo y Non Esmeraldo-like de *Trypanosoma cruzi*.

La Tabla 11 muestra el análisis de resultados curados con la lista de proteínas que fueron identificadas como presentes en el material co-inmunoprecipitado a partir de la línea sobreexpresante de TcCMF46 y ausentes en la línea control.

Protein ID	Descripción	Características a destacar
Tc00.1047053511211.170	Heat shock protein $70 (HSP70)$	Heat Shock protein
Tc00.1047053511367.360	Elongation factor 1 alpha	Localización en vacuola contráctil [118] y acidocal- cisomas [119]
Tc00.1047053506135.9	Heat shock 70 kDa protein, putative (Fragment)	Heat Shock protein
Tc00.1047053509105.140	Heat shock protein 85, putative	Heat Shock protein
Tc00.1047053505763.19	Plasma membrane ATPase (Frag- ment)/ P-type H+-ATPase, putative	Localización en vacuola contráctil [118] y acidocal- cisomas [119]
Tc00.1047053509065.60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydro- genase	GAPDH, participa en glucólisis
Tc00.1047053510099.120	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative	GAPDH, dominio de unión a NAD
Tc00.1047053506529.360	Cytochrome C oxidase subunit IV, pu- tative	Complejo IV de cadena respiratoria mitocondrial
Tc00.1047053508413.68	Kinetoplastid membrane protein KMP-11	PLC (Phosfolipase C) dominio beta, localización en vacuola contráctil [118]
Tc00.1047053511385.30	Vacuolar-type proton translocating py- rophosphatase 1, putative	Localización en vacuola contráctil [118] y acidocal- cisomas [119]
Tc00.1047053503719.20	40S ribosomal protein SA	Proteína ribosomal subunidad 40S
Tc00.1047053511391.120	Glutamamyl carboxypeptidase, pu- tative	Metalopeptidasa dependiente de Zn, citosólica
Tc00.1047053511257.10	DNAK protein, putative (Fragment), HSP70 peptide-binding domain	Heat Shock protein
Tc00.1047053506983.39	Calpain-like cysteine peptidase, pu- tative	Localización en vacuola contráctil [118] y acidocal- cisomas [119]
Tc00.1047053506945.280	Uncharacterized protein	TcCMF46

Tabla 11 – Posibles interactores de TcCMF46. Los resultados que se observan en la Tabla son producto del análisis de la Co-Inmunoprecipitación de pTREXn y pTREXn-TcCMF46 (con dos réplicas biológicas por ensayo). Las proteínas que se encuentran en la Tabla son proteínas que fueron identificadas al menos en una de las réplicas sobreexpresantes, y no se encontraron en ninguna réplica control. Los datos asociados a las proteínas se obtuvieron de la base de datos http://tritrypdb.org[82].

La presencia de TcCMF46 en ambas réplicas de la línea pTREXn-TcCMF46HA, pero no en el control, muestra que la Inmunoprecipitación fue exitosa.

De las 15 proteínas identificadas:

- 4 pertenecen a la familia multigénica Heat Shock Proteins (hp).
- 5 de ellas están descritas con localización en la vacuola contráctil y acidocalcisomas, siendo una de ellas una proteína del kinetoplasto.
- 1 es mitocondrial.
- 2 pertenecen a la proteína GAPDH, citosólica.

Las proteínas pertenecientes a la familia multigénica Heat Shock Proteins (hp) son proteínas abundantes en los ensayos de purificación por afinidad, encontrándose dentro de las familias más frecuentes dentro del "Contaminant Repository for Affinity Purification" (CRAPome) [120], por lo que no centraremos nuestro análisis en estas proteínas.

Vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1 (TcVP1)

TcVP1 es uno de los principales componentes de los acidocalcisomas, responsables en gran medida del bajo pH en los mismos, generado por el bombeo de protones [119]. También se la encuentra en el Complejo de la Vacula Contráctil, principalmente asociada al espongioma, formando unas "clavijas" de unos 15 nm [45], cuando ante la respuesta a un estrés osmótico, los acidocalcisomas se fusionan con la misma. Su presencia probablemente genere el gradiente electroquímico que permite el movimiento de iones a través de la vacuola, propiciando la osmorregulación [118].

Calpain-like cysteine peptidase

Es una cisteín-peptidasa dependiente de calcio, que participa en una variedad de procesos regulados por calcio como transducción de señales, reordenamiento del citoesqueleto, fusión de membranas, procesos regulados por condiciones ambientales y apoptosis. Este tipo de proteínas están también asociadas al citoesqueleto, principalmente en la zona de anclaje del flagelo. Se ha propuesto que su función es asegurar que el flagelo se mantenga unido a la célula a través de conexiones con el corset subpelicular de microtúbulos [121].

Elongation factor 1 alpha

El Factor de Elongación I alfa (EF-1 α), mediante unión a GTP, recluta aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma, participando así de la elongación de la proteína durante el proceso de traducción. Sin embargo, han sido descritas además numerosas funciones no canónicas para esta proteína, como unión a actina, organización del citoesqueleto, y anclaje de la maquinaria traduccional al citoesqueleto, permitiendo la localización de ciertos ARNm en zonas específicas de la célula. Estudios demuestran que esto podría ocurrir durante la respuesta a estrés, asociándose a represores de la traducción y actuando así como regulador post-traduccional [122].

Plasma membrane ATPase/ P-type H+-ATPase

Es una proteína del tipo bomba de protones, cuya acción genera un gradiente electroquímico que produce la energía requerida para llevar a cabo el transporte secundario de sustancias. Según estudios realizados por Viera et al [123], P-type H+-ATPasa no colocaliza con TcVP1, dado que la primera se encuentra principalmente en la membrana plasmática y reservosomas, mientras que la segunda pertenece a acidocalcisomas y el complejo de la vacuola contrácitl. Sin embargo, Huang, et al [119], en su análisis proteómico de acidocalcisomas sí encuentra la proteína en estos organelos.
7. Discusión

7.1. Análisis bioinformático: Búsqueda y selección de proteínas LRR in silico

Las proteínas con repetidos LRR son familias muy extendidas en toda la escala evolutiva. En *T. cruzi* es una familia muy poco explorada, con muy pocos estudios experimentales. No obstante, en muchos otros organismos, tales como *Leishmania spp* estas proteínas participan en numerosos procesos celulares importantes. De hecho, para este último parásito, se han identificado proteínas con repetidos LRR que participan activamente en el proceso de infección; tal es el caso de PPG (Proteophosphoglycan) o PSA 2 (Promastigote Surface Antigen 2) [72].

Nuestra búsqueda en las bases de datos de *T. cruzi* arrojó como resultado 63 secuencias en cuya descripción aparece la palabra LRR o la referencia "Leucine rich repeat", donde gran parte de las mismas están hasta ahora anotadas como hipotéticas, mientras que de las que han sido anotadas en su mayoría lo están por su posible relación con proteínas de función más estudiada en otros organismos. Por lo tanto hasta ahora la enorme mayoría de las proteínas LRR de este organismo son de función desconocida, lo que muestra el escaso estudio de este importante grupo de proteínas. Todo esto hace que sea necesario abordar el estudio de estas proteínas y sus posibles roles en el ciclo de vida y en el proceso infectivo del parásito.

Una vez identificadas las secuencias LRR, decidimos seleccionar aquellas que nos dieran indicios de ser factores de virulencia o estar asociados de alguna forma al proceso infectivo del parásito. Para ello tomamos como referencia un grupo particular de proteínas: las Internalinas de *Listeria monocytogenes*.

Esta bacteria grampositiva es un parásito intracelular cuyo mecanismo de invasión es similar al de T. cruzi: invade una variedad de células eucariotas y se aloja transitoriamente en una vacuola. Es sabido que las Internalinas son importantes factores de virulencia, ya que participan en procesos como la invasión y persistencia en diferentes tipos de células fagocíticas y no fagocíticas, y le permiten atravesar diversas barreras inmunológicas [68], [69], [70], [124].

Una característica a destacar que hace de las Internalinas nuestras proteínas de referencia es que son proteínas con repetidos LRR, donde el propio motivo LRR es esencial para la función de las mismas como factor de virulencia. Tal es el caso de InlA e InlB, para las cuales sus motivos LRR son la plataforma de interacción con E-Cadherina y el receptor Met, respectivamente, y donde dichas interaciones son las que activan las diversas cascadas de señalización que promueven la internalización de la bacteria en la célula hospedera [68], [69], [70], [124].

El punto de partida de nuestro estudio fue entonces la búsqueda de secuencias de $T.\ cruzi$ con homologías con las Internalinas. Los resultados obtenidos no mostraron importantes niveles de identidad de secuencia entre las secuencias LRR halladas en $T.\ cruzi$ y las Internalinas, dado que todas presentaron una identidad con estas proteínas menor al 40%. Sin embargo, dada la versatilidad de los motivos LRR, esto no necesariamente implica una baja identidad de estructura secundaria. Por otro lado, sí se encontraron secuencias que llevan repetidos LRR relacionados con los presentes en Internalinas. Este último aspecto se logró identificar tras un análisis manual de las secuencias seleccionadas. Para ello se identificaron inicialmente los repetidos presentes en cada secuencia, utilizando el predictor lresearch.com por un lado, y el predictor de estructura secundaria APSSP2 por el otro. Una vez identificados los repetidos, utilizando como referencia las secuencias consenso definidas para las diversas familias de proteínas LRR [49], [50], [51], [57], [58], se los clasificó manualmente. Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de las secuencias con identidad mayor al 30% con alguna Internalina presentan repetidos de tipo SDS22. Esto es esperable, ya que es el tipo de repetidos que presentan todas las internalinas [66], [67], [69].

De las 17 secuencias seleccionadas, 5 presentan un solo tipo de repetidos LRR. Esto dato es interesante, ya que los estudios realizados sobre las proteínas con repetidos LRR a lo largo de la escala evolutiva, indican que la mayoría de ellas contienen un solo tipo de repetido (como ejemplo los "Toll-Like Receptors" o TLRs, "NOD-Like Receptors" o NLRs, y las Internalinas A, B, C y H, entre otras). Incluso los primeros estudios estructurales señalaban que de haber proteínas que presentaran diferentes tipos de repetidos, las mismas serían una excepción, lo que llevó a la conclusión inicial de que todas las familias de proteínas LRR tienen orígenes evolutivos diferentes (ver Sección 1.3.4). Sin embargo, para el caso de *T. cruzi*, que las proteínas LRR presenten repetidos de diferentes familias, más que la excepción, parece ser la regla.

En sintonía con lo anterior, la relación evolutiva entre repetidos LRR se pone de manifiesto en 10 de las 17 proteínas, las cuales presentan dos tipos de repetidos, donde uno de ellos es del tipo SDS22, siendo el otro del tipo Típico o Bacteriano. Incluso hay 2 proteínas, TcCLB.504867.50 y TcCLB.506941.70, que presentan tres tipos de repetidos (del tipo SDS22, Bacteriano y Típico). Estos resultados están en línea con los estudios evolutivos que han demostrado la relación evolutiva entre estas tres familias de proteínas LRR [52], [54], [57].

Para finalizar con el análisis bioinformático, nuestro estudio se centró en un pequeño grupo de proteínas que vimos están mayoritariamente relacionadas con la dinámica de citoesqueleto y la señalización. Se conoce la importancia que tiene la dinámica del citoesqueleto en los procesos de invasión y persistencia de *T. cruzi* en el hospedero, así como en los procesos relacionados con la división celular. Entre los componentes del citoesqueleto, encontramos ciertas estructuras únicas en tripanosomas y organismos emparentados, especialmente componentes del flagelo, como son el PFR o "Paraflagellar Rod" o el FAZ o "Flagellum Attachment Zone", que son especialmente importantes por dos motivos; son estructuras esenciales para que procesos como la división celular o el movimiento flagelar ocurran adecuadamente, y por otro lado, el hecho de que sean estructuras propias del flagelo de estos parásitos, le brinda la oportunidad al sistema inmune del hospedero de identificar proteínas presentes en ellas como antígenos. Tal es el caso de la proteína PAR4 de *T. cruzi*, que es reconocida por linfocitos CD8+ [29].

Estos aspectos convierten a aquellas proteínas identificadas como posibles participantes de la dinámica del citoesqueleto (ya sea siendo proteínas integrales y/o moduladoras del mismo), en interesantes blancos para el diseño de estrategias antiparasitarias.

Por esta razón, nuestro trabajo se centró en profundizar el estudio sobre dos de estas proteínas; TcPP1r o Protein Phosphatase 1 regulatory subunit y TcCMF46 o Component of Motile Flagella 46; dos proteínas que no tienen datos experimentales previos mas allá de los aportados por su anotación.

7.2. Clonado y sobreexpresión de secuencias LRR

Dada la ausencia de anticuerpos específicos que permitan detectar las secuencias seleccionadas en diferentes ensayos *in vitro*, la estrategia elegida fue clonar las secuencias en vectores de expresión para proteínas fusionadas a tags y estudiar el efecto de su sobre expresión en el parásito.

El vector pDIY-eGFP presenta integrados numerosos tags que pueden expresarse fusionados a la proteína sobreexpresante, permitiendo la detección de dicha proteína al interrogar los tags en cuestión. Por otro lado, el vector pTREXn no presenta tags asociados, por lo que la generación de la secuencia sobreexpresante se realizó desde la amplificación, al incluir el tag HA al "primer Reverse" del gen. Como resultado, se obtuvo una secuencia fusionada a HA en el extremo C-ter.

Ambas estrategias presentan como ventaja la capacidad de detectar la expresión, localización e interactores de proteínas que no presentan anticuerpos específicos para su detección. Como desventaja, el o los tags asociados pueden promover la proteólisis de la proteína sobreexpresante, derivarla a otros destinos celulares o al cumplimiento de otro rol en la célula. Algo similar ocurre con la estrategia de estudiar la función y localización de proteínas mediante sobreexpresión; ya que ésta puede promover la proteólisis de la proteína, o incluso puede impedir la viabilidad de la línea transfectante, si su actividad o concentración en la célula está altamente regulada.

Como una primera aproximación al estudio funcional y caracterización de proteínas que no presentan ningún estudio experimental previo, la estrategia elegida es interesante, ya que la misma es relativamente fácil de implementar. Sin embargo, una vez que se profundiza más en los estudios de las proteínas en cuestión, y que dichos estudios sugieren que son blancos interesantes para diseño de fármacos antiparasitarios, es necesario el abordaje de nuevas estrategias, como lo es la obtención de "knockout" o la aplicación de la tecnología de CRISPR/Cas9 para una mejor aproximación [125], [126], [127]. Los resultados obtenidos a partir de este proyecto tienen a este tipo de estrategias dentro de las perspectivas a futuro para un estudio más profundo y detallado de las proteínas TcPP1r y TcCMF46, sus funciones y su rol en el ciclo de vida de *T. cruzi*.

7.3. Proteína TcPP1r: Protein Phosphatase 1 regulatory subunit

Las proteínas de la familia PPr (Protein Phosphatase regulatory) han sido bien caracterizadas en numerosos organismos. Tal es el caso de Protein Phosphatase regulatory subunit Sds22 de Schizosaccharomyces pombe; una proteína que consiste casi enteramente en repetidos LRR de 22 residuos [108]. Esta proteína es esencial para la transición metafase/anafase en S. pombe. Se ha propuesto que su presencia potencia la actividad de PP1, facilitando la defosforilación dependiente de PP1 (pero no sustituyéndola), evento que es esencial para diversos procesos en la mitosis [108]. En nuestro caso, la secuencia PP1r de T. cruzi comparte un 36 % de identidad de secuencia con la Sds22 de Schizosaccharomyces pombe. Sin embargo, nuestro análisis comparativo de estructura primaria y secundaria de ambas secuencias mostró la conservación en la mayoría de sus repetidos LRR, lo que sugiere que hay una alta identidad estructural entre TcPP1r y la proteína Sds22 de este organismo modelo.

La proteína PP1 (blanco de PP1r) pertenece al grupo de las Serine/Threonine Phosphatase (STPs). Estas proteínas son las responsables de la defosforilación de los residuos de serina y treonina del 96-99 % de las proteínas eucariotas. Este gran grupo de proteínas puede subdividirse en tres subgrupos, en función de su centro catalítico y preferencia por sustratos; PPPs (Phosphoprotein Phosphatases), PPMs (Metallo-dependent Protein Phosphatases), y Serine/Threonine Phosphatase con motivo DxDxT/V (DxDx-STPs). Por su parte la familia PPP se divide en tipo 1 (PP1), tipo 2A (PP2A) y las cercanamente relacionadas PP4 y PP6, tipo 2B (PP2B o también llamada PP3), y los subgrupos PP5 y PP7 [128]. Por lo tanto, dentro de las Serine/Threonine Phosphatase, PP1 pertenece a la familia de las PPPs (Phosphoprotein Phosphatases).

PP1 es una proteína de expresión ubicua en células eucariotas [129]. En mamíferos se ha demostrado que estas proteínas, en conjunto con kinasas, juegan un papel crucial en la regulación de eventos relacionados con la división celular, meiosis, apoptosis, síntesis proteica, metabolismo celular, reorganización del citoesqueleto y regulación de proteínas de canal y receptores de membrana. Esto ocurre porque modificaciones post-traduccionales como la fosforilación reversible de residuos de serina y treonina, constituyen importantes reguladores en eucariotas superiores, controlando un amplio rango de procesos intracelulares [129], [130], [131], [132]. En parásitos epimastigotas de *T. cruzi* fueron detectadas dos proteínas PP1-like, TcPP1 α y TcPP β , ambas homólogas a PP1 humana. Utilizando inhibidores de Serine/Threonine Protein Phosphatase, como Calyculina A, se demostró que PP1 es importante para los procesos de división celular y mantenimiento de la forma celular [104].

Las proteínas PP1 no se encuentran libres en la célula, sino que se encuentran asociadas a proteínas reguladoras bajo la forma de holoenzimas llamadas PPP1 (Phpsphoprotein phosphatase 1). En este contexto de holoenzima, PP1 adquiere el nombre de PPP1C (subunidad catalítica), mientras que TcPP1r sería una subunidad reguladora (denominada PPP1R) [112], [133], por lo que la ubicación de PP1 debería dar cuenta también de la ubicación de TcPP1r.

Para conocer si la proteína TcPP1r cumple una función similar a Sds22 en *S. pombe*, en primer lugar quisimos conocer su localización subcelular. Para eso mediante IFI comparamos la localización de los tags en la línea control y en la línea sobreexpresante.

La línea que expresa GFP fusionado a tags muestra una localización homogénea tanto citosólica como nuclear. En cambio, la línea sobreexpresante de PP1r fusionada a GFP y tags muestra una expresión más heterogénea entre los parásitos distribuyéndose principalmente en el citosol y flagelo, y quedando excluída del núcleo.

En organismos como *S. pombe* [134] o mamíferos [135], PP1 presenta una disposición mayoritariamente nuclear a lo largo del ciclo celular [136]. Sin embargo, se ha reportado también que en células de mamífero, diferentes isoformas de PP1 pueden adquirir localizaciones diferentes al núcleo en función de los blancos que poseen [137], y se conoce además que PP1 puede participar en procesos que ocurren fuera del núcleo, como el reordenamiento del citoesqueleto de actina durante la mitosis, o la traducción de proteínas [133]. Por otro lado, la interacción de PPP1C con las diferentes PPP1R permite no sólo modular la actividad de la holoenzima, sino también induce a que las pocas isoformas de PP1 que hay reportadas tengan una alta especificidad, tanto de sustrato como de compartimento [112]. Por lo tanto, la presencia de la proteína TcPP1r sobreexpresante en el citosol y el flagelo podría dar cuenta de una función reguladora de TcPP1r sobre PP1 en la modulación de procesos que ocurren fuera del núcleo, como los mencionados anteriormente. Asimismo, su sobreexpresión puede derivar a la proteína sobreexpresante a otros destinos celulares o cumplir funciones diferentes a las de la proteína endógena. Por otro lado, la fusión de tags como eGFP también podrían explicar su ausencia en el núcleo. Sin embargo, Bloecher y Tatchell [136] demostraron la localización nuclear de una proteína PP1 denominada Glc7p fusionada a GFP en *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que la presencia (al menos) de GFP, no es impedimento para la exportación de proteínas al núcleo.

En síntesis, la ausencia de la proteína sobreexpresante PP1r en el núcleo no parece deberse a un efecto de los tags asociados, pero dicha ausencia no implica que la proteína endógena no se ubique allí, ya que lo que detectamos fue la sobreexpresión de una proteína de fusión. Por otro lado, la propia sobreexpresión puede estar jugando un papel importante, ya que probablemente los eventos regulados por la holoenzima PPP1 en el núcleo son más sensibles a las concentraciones de estas enzimas, y por lo tanto su sobreexpresión no tiene efecto sobre los eventos que allí ocurren, pero sí sobre los eventos que las involucran y que ocurren por fuera del núcleo.

En un futuro, para confirmar la localización subcelular de TcPP1r, será necesaria la generación de un anticuerpo específico para la proteína endógena, o la creación de una nueva línea transfectante que nos permita confirmar la localización subcelular de la proteína en el parásito.

Nuestros estudios de Co-Inmunoprecipitación nos permitieron identificar posibles interactores de TcPP1r. Demostramos que este regulador co-inmunoprecipita con TcPP1 por lo tanto muy probablemente sea un regulador de su actividad, a través de la interacción de ambas bajo la forma de holoenzima PPP1.

Existen muy pocos estudios funcionales sobre PP1 de *T. cruzi*. Dos secuencias con homología con la subunidad catalítica de PP1 de mamíferos fueron clonadas y en parte caracterizadas. La secuencia TcPP1 β (con un 54% de identidad y un 74% de similitud con la subunidad PPP1C de mamíferos) expresada en forma recombinante mostró actividad fosfatasa hacia *Fosforilasa a* y su actividad fue inhibida por Calyculina A en extractos de epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos. Por el contrario TcPP1 α (con un 61% de identidad conservada con la subunidad PPP1C de mamíferos y un 77% de similitud) no mostró dicha actividad enzimática. El uso de Calyculina A demostró que TcPP1 es importante para los procesos de división celular y mantenimiento de la forma celular; en cultivos de epimastigotas, en presencia de este fármaco en concentraciones cercanas a su IC₅₀ (10 nM), los parásitos detienen su replicación, y se generan cambios en su morfología [104].

Tomando estos antecedentes bibliográficos y nuestros resultados que sugieren fuertemente la interacción entre TcPP1r y TcPP1, decidimos realizar estudios de viabilidad celular, para identificar el efecto inhibitorio de Calyculina A en una línea que sobreexpresa una proteína reguladora del blanco de este fármaco. Dichos ensayos mostraron que la línea sobreexpresante de TcPP1r sólo fue ligeramente más sensible a este inhibidor al compararla con la línea control. Estos resultados sugieren que TcPP1r podría actuar inhibiendo a TcPP1, disminuyendo así la capacidad replicativa de epimastigotas ante la presencia de un inhibidor de TcPP1. Esta actividad inhibitoria de TcPP1r sobre TcPP1 coincidiría así con la actividad descrita de proteínas PP1r en otros protozoarios parásitos como *Toxoplasma gondii* [130] y *Plasmodium falciparum* [132] (ver Sección 6.3.1).

Ya que se conoce que PP1 y sus proteínas reguladoras asociadas pueden regular estados de fosforilación en el núcleo controlando la entrada en mitosis. Con los resultados que indican que TcPP1r interactúa con TcPP1, y que dicha interacción sería de tipo inhibitoria, quisimos identificar si la sobreexpresión de TcPP1r en epimastigotas alteraba de alguna manera su capacidad de replicación.

Las curvas de crecimiento de la línea sobreexpresante no mostró diferencias en la capacidad replicativa con respecto a la línea control. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en la localización celular de la proteína sobreexpresante, la cual no fue encontrada en el núcleo, donde ocurren la mayor parte de los procesos reguladores del ciclo celular.

En la misma línea que el análisis de localización subcelular de la proteína sobreexpresante, la falta de efecto significativo sobre la replicación de epimastigotas puede deberse a los mismos factores enunciados en el análisis anterior; su sobreexpresión puede generar modificaciones en su distribución y con ello sus funciones en la célula (lo que lleva a que no detectemos efectos de la sobreexpresión sobre su función o funciones principales), o puede deberse a que aquellos procesos en los que TcPP1r regula la actividad de TcPP1 no incluyan los procesos relacionados directamente con el ciclo celular y la replicación.

Por su parte, los resultados de los ensayos de infección indicaron que para todos los parámetros analizados, la línea sobreexpresante de TcPP1r mostró tener una capacidad infectiva levemente menor que la línea control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por los ensayos de viabilidad con

Calyculina A, que indican que la modulación de TcPP1 sobre TcPP1 sería de tipo inhibitoria. Los datos de los ensayos de infección sugieren que la sobreexpresión de TcPP1r podría influir sutilmente en la capacidad infectiva de los parásitos, ya sea inhibiendo la capacidad de sobrevida y/o replicativa de los parásitos en el estadio amastigota o inhibiendo la capacidad infectiva en el estadio tripomastigotas.

Un resultado que puede ayudar a vislumbrar la actividad moduladora de TcPP1r sobre TcPP1 es el hallazgo de la proteína identificada como TcCLB.506203.20 en el interactoma de TcPP1r, una proteína descrita como una cadena liviana de dineína. La presencia de esta proteína en el interactoma de TcPP1r reafirma la hipótesis de una posible modulación de la dinámica del citoesqueleto, mediada por la interacción TcPP1/TcPP1r, bajo forma de PPP1 [112].

Si bien los estudios reportados acerca de la modulación de PP1 sobre la dinámica del citoesqueleto se encuentran relacionados en su mayoría con la mitosis y citocinesis (modulando el citoesqueleto de microtúbulos durante la formación del huso mitótico y del citoesqueleto de actina durante la formación del anillo contráctil de actina, sucesos que no ocurren durante la replicación de T. cruzi), se conoce que la dinámica general del citoesqueleto está estrechamente controlada por la fosforilación reversible de proteínas, proceso que claramente involucra la regulación por parte de PPP1 [133].

7.4. Proteína TcCMF46: Component of Motile Flagella 46

TcCMF46 (Component of Motile Flagella 46) es una proteína que, según su anotación, pertenecería al flagelo, estructura que participa activamente en procesos como la motilidad del parásito, la nutrición y la citocinesis (ver 1.2.6). Sin embargo, esta anotación no corresponde a estudios experimentales realizados en esta proteína, sino que deriva de estudios realizados en la proteína homóloga en *T. brucei*; TbCMF46.

En organismos "knockdown" para TbCMF46, se observan defectos en la citocinesis, que resultan en la formación de agrupamientos de células parcialmente divididas. Junto con la citocinesis defectuosa, se observan defectos a nivel de la propagación de la onda propulsora a lo largo del flagelo, llevando a una completa pérdida del movimiento de propulsión del parásito. Sin embargo, no se observan diferencias significativas a nivel morfológico en el flagelo [41]. Estos datos sugieren que TbCMF46 no sería una proteína estructural del flagelo (que participe en la formación y estructura del axonema), sino por el contrario, estaría formando parte de los complejos proteicos que participan en la motilidad del mismo (ya sea motilidad propiamente dicha, o su regulación). Sin embargo, su función en este organismo no ha sido completamente identificada.

Tanto TcCMF46 como TbCMF46 presentan cierta identidad de secuencia con DRC3 del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, una proteína perteneciente al complejo N-DRC o "Nexin-Dynein Regulatory Complex" [32], el cual está conectado con los brazos externos de dineína ("outer dynein arms" u ODAs) y regula tanto los ODAs como los brazos internos de dineína ("Inner Dynein Arms" o IDAs) dentro del axonema del flagelo. Dichos complejos (ODAs e IDAs) son importantes nexos en el axonema, dado que conecta cada doblete de microtúbulos ("Doublet MicroTubule" o DMT) con sus DMTs vecinos, a través de uniones con nexina [32], [34]. La conexión entre N-DRC, IDAs, ODAs y el "Radial Spoke" (RS) produce el doblamiento del flagelo, y con él, su desplazamiento.

Nuestro análisis comparativo de las tres secuencias proteicas mostró, como era esperable, un alto grado de identidad de secuencia entre TcCMF46 y TbCMF46 (70% de identidad de secuencia), no así entre ambas proteínas con DRC3, las cuales presentaron una identidad menor al 30%. Sin embargo, cuando se analizó la estructura secundaria de las tres proteínas, se observó que las tres comparten un alto nivel de similitud estructural, conservándose en gran medida la cantidad y ubicación de los repetidos LRR. Dicha conservación de la estructura secundaria es lo que permite inferir que (al menos en parte) la función de TcCMF46 y TbCMF46 podría estar relacionada con la de DRC3.

A diferencia del estudio de la proteína TcPP1r, la generación de un anticuerpo específico para TcCMF46 permitió no sólo la detección de la proteína sobreexpresante, sino también la detección de la proteína endógena en las líneas control (ya sea la línea Wild Type Dm28c, como la línea control pTREXn), enfoque especialmente importante en los ensayos de localización subcelular. La detección de la proteína endógena evita el sesgo que acarrea la identificación de localización por sobreexpresión y fusión de proteínas a tags. Además permite identificar si dicha sobreexpresión y/o fusión a tags le confiere a la proteína sobreexpresante nuevos destinos celulares.

Tomando en cuenta los antecedentes bibliográficos y el análisis comparativo *in silico* entre TcCMF46 y TbCMF46, nuestro primer planteo fue realizar diferentes ensayos de localización celular con el fin de identificar si, al igual que su homóloga, TcCMF46 es una proteína perteneciente al flagelo. Estos ensayos incluyeron la inmunodetección mediante Western blot de la proteína sobreexpresante en fracciones de citoesqueleto, Inmunofluorescencia Indirecta interrogando la localización de la proteína en diferentes estadios (epimastigotas, tripomastigotas celulares y amastigotas) e Inmunofluorescencia Indirecta interrogando la localización de la proteína en diferentes condiciones (inmunodetección de la proteína en diferentes condiciones (inmunodetección de la proteína mediante IFI en fantasmas de epimastigotas).

En los análisis de localización subcelular en epimastigotas de las líneas Dm28c Wild Type y pTREXn se observó que la proteína endógena colocaliza mayoritariamente con α -Tubulina, con una mayor concentración a los lados de la célula, rodeando el núcleo y el kinetoplasto, localización que puede deberse a una relación de esta proteína con el corset subpelicular de microtúbulos. Además se la puede ubicar en la región que corresponde al bolsillo flagelar, región comprendida entre el kinetoplasto y la base del flagelo. En cuanto a la localización de la proteína TcMF46 sobreexpresada y endógena en la línea sobreexpresante, se identifica el mismo patrón de localización que en las líneas control, pero con mayor concentración, especialmente en el flagelo, lo que descarta la posibilidad de que la sobreexpresión de la proteína le brinda otro destino celular, aunque parece derivarla hacia el flagelo.

Dado que en estos organismos, tanto el flagelo como el citoesqueleto en general sufren remodelaciones durante su ciclo de vida, decidimos caracterizar la localización de la proteína en diferentes estadios.

Al igual que en epimastigotas, la proteína endógena en tripomastigotas colocaliza en gran parte con α -Tubulina. Sin embargo, no es clara la relación espacial que se logra observar en epimastigotas entre la proteína y el kinetoplasto. Para el caso de la línea sobreexpresante, al igual que en epimastigotas, la localización de la proteína parece estar más concentrada en el flagelo.

No ocurre lo mismo cuando analizamos las imágenes de amastigotas, donde encontramos cambios en la disposición de TcCMF46. Para este estadio, además de verse una disposición más concentrada en la región correspondiente al bolsillo flagelar (al igual que en epimastigotas) y encontrarse también en el citoesqueleto subpelicular, a diferencia de lo observado en los estadios anteriores, parece tener cierta disposición citosólica y granular. Esto ocurre en ambas líneas, por lo que no se debe a un efecto de la sobreexpresión de la proteína. Esta última disposición puede deberse a un reordenamiento de proteínas asociadas al citoesqueleto durante la diferenciación del estadio tripomastigota a amastigota durante el ciclo infectivo, y principalmente a los cambios que ocurren en el flagelo. Es probable que haya proteínas asociadas a la estructura y regulación del flagelo sintetizadas y almacenadas en regiones del citosol, listas para ensamblarse y con ello producir rápidamente el alargamiento del flagelo cuando se gatilla la diferenciación al estadio tripomastigota celular.

El ensayo de inmunodetección por Western blot de extractos de citoesqueleto confirmaron que TcCMF46 es una proteína asociada al citoesqueleto del parásito. Se puede determinar además que dicha asociación es fuerte, manteniéndose en todas las concentraciones de Tritón X-100 utilizadas, indicando incluso que podría ser una proteína integral del citoesqueleto.

Se puede confirmar, por lo tanto, mediante estos ensayos, que la proteína TcCMF46 es una proteína con una fuerte asociación al citoesqueleto, ubicándose en el corset subpelicular de microtúbulos y en el flagelo, aunque no exclusivamente en este último como ocurre con su homóloga en *T. brucei* TbCMF46 [41]. Por otro lado, parece estar nucleada en la región del bolsillo flagelar, donde se la puede ver en mayor concentración. Si se toma como referencia la estructura celular de los epimastigotas, el bolsillo flagelar está en asociación directa con el kinetoplasto, en posición anterior al mismo y a otras estructuras como el Complejo de la Vacuola Contráctil (CVC), por lo que la asociación observada entre TcCMF46 y el kinetoplasto probablemente se deba a que la proteína se encuentra concentrada en la región del bolsillo flagelar o del Complejo de la Vacuola Contráctil.

El ensayo de análisis de curva de crecimiento de parásitos epimastigotas, realizado con las líneas sobreexpresantes de TcCMF46, mostró que no hubo diferencias significativas en las curvas de crecimiento de los transfectantes sobreexpresantes con respecto a Dm28c Wild Type, ni con respecto a las líneas control de vectores, lo que indica que TcCMF46 no estaría participando en el proceso de replicación, al menos en el estadio epimastigota.

Una posible explicación es que TcCMF46 sea una proteína estructural del citoesqueleto, en lugar de ser una proteína reguladora, como está reportado para TbCMF46 en T. brucei, la cual cumpliría funciones de regulación de los complejos de dineína en el axonema del flagelo (organismos "knockdown" para TbCMF46, muestran defectos en la citocinesis y a nivel de la propagación de la onda propulsora a lo largo del flagelo, pero no muestran cambios morfológicos en el flagelo [41]). Esta hipótesis implicaría que la función que cumple en T. cruzi es diferente a la que cumple su homóloga en T. brucei, lo que está en línea con los estudios de localización celular, que también indican una diferencia de localización entre TcCMF46 y TbCMF46 (hallándose la primera asociada al corset subpelicular de microtúbulos, al flagelo y la región donde se ubican el bolsillo flagelar y el kinetoplasto, mientras que la segunda está localizada únicamente en el flagelo [41]). Estas posibles diferencias, tanto de localización, como de funciones pueden derivar de las estrategias de supervivencia e infección que cada parásito ha adquirido luego de su separación evolutiva. Mientras que T. brucei se mantiene como un parásito extracelular durante todo su ciclo, T. cruzi se ha adaptado a la vida intracelular en gran parte de su ciclo infectivo. En cuanto al flagelo y sus funciones, por ejemplo, esta diferencia es evidente; en T. cruzi, el estadio tripomastigota no es replicativo, por lo que no se observa la importancia del flagelo a nivel de la citocinesis y morfogénesis que se evidencia en T. brucei, pero sí en el estadio epimastigota [42]. Es esperable, por lo tanto, que si bien varios componentes guardan una fuerte relación evolutiva, los diferentes caminos evolutivos tomados por estos parásitos les brinden a esos componentes funciones diferentes como producto de la adaptación a las condiciones particulares de cada uno durante su ciclo de vida. Tal parece ser el caso de TcCMF46 y TbCMF46.

Mediante los ensayos de infección realizados se pudo determinar que en todos los casos hubo un aumento en los parámetros de infección estudiados en los sobreexpresantes con respecto a sus controles respectivos, indicando entonces que las líneas sobreexpresantes de TcCMF46 son más infectivas que las líneas control; infectan mayor cantidad de células, presentan una mayor tasa de replicación dentro las células, generando mayor cantidad de amastigotas por célula. Aunque esta tendencia se observó en ambas líneas, (tanto la expresada en el vector pDIY como en el vector pTREXn), los resultados fueron estadísticamente significativos sólo en el caso de la línea sobreexpresante en pTREXn. Esto puede ser producto de las diferencias en los niveles de expresión entre ambas líneas.

Analizando más en profundidad los parámetros obtenidos por los ensayos de infección, se observa una mayor diferencia en el porcentaje de células infectadas que en el promedio de amastigotas intracelulares por célula infectada. Nuevamente, la sobreexpresión de TcCMF46 parece tener poco efecto sobre el proceso de replicación, o al menos ser menor con respecto a su efecto sobre la capacidad invasiva de tripomastigotas. Es probable, en este escenario, que su sobreexpresión facilite en alguna medida la capacidad de los tripomastigotas de invadir células, más que la capacidad de amastigotas y epimastigotas de replicarse.

La misma tendencia muestran los datos obtenidos para los ensayos de invasión, dado que la sobreexpresión de TcCMF46 le otorga a los parásitos tripomastigotas mayor capacidad de invasión. Es probable que su sobreexpresión propicie una respuesta más rápida a procesos de reorganización del citoesqueleto del parásito durante la invasión, en respuesta a señales de segundos mensajeros, como el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular en el parásito, el cual demostró ser un mecanismo importante para el proceso invasivo de *T. cruzi* [138], [139].

Retomando los resultados obtenidos con respecto al promedio de amastigotas intracelulares por célula infectada, se decidió realizar el ensayo de amastigogénesis para determinar si la sobreexpresión de TcCMF46 influye en la capacidad de los parásitos de diferenciarse del estadio tripomastigota a amastigota en condiciones axénicas. Los datos obtenidos parecen indicar que la línea sobreexpresante de TcCMF46 presenta una menor capacidad de diferenciación de la forma tripomastigota a amastigota con respecto a su control, lo que indica que la proteína TcCMF46 podría regular negativamente la capacidad de los parásitos de diferenciación del estadio tripomastigota a amastigota en condiciones axénicas. La escasa diferencia entre el número de amastigotas por célula del sobreexpresante y su control en los estudios de infección *in vitro* puede ser un efecto de disminución en la capacidad de cambio de estadio tripomastigota a amastigota dentro de la célula, lo que podría afectar el inicio de la replicación de amastigotas.

Estos datos pueden estar relacionados con los diferentes niveles de expresión entre los estadios amastigota y tripomastigotas (celular y metacíclico) identificados en estudios transcriptómicos, los cuales indican que los estadios tripomastigotas expresan entre 3 y 4 veces más ARNm de TcCMF46 que el estadio amastigota [140]. En este contexto, se puede hipotetizar que la sobreexpresión de esta proteína podría retrasar el proceso de diferenciación hacia la forma amastigota, comprometiendo la viabilidad del parásito y su capacidad replicativa dentro de la célula. Será necesario corroborar esta hipótesis con más experimentos así como también estudiar la velocidad de replicación de las formas amastigotas en ambas líneas.

El análisis del interactoma permitió identificar algunas proteínas que fueron claves para reafirmar lo ya observado en ensayos como los de localización subcelular. Dicho interactoma incluye proteínas propias de acidocalcisomas y del Complejo de la Vacuola Contráctil (CVC). Su interacción con TcCMF46 implica que esta última participaría en el tráfico vesicular entre estos dos tipos de organelos, tráfico que juega un papel crucial cuando el parásito se enfrenta a un estrés hiposmótico, mediando el mecanismo denominado RVC (Regulatory Volume Decrease: descenso regulador del volumen). Este mecanismo permite que la célula vuelva a su volumen normal luego de un incremento del mismo como resultado de un estrés hiposmótico [44]. Parte del proceso se debe a la liberación de osmolitos e iones, mientras otra parte se produce a través de la liberación de agua mediada por el Complejo de la Vacuola Contráctil y los acidocalcisomas [45].

Brevemente, en los acidocalcisomas, el P_i proveniente de la hidrólisis de poliP y de sustancias osmóticamente activas, es transferido a la vacuola contráctil, generando un gradiente favorable para el ingreso de agua a la vacuola y de allí al exterior de la célula. Para ello, en condiciones hiposmóticas, los acidocalcisomas se fusionan al espongioma y le transfieren acuaporinas (proteínas de canal que participan del transporte de agua), a través de las cuales el agua es eliminada de la célula a nivel del Complejo de la Vacuola Contráctil. La fusión de acidocalcisomas a la vacuola se produce por la activación de una ruta de señalización dependiente de AMPc y de microtúbulos [44].

Con estas referencias, al encontrar en el interactoma de TcCMF46 proteínas pertenecientes tanto a acidocalcisomas como al CVC, junto con la demostración de que TcCMF46 presenta una fuerte asociación con el citoesqueleto, se puede especular que esta proteína podría estar participando en procesos de tráfico vesicular, como es el movimiento de acidocalcisomas y su fusión con el Complejo de la Vacuola Contráctil mediada por AMPc y microtúbulos.

Dicha hipótesis se fortalece al contrastarla con los resultados de localización celular de TcCMF46, los cuales ubican a la proteína en mayor concentración en la región del bolsillo flagelar, sitio de anclaje del CVC [44]. Por lo tanto, es probable que dicha localización se deba a la participación de TcCMF46 en el tráfico vesicular asociado al Complejo de la Vacuola Contráctil y sus alrededores.

Los resultados obtenidos mediante diversos ensayos en líneas sobreexpresantes de TcCMF46 implican que la proteína estaría cumpliendo un rol en el proceso invasivo del parásito en estadio tripomastigota celular, quizás mediado por mecanismos de señalización celular. En este contexto, es probable que el mecanismo de señalización celular asociado sea el de concentración de Ca^{2+} intracelular.

Su presencia en el citoesqueleto, ya sea en el corset, como en el flagelo, así como su participación en el tráfico vesicular puede generar que la sobreexpresión de la proteína potencie este efecto de la señalización mediada por Ca^{2+} . Se conoce que dicha señalización es importante tanto para el proceso de invasión, como para la diferenciación del estadio epimastigota a tripomastigota metacíclico, o sea, promueve la diferenciación a un estadio infectivo no replicativo [138], [139]. Esta localización probablemente este directamente relacionada con la mayor capacidad de invasión de la linea sobreexpresante, ya que una mayor expresión puede producir un mayor tráfico vesicular, lo que se podría traducir en una respuesta más rápida y/o potenciada a este mecanismo de señalización celular.

La localización de TcCMF46 en el flagelo la convierte en un importante blanco de estudio. En parásitos tripanosomátidos, el flagelo permite su locomoción, además de participar en procesos esenciales como la división celular (como por ejemplo en la segregación de componentes subcelulares durante la misma), invasión de células hospederas, persistencia en el hospedero, siendo esencial durante el ciclo de vida para la patogénesis de la enfermedad y el desarrollo del parásito en el hospedero [39], [41].

Muchos componentes de las cilias y flagelos se encuentran conservados a lo largo de la escala evolutiva desde los protistas unicelulares hasta humanos. A pesar de la conservación evolutiva que se observa de estas estructuras, los parásitos tripanosomátidos presentan a nivel del flagelo una estructura más compleja que la mayoría de las estructuras flagelares eucariotas. la presencia de estructuras propias del género *Trypanosoma* como son el PFR ("Paraflagellar Rod") y el FAZ ("Fagellum Attachment Zone"); mientras la primera es una estructura reticular a modo de regla que se extiende a lo largo del axonema dentro de la membrana flagelar, la segunda es una estructura del citoesqueleto que conecta al esqueleto del flagelo con el citoesqueleto de la célula a través de la membrana tanto del flagelo como de la célula. Ambos han demostrado ser esenciales para locomoción y viabilidad de los parásitos [31], [35], [36]. Este tipo de características convierte el estudio de componentes de estructuras basadas en microtúbulos en el parásito, en un blanco al que apuntar en estrategias antiparasitarias.

Aunque hay antecedentes en T. brucei, hasta ahora no se conoce si la proteína de T. cruzi puede cumplir un papel similar en la motilidad flagelar. Ya que se conoce que la motilidad de T. cruzi es importante para completar el ciclo de vida y establecer el proceso de infección, por lo que se puede especular que cambios en la motilidad o en la velocidad de nado puedan ser responsables del fenotipo más infectivo observado con los sobreexpresantes de TcCMF46.

Para comprobar esto será necesario realizar estudios como ensayos de sedimentación y/o análisis de video-microscopía para estudios cuantitativos de las distancias de nado en las formas flageladas de T. cruzi vivas. Estos ensayos pueden permitir confirmar si esta proteína cumple un papel en el funcionamiento y movimiento flagelar.

Sin duda, el abordaje de sobreexpresión de proteínas para conocer su función tiene sus limitaciones, debido a que no siempre se obtienen fenotipos evidentes. El papel que cumple esta proteína en la estructura y función flagelar de *T. cruzi* podría dilucidarse mediante estrategias de pérdida de función, como el abordaje de "knockout" de genes mediante la metodología recientemente usada en este parásito de CRISPR/Cas9 [125], [126], [127]. Estos abordajes cobran especial importancia debido a la ausencia en este parásito de la maquinaria de ARN interferente. Será interesante en el futuro aplicar estos abordajes para avanzar en la caracterización funcional de TcCMF46, de TcPP1r y de otras proteínas con repetidos ricos en leucina cuyas funciones hasta ahora no han sido estudiadas.

8. Conclusiones

- A través del análisis bioinformático, se identificaron 63 secuencias con repetidos ricos en leucina anotadas en la base de datos de la cepa CL Brener Esmeraldo-like de *Trypanosoma cruzi*. La mayoría de estas proteínas están anotadas como hipotéticas, desconociéndose su función.
- La búsqueda de secuencias relacionadas con las internalinas de *Listeria monocytogenes* permitió seleccionar 9 proteínas de *T. cruzi* con LRRs del tipo de los presentes en las Internalinas, repetidos del tipo SDS22.
- La mayoría de las proteínas seleccionadas están anotadas o presentan dominios relacionados con funciones de reordenamiento del citoesqueleto o señalización.
- Se abordaron estudios que permitieron aproximarnos a la función de dos proteínas LRR de *T. cruzi*: la subunidad regulatoria de Proteína Fosfatasa 1 (TcPP1r) y el componente del flagelo móvil 46 (TcCMF46).
- El análisis comparativo de la estructura secundaria realizado entre TcPP1r y Sds22 de *S. pombe* mostró un alto nivel de identidad estructural entre ambas proteínas.
- La búsqueda de interactores de TcPP1r en ensayos de co-inmunoprecipitación evidenciaron que esta proteína interacciona con TcPP1, por lo que posiblemente TcPP1r actúa como un regulador de la actividad fosfatasa de TcPP1.
- Estudios de viabilidad celular utilizando Calyculina A, un fármaco inhibidor de TcPP1, mostraron una correspondencia entre la sobreexpresión de TcPP1r y un aumento en la susceptibilidad de los parásitos a dicho fármaco, indicando un posible efecto inhibitorio de TcPP1r sobre TcPP1.
- La sobreexpresión de TcPP1r como una proteína de fusión a tags en parásitos, permitió evidenciar una correlación entre el aumento de la expresión de esta proteína y una disminución de su capacidad infectiva.
- Estudios de localización en la línea sobreexpresante sugieren que TcPP1r tiene una localización citosólica y flagelar mientras que se encuentra excluída del núcleo.
- La proteína TcCMF46 presentó una alta identidad estructural con DRC3 de *Chlamydomonas*, una proteína que forma parte del complejo regulatorio nexina-dineína del axonema del flagelo, un complejo altamente conservado en organismos eucariotas, que participa en la regulación del movimiento flagelar.
- Estudios de localización realizados en este trabajo mostraron que esta proteína en epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi* se encuentra asociada al citoesqueleto, presentando una alta colocalización con α -Tubulina, mientras que en las formas amastigotas hay cambios de localización, también se encuentra en el citosol, evidenciando los reordenamientos del citoesqueleto que ocurren durante la diferenciación hacia este estadio intracelular. En epimastigotas y amastigotas se observa también una mayor concentración de esta proteína en la región asociada al bolsillo flagelar.
- Las líneas sobre expresantes mostraron una mayor concentración de proteína asociada al flagelo con respecto a sus controles, lo que indica que la sobre expresión de TcCMF46 la deriva hacia esta estructura.
- El estudio del interactoma de TcCMF46 permitió identificar varios componentes de acidocalcisomas y del Complejo de la Vacuola Contráctil, lo que sugiere que esta proteína podría tener un papel en los cambios asociados al citoesqueleto o tráfico vesicular que influyen en el funcionamiento de estos organelos.
- La sobreexpresión de TcCMF46 evidenció que el aumento de esta proteína se correlacionó con mayores índices de infección, principalmente debido a una mayor capacidad de invasión.
- Estudios de amastigogénesis *in vitro* indicaron que la línea sobreexpresante de TcCMF46 presenta una menor capacidad de diferenciación hacia la forma amastigota, lo que puede sugerir que esta proteína esté inhibiendo procesos de reordenamiento del citoesqueleto necesarios para su diferenciación.

9. Perspectivas

- Profundizar en el análisis bioinformático, abordando una búsqueda de secuencias, con el fin de identificar proteínas con motivos LRR que no estén anotadas como tales.
- Abordar estudios funcionales sobre otras proteínas LRR identificadas en este proyecto, que por su anotación, son un interesante blanco de estudio.
- Realizar estudios de actividad fosfatasa sobre la línea pDIY-TcPP1r, para confirmar si el tipo de regulación que ejerce sobre TcPP1 es de tipo inhibitoria.
- Generar un anticuerpo que detecte la proteína TcPP1r endógena, con el fin de confirmar su localización subcelular.
- Realizar ensayos de análisis de motilidad sobre las líneas sobreexpresantes de TcCMF46, para identificar si existe un efecto de TcCMF46 sobre la motilidad del flagelo de los parásitos.
- Realizar ensayos de estrés osmótico sobre las líneas sobreexpresantes de TcCMF46, para determinar si hay un efecto en la sobreexpresión de esta proteína ante la respuesta a un estrés hiposmótico.
- Generar líneas "knockout", tanto de TcPP1r como de TcCMF46, para confirmar los efectos identificados en nuestros ensayos mediante la pérdida de función.

Referencias

- R. DNDi, "Projects-2011 outlook," Flubendazole Macrofilaricide (Helminth): http://www. dndi. org/portfolio/flubendazole-macrofilaricide. html Accessed, vol. 20, 2011.
- [2] C. Chagas, "Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 1, no. 2, pp. 159–218, 1909.
- [3] A. Rassi Jr, A. Rassi, and J. A. Marin-Neto, "Chagas disease," The Lancet, vol. 375, no. 9723, pp. 1388–1402, 2010.
- [4] W. H. Organization et al., "Chagas disease in latin america: an epidemiological update based on 2010 estimates," Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire, vol. 90, no. 06, pp. 33-44, 2015.
- [5] C. D. Mathers, M. Ezzati, and A. D. Lopez, "Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework," *PLoS neglected tropical diseases*, vol. 1, no. 2, p. e114, 2007.
- [6] M. C. P. Nunes, W. Dones, C. A. Morillo, J. J. Encina, A. L. Ribeiro *et al.*, "Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 62, no. 9, pp. 767–776, 2013.
- [7] C. L. Basmadjián Y, "Enfermedad de chagas. aportes del departamento de parasitología y micología (facultad de medicina, universidad de la república) a su estudio y control." in A 100 años del descubrimiento de la Enfermedad de Chagas. Contribuciones desde Uruguay. Organización Panamericana de la Salud, 2009, vol. 1, pp. 19–27.
- [8] WHO, "Uruguay declared free of chagas' disease transmission," TDR news, vol. 56, 1998.
- [9] A. S. Larrosa, "La enfermedad de chagas en el uruguay: el primer hallazgo por rodolfo tálice."
- [10] J. Bermudez, C. Davies, A. Simonazzi, J. P. Real, and S. Palma, "Current drug therapy and pharmaceutical challenges for chagas disease," *Acta tropica*, vol. 156, pp. 1–16, 2016.
- [11] G. Punukollu, R. M. Gowda, I. A. Khan, V. S. Navarro, and B. C. Vasavada, "Clinical aspects of the chagas' heart disease," *International journal of cardiology*, vol. 115, no. 3, pp. 279–283, 2007.
- [12] A. Rassi and J. M. de Rezende, "American trypanosomiasis (chagas disease)," Infectious Disease Clinics, vol. 26, no. 2, pp. 275–291, 2012.
- [13] J. Votýpka, C. M. d'Avila Levy, P. Grellier, D. A. Maslov, J. Lukeš, and V. Yurchenko, "New approaches to systematics of trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re) description," *Trends in* parasitology, vol. 31, no. 10, pp. 460–469, 2015.
- [14] K. Tyler and D. Engman, "The life cycle of trypanosoma cruzi revisited," International journal for parasitology, vol. 31, no. 5-6, pp. 472–481, 2001.
- [15] K. Tyler, C. Olson, and D. Engman, "The life cycle of trypanosoma cruzi," in American Trypanosomiasis. Springer, 2003, pp. 1–11.
- [16] A. Mott, G. Lenormand, J. Costales, J. J. Fredberg, and B. A. Burleigh, "Modulation of host cell mechanics by trypanosoma cruzi," *Journal of cellular physiology*, vol. 218, no. 2, pp. 315–322, 2009.
- [17] F. Nagajyothi, F. S. Machado, B. A. Burleigh, L. A. Jelicks, P. E. Scherer, S. Mukherjee, M. P. Lisanti, L. M. Weiss, N. J. Garg, and H. B. Tanowitz, "Mechanisms of trypanosoma cruzi persistence in chagas disease," *Cellular microbiology*, vol. 14, no. 5, pp. 634–643, 2012.
- [18] M. C. Fernandes and N. W. Andrews, "Host cell invasion by trypanosoma cruzi: a unique strategy that promotes persistence," *FEMS microbiology reviews*, vol. 36, no. 3, pp. 734–747, 2012.
- [19] K. L. Caradonna and B. A. Burleigh, "Mechanisms of host cell invasion by trypanosoma cruzi," in Advances in parasitology. Elsevier, 2011, vol. 76, pp. 33–61.

- [20] A. M. Woolsey and B. A. Burleigh, "Host cell actin polymerization is required for cellular retention of trypanosoma cruzi and early association with endosomal/lysosomal compartments," *Cellular microbiology*, vol. 6, no. 9, pp. 829–838, 2004.
- [21] W. de Souza, T. M. U. de Carvalho, and E. S. Barrias, "Review on trypanosoma cruzi: host cell interaction," *International journal of cell biology*, vol. 2010, 2010.
- [22] M. C. Elias, J. P. da Cunha, F. P. de Faria, R. A. Mortara, E. Freymüller, and S. Schenkman, "Morphological events during the trypanosoma cruzi cell cycle," *Protist*, vol. 158, no. 2, pp. 147– 157, 2007.
- [23] K. M. Tyler and M. A. Miles, American trypanosomiasis. Springer Science & Business Media, 2002, vol. 7.
- [24] R. Hernández, A. M. Cevallos, T. Nepomuceno-Mejía, and I. López-Villaseñor, "Stationary phase in trypanosoma cruzi epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis," *Parasitology research*, vol. 111, no. 2, pp. 509–514, 2012.
- [25] D. E. Teixeira, M. Benchimol, P. H. Crepaldi, and W. de Souza, "Interactive multimedia to teach the life cycle of trypanosoma cruzi, the causative agent of chagas disease," *PLoS neglected tropical diseases*, vol. 6, no. 8, p. e1749, 2012.
- [26] W. de Souza, Structures and Organelles in Pathogenic Protists. Springer Science & Business Media, 2010, vol. 17.
- [27] T. Sherwin and K. Gull, "The cell division cycle of trypanosoma brucei brucei: timing of event markers and cytoskeletal modulations," *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, vol. 323, no. 1218, pp. 573– 588, 1989.
- [28] C. Vedrenne, C. Giroud, D. R. Robinson, S. Besteiro, C. Bosc, F. Bringaud, and T. Baltz, "Two related subpellicular cytoskeleton-associated proteins in trypanosoma brucei stabilize microtubules," *Molecular biology of the cell*, vol. 13, no. 3, pp. 1058–1070, 2002.
- [29] J. C. Vidal and W. de Souza, "Morphological and functional aspects of cytoskeleton of trypanosomatids," in *Cytoskeleton-Structure*, *Dynamics, Function and Disease*. InTech, 2017.
- [30] D. Robinson, P. Beattie, T. Sherwin, and K. Gull, "[25] microtubules, tubulin, and microtubuleassociated proteins of trypanosomes," in *Methods in enzymology*. Elsevier, 1991, vol. 196, pp. 285–299.
- [31] L. Kohl and P. Bastin, "The flagellum of trypanosomes," *International review of cytology*, vol. 244, pp. 227–285, 2005.
- [32] J. Lin, D. Tritschler, K. Song, C. F. Barber, J. S. Cobb, M. E. Porter, and D. Nicastro, "Building blocks of the nexin-dynein regulatory complex in chlamydomonas flagella," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 33, pp. 29175–29191, 2011.
- [33] G. Rupp and M. E. Porter, "A subunit of the dynein regulatory complex in chlamydomonas is a homologue of a growth arrestspecific gene product," *The Journal of cell biology*, vol. 162, no. 1, pp. 47–57, 2003.
- [34] T. Oda, H. Yanagisawa, and M. Kikkawa, "Detailed structural and biochemical characterization of the nexin-dynein regulatory complex," *Molecular biology of the cell*, vol. 26, no. 2, pp. 294–304, 2015.
- [35] K. L. Hill, "Biology and mechanism of trypanosome cell motility," *Eukaryotic Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 200–208, 2003.
- [36] P. Bastin, T. Sherwin, and K. Gull, "Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility," *Nature*, vol. 391, no. 6667, p. 548, 1998.
- [37]
- [38] J. D. Sunter and K. Gull, "The flagellum attachment zone: 'the cellular ruler' of trypanosome morphology," *Trends in parasitology*, vol. 32, no. 4, pp. 309–324, 2016.

- [39] G. Langousis and K. L. Hill, "Motility and more: the flagellum of trypanosoma brucei," Nature Reviews Microbiology, vol. 12, no. 7, p. 505, 2014.
- [40] R. Broadhead, H. R. Dawe, H. Farr, S. Griffiths, S. R. Hart, N. Portman, M. K. Shaw, M. L. Ginger, S. J. Gaskell, P. G. McKean *et al.*, "Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome," *Nature*, vol. 440, no. 7081, p. 224, 2006.
- [41] D. M. Baron, K. S. Ralston, Z. P. Kabututu, and K. L. Hill, "Functional genomics in trypanosoma brucei identifies evolutionarily conserved components of motile flagella," *Journal of cell science*, vol. 120, no. 3, pp. 478–491, 2007.
- [42] M. C. Elias, J. P. da Cunha, F. P. de Faria, R. A. Mortara, E. Freymüller, and S. Schenkman, "Morphological events during the trypanosoma cruzi cell cycle," *Protist*, vol. 158, no. 2, pp. 147– 157, 2007.
- [43] S. M. Landfear and M. Ignatushchenko, "The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids," *Molecular and biochemical parasitology*, vol. 115, no. 1, pp. 1–17, 2001.
- [44] R. Docampo, V. Jimenez, N. Lander, Z.-H. Li, and S. Niyogi, "New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists," in *International review of cell and molecular biology*. Elsevier, 2013, vol. 305, pp. 69–113.
- [45] P. Rohloff and R. Docampo, "A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in trypanosoma cruzi," *Experimental parasitology*, vol. 118, no. 1, pp. 17–24, 2008.
- [46] T. B. Clark, "Comparative morphology of four genera of trypanosomatidae," The Journal of Protozoology, vol. 6, no. 3, pp. 227–232, 1959.
- [47] W. Girard-Dias, C. L. Alcântara, N. Cunha-e Silva, W. de Souza, and K. Miranda, "On the ultrastructural organization of trypanosoma cruzi using cryopreparation methods and electron tomography," *Histochemistry and cell biology*, vol. 138, no. 6, pp. 821–831, 2012.
- [48] S. N. Moreno and R. Docampo, "The role of acidocalcisomes in parasitic protists 1," Journal of Eukaryotic Microbiology, vol. 56, no. 3, pp. 208–213, 2009.
- [49] N. Matsushima and R. Kretsinger, "Leucine rich repeats: sequences, structures, ligand—interactions, and evolution," *Saarbrücken: LAMBERT Academic Publishing*, 2016.
- [50] H. Miyashita, Y. Kuroki, and N. Matsushima, "Novel leucine rich repeat domains in proteins from unicellular eukaryotes and bacteria," *Protein and peptide letters*, vol. 21, no. 3, pp. 292–305, 2014.
- [51] B. Kobe and J. Deisenhofer, "The leucine-rich repeat: a versatile binding motif," Trends in biochemical sciences, vol. 19, no. 10, pp. 415–421, 1994.
- [52] T. Mikami, H. Miyashita, S. Takatsuka, Y. Kuroki, and N. Matsushima, "Molecular evolution of vertebrate toll-like receptors: evolutionary rate difference between their leucine-rich repeats and their tir domains," *Gene*, vol. 503, no. 2, pp. 235–243, 2012.
- [53] A. V. Kajava, "Tandem repeats in proteins: from sequence to structure," Journal of structural biology, vol. 179, no. 3, pp. 279–288, 2012.
- [54] B. Kobe and A. V. Kajava, "The leucine-rich repeat as a protein recognition motif," Current opinion in structural biology, vol. 11, no. 6, pp. 725–732, 2001.
- [55] A. Ng and R. J. Xavier, "Leucine-rich repeat (lrr) proteins: integrators of pattern recognition and signaling in immunity," *Autophagy*, vol. 7, no. 9, pp. 1082–1084, 2011.
- [56] J. Bella, K. Hindle, P. McEwan, and S. Lovell, "The leucine-rich repeat structure," Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 65, no. 15, pp. 2307–2333, 2008.
- [57] N. Matsushima, H. Miyashita, T. Mikami, and Y. Kuroki, "A nested leucine rich repeat (lrr) domain: the precursor of lrrs is a ten or eleven residue motif," *BMC microbiology*, vol. 10, no. 1, p. 235, 2010.

- [58] N. Matsushima, M. Kamiya, N. Suzuki, and T. Tanaka, "Super-motifs of leucine-rich repeats (lrrs) proteins," *Genome informatics*, vol. 11, pp. 343–345, 2000.
- [59] B. Kobe and J. Deisenhofer, "Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats," *Nature*, vol. 366, no. 6457, p. 751, 1993.
- [60] A. V. Kajava, M. Anisimova, and N. Peeters, "Origin and evolution of gala-lrr, a new member of the cc-lrr subfamily: from plants to bacteria?" *PLoS One*, vol. 3, no. 2, p. e1694, 2008.
- [61] D. V. Shevchenko, D. R. Akins, E. Robinson, M. Li, T. G. Popova, D. L. Cox, and J. D. Radolf, "Molecular characterization and cellular localization of tplrr, a processed leucine-rich repeat protein of treponema pallidum, the syphilis spirochete." *Journal of bacteriology*, vol. 179, no. 10, pp. 3188– 3195, 1997.
- [62] B. Kobe and J. Deisenhofer, "Proteins with leucine-rich repeats," Current opinion in structural biology, vol. 5, no. 3, pp. 409–416, 1995.
- [63] M. Marino, L. Braun, P. Cossart, and P. Ghosh, "Structure of the inlb leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen l. monocytogenes," *Molecular cell*, vol. 4, no. 6, pp. 1063–1072, 1999.
- [64] A. Kajava, "Structural diversity of leucine-rich repeat proteins1," 1998.
- [65] M. A. Andrade, C. P. Ponting, T. J. Gibson, and P. Bork, "Homology-based method for identification of protein repeats using statistical significance estimates," *Journal of molecular biology*, vol. 298, no. 3, pp. 521–537, 2000.
- [66] M. Bonazzi and P. Cossart, "Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery," FEBS letters, vol. 580, no. 12, pp. 2962–2967, 2006.
- [67] M. Bonazzi, M. Lecuit, and P. Cossart, "Listeria monocytogenes internalin and e-cadherin: from structure to pathogenesis," *Cellular microbiology*, vol. 11, no. 5, pp. 693–702, 2009.
- [68] —, "Listeria monocytogenes internalin and e-cadherin: from bench to bedside," Cold Spring Harbor perspectives in biology, p. a003087, 2009.
- [69] M. Bonazzi and P. Cossart, "Impenetrable barriers or entry portals? the role of cell-cell adhesion during infection," J Cell Biol, vol. 195, no. 3, pp. 349–358, 2011.
- [70] H. Bierne, C. Sabet, N. Personnic, and P. Cossart, "Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in listeria monocytogenes," *Microbes and Infection*, vol. 9, no. 10, pp. 1156–1166, 2007.
- [71] L. Kedzierski, J. Montgomery, D. Bullen, J. Curtis, E. Gardiner, A. Jimenez-Ruiz, and E. Handman, "A leucine-rich repeat motif of leishmania parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3," *The Journal of Immunology*, vol. 172, no. 8, pp. 4902–4906, 2004.
- [72] L. Kkedzierski, J. Montgomery, J. Curtis, and E. Handman, "Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions," Arch Immunol Ther Exp, vol. 52, pp. 104–112, 2004.
- [73] A. Devault and A.-L. Bañuls, "The promastigote surface antigen gene family of the leishmania parasite: differential evolution by positive selection and recombination," *BMC evolutionary biology*, vol. 8, no. 1, p. 292, 2008.
- [74] D. Horn and R. McCulloch, "Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in african trypanosomes," *Current opinion in microbiology*, vol. 13, no. 6, pp. 700–705, 2010.
- [75] V. T. Contreras, T. C. d. Araújo-Jorge, M. C. Bonaldo, N. Thomaz, H. S. Barbosa, M. d. N. S. de Meirelles, and S. Goldenberg, "Biological aspects of the dm28c clone of trypanosoma cruzi after metacylogenesis in chemically defined media," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 83, no. 1, pp. 123–133, 1988.
- [76] B. Simizu, J. S. Rhim, and N. H. Wiebenga, "Characterization of the tacaribe group of arboviruses. 1. propagation and plaque assay of tacaribe virus in a line of african green monkey kidney cells (vero)," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 125, no. 1, pp. 119–123, 1967.

- [77] W. F. Scherer, J. T. Syverton, and G. O. Gey, "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: Iv. viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 97, no. 5, pp. 695–710, 1953.
- [78] L. A. Bouvier, M. de los Milagros Cámara, G. E. Canepa, M. R. Miranda, and C. A. Pereira, "Plasmid vectors and molecular building blocks for the development of genetic manipulation tools for trypanosoma cruzi," *PloS one*, vol. 8, no. 10, p. e80217, 2013.
- [79] M. P. Vazquez and M. J. Levin, "Functional analysis of the intergenic regions of tcp2β gene loci allowed the construction of an improved trypanosoma cruzi expression vector," *Gene*, vol. 239, no. 2, pp. 217–225, 1999.
- [80] D. B. Weatherly, C. Boehlke, and R. L. Tarleton, "Chromosome level assembly of the hybrid trypanosoma cruzi genome," *BMC genomics*, vol. 10, no. 1, p. 255, 2009.
- [81] N. M. El-Sayed, P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A.-N. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin *et al.*, "The genome sequence of trypanosoma cruzi, etiologic agent of chagas disease," *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 409–415, 2005.
- [82] M. Aslett, C. Aurrecoechea, M. Berriman, J. Brestelli, B. P. Brunk, M. Carrington, D. P. Depledge, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao *et al.*, "Tritrypdb: a functional genomic resource for the trypanosomatidae," *Nucleic acids research*, vol. 38, no. suppl_1, pp. D457–D462, 2009.
- [83] R. D. Finn, T. K. Attwood, P. C. Babbitt, A. Bateman, P. Bork, A. J. Bridge, H.-Y. Chang, Z. Dosztányi, S. El-Gebali, M. Fraser *et al.*, "Interpro in 2017—beyond protein family and domain annotations," *Nucleic acids research*, vol. 45, no. D1, pp. D190–D199, 2016.
- [84] R. D. Finn, P. Coggill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, J. Mistry, A. L. Mitchell, S. C. Potter, M. Punta, M. Qureshi, A. Sangrador-Vegas *et al.*, "The pfam protein families database: towards a more sustainable future," *Nucleic acids research*, vol. 44, no. D1, pp. D279–D285, 2015.
- [85] C. J. Sigrist, E. De Castro, L. Cerutti, B. A. Cuche, N. Hulo, A. Bridge, L. Bougueleret, and I. Xenarios, "New and continuing developments at prosite," *Nucleic acids research*, vol. 41, no. D1, pp. D344–D347, 2012.
- [86] I. Letunic, T. Doerks, and P. Bork, "Smart: recent updates, new developments and status in 2015," *Nucleic acids research*, vol. 43, no. D1, pp. D257–D260, 2014.
- [87] A. Bej, B. R. Sahoo, B. Swain, M. Basu, P. Jayasankar, and M. Samanta, "Lrrsearch: An asynchronous server-based application for the prediction of leucine-rich repeat motifs and an integrative database of nod-like receptors," *Computers in biology and medicine*, vol. 53, pp. 164–170, 2014.
- [88] H. Miyashita, Y. Kuroki, and N. Matsushima, "Novel leucine rich repeat domains in proteins from unicellular eukaryotes and bacteria," *Protein and peptide letters*, vol. 21, no. 3, pp. 292–305, 2014.
- [89] B. Kobe and J. Deisenhofer, "The leucine-rich repeat: a versatile binding motif," Trends in biochemical sciences, vol. 19, no. 10, pp. 415–421, 1994.
- [90] T. Mikami, H. Miyashita, S. Takatsuka, Y. Kuroki, and N. Matsushima, "Molecular evolution of vertebrate toll-like receptors: evolutionary rate difference between their leucine-rich repeats and their tir domains," *Gene*, vol. 503, no. 2, pp. 235–243, 2012.
- [91] A. V. Kajava, "Tandem repeats in proteins: from sequence to structure," Journal of structural biology, vol. 179, no. 3, pp. 279–288, 2012.
- [92] B. Kobe and A. V. Kajava, "The leucine-rich repeat as a protein recognition motif," Current opinion in structural biology, vol. 11, no. 6, pp. 725–732, 2001.
- [93] A. Ng and R. J. Xavier, "Leucine-rich repeat (lrr) proteins: integrators of pattern recognition and signaling in immunity," Autophagy, vol. 7, no. 9, pp. 1082–1084, 2011.
- [94] H. A. Lorenzi, M. P. Vazquez, and M. J. Levin, "Integration of expression vectors into the ribosomal locus of trypanosoma cruzi," *Gene*, vol. 310, pp. 91–99, 2003.

- [95] S. Martínez-Calvillo, I. López, and R. Hernández, "pribotex expression vector: a ptex derivative for a rapid selection of trypanosoma cruzi transfectants," *Gene*, vol. 199, no. 1, pp. 71–76, 1997.
- [96] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis *et al.*, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, 1989, no. Ed. 2.
- [97] T. A. Hall *et al.*, "Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt," in *Nucleic acids symposium series*, vol. 41, no. 41. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999, pp. 95–98.
- [98] J. P. Jenuth, "The ncbi," in *Bioinformatics Methods and Protocols*. Springer, 2000, pp. 301–312.
- [99] U. Laemmli, "Sds-page laemmli method," Nature, vol. 227, pp. 680–5, 1970.
- [100] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt, "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue g-250 and r-250," *Electrophoresis*, vol. 9, no. 6, pp. 255–262, 1988.
- [101] F. De Chaumont, S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner *et al.*, "Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research," *Nature methods*, vol. 9, no. 7, p. 690, 2012.
- [102] P. C. Carvalho, J. S. Fischer, E. I. Chen, J. R. Yates, and V. C. Barbosa, "Patternlab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics," *BMC bioinformatics*, vol. 9, no. 1, p. 316, 2008.
- [103] M. Rolón, C. Vega, J. A. Escario, and A. Gómez-Barrio, "Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of trypanosoma cruzi epimastigotes," *Parasitology research*, vol. 99, no. 2, pp. 103–107, 2006.
- [104] G. A. Orr, C. Werner, J. Xu, M. Bennett, L. M. Weiss, P. Takvorkan, H. B. Tanowitz, and M. Wittner, "Identification of novel serine/threonine protein phosphatases intrypanosoma cruzi: a potential role in control of cytokinesis and morphology," *Infection and immunity*, vol. 68, no. 3, pp. 1350– 1358, 2000.
- [105] N. Matsushima, M. Kamiya, N. Suzuki, and T. Tanaka, "Super-motifs of leucine-rich repeats (lrrs) proteins," *Genome informatics*, vol. 11, pp. 343–345, 2000.
- [106] G. Raghava, "Apssp2: A combination method for protein secondary structure prediction based on neural network and example based learning," CASP5 A-132, 2002.
- [107] T. Kinoshita, "Glycosylphosphatidylinositol (gpi) anchors: Biochemistry and cell biology: Introduction to a thematic review series," *Journal of lipid research*, vol. 57, no. 1, pp. 4–5, 2016.
- [108] H. Ohkura and M. Yanagida, "S. pombe gene sds22+ essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1," *Cell*, vol. 64, no. 1, pp. 149–157, 1991.
- [109] S. Bienert, A. Waterhouse, T. A. de Beer, G. Tauriello, G. Studer, L. Bordoli, and T. Schwede, "The swiss-model repository—new features and functionality," *Nucleic acids research*, vol. 45, no. D1, pp. D313–D319, 2016.
- [110] U. Consortium, "Uniprot: the universal protein knowledgebase," Nucleic acids research, vol. 45, no. D1, pp. D158–D169, 2016.
- [111] S. Pires, W. DaRocha, J. Freitas, L. Oliveira, G. Kitten, C. Machado, S. Pena, E. Chiari, A. Macedo, and S. Teixeira, "Cell culture and animal infection with distinct trypanosoma cruzi strains expressing red and green fluorescent proteins," *International journal for parasitology*, vol. 38, no. 3-4, pp. 289–297, 2008.
- [112] L. Korrodi-Gregório, S. L. Esteves, and M. Fardilha, "Protein phosphatase 1 catalytic isoforms: specificity toward interacting proteins," *Translational Research*, vol. 164, no. 5, pp. 366–391, 2014.
- [113] L. C. Gardner, E. O'Toole, C. A. Perrone, T. Giddings, and M. E. Porter, "Components of a "dynein regulatory complex" are located at the junction between the radial spokes and the dynein arms in *Chlamydomonas* flagella." *The Journal of Cell Biology*, vol. 127, no. 5, pp. 1311–1325, 1994.

- [114] R. Hernández, A. M. Cevallos, T. Nepomuceno-Mejía, and I. López-Villaseñor, "Stationary phase in trypanosoma cruzi epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis," *Parasitology research*, vol. 111, no. 2, pp. 509–514, 2012.
- [115] K. Tyler, C. Olson, and D. Engman, "The life cycle of trypanosoma cruzi," in American Trypanosomiasis. Springer, 2003, pp. 1–11.
- [116] A. Martinez, G. Peluffo, A. A. Petruk, M. Hugo, D. Piñeyro, V. Demicheli, D. M. Moreno, A. Lima, C. Batthyány, R. Durán *et al.*, "Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of trypanosoma cruzi iron-superoxide dismutases (fe-sods) a and b disparate susceptibilities due to the repair of tyr35 radical by cys83 in fe-sodb through intramolecular electron transfer," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 18, pp. 12760–12778, 2014.
- [117] C. BORDIER, R. M. GARAVITO, and B. ARMBRUSTER, "Biochemical and structural analyses of microtubules in the pellicular membrane of leishmania tropica 1," *The Journal of protozoology*, vol. 29, no. 4, pp. 560–565, 1982.
- [118] P. N. Ulrich, V. Jimenez, M. Park, V. P. Martins, J. Atwood III, K. Moles, D. Collins, P. Rohloff, R. Tarleton, S. N. Moreno *et al.*, "Identification of contractile vacuole proteins in trypanosoma cruzi," *PLoS One*, vol. 6, no. 3, p. e18013, 2011.
- [119] G. Huang, P. N. Ulrich, M. Storey, D. Johnson, J. Tischer, J. A. Tovar, S. N. Moreno, R. Orlando, and R. Docampo, "Proteomic analysis of the acidocalcisome, an organelle conserved from bacteria to human cells," *PLoS pathogens*, vol. 10, no. 12, p. e1004555, 2014.
- [120] D. Mellacheruvu, Z. Wright, A. L. Couzens, J.-P. Lambert, N. A. St-Denis, T. Li, Y. V. Miteva, S. Hauri, M. E. Sardiu, T. Y. Low *et al.*, "The crapome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data," *Nature methods*, vol. 10, no. 8, p. 730, 2013.
- [121] M. H Branquinha, F. a Marinho, L. S Sangenito, S. SC Oliveira, K. C Goncalves, V. Ennes-Vidal, C. M d'Avila Levy, and A. LS Santos, "Calpains: potential targets for alternative chemotherapeutic intervention against human pathogenic trypanosomatids," *Current medicinal chemistry*, vol. 20, no. 25, pp. 3174–3185, 2013.
- [122] L. R. Alves, C. Oliveira, and S. Goldenberg, "Eukaryotic translation elongation factor-1 alpha is associated with a specific subset of mrnas in trypanosoma cruzi," *BMC microbiology*, vol. 15, no. 1, p. 104, 2015.
- [123] M. Vieira, P. Rohloff, S. Luo, N. L. Cunha-E-Silva, W. De Souza, and R. Docampo, "Role for a p-type h+-atpase in the acidification of the endocytic pathway of trypanosoma cruzi," *Biochemical Journal*, vol. 392, no. 3, pp. 467–474, 2005.
- [124] S. Seveau, J. Pizarro-Cerda, and P. Cossart, "Molecular mechanisms exploited by listeria monocytogenes during host cell invasion," *Microbes and infection*, vol. 9, no. 10, pp. 1167–1175, 2007.
- [125] N. Lander, M. A. Chiurillo, and R. Docampo, "Genome editing by crispr/cas9: a game change in the genetic manipulation of protists," *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 63, no. 5, pp. 679–690, 2016.
- [126] G. de Assis Burle-Caldas, V. Grazielle-Silva, L. A. Laibida, W. D. DaRocha, and S. M. R. Teixeira, "Expanding the tool box for genetic manipulation of trypanosoma cruzi," *Molecular and biochemical parasitology*, vol. 203, no. 1-2, pp. 25–33, 2015.
- [127] N. Lander, Z.-H. Li, S. Niyogi, and R. Docampo, "Crispr/cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in trypanosoma cruzi reveals their role in flagellar attachment," *MBio*, vol. 6, no. 4, pp. e01012–15, 2015.
- [128] B. Szöör, "Trypanosomatid protein phosphatases," Molecular and biochemical parasitology, vol. 173, no. 2, pp. 53–63, 2010.
- [129] Y. Shi, "Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure," Cell, vol. 139, no. 3, pp. 468–484, 2009.

- [130] W. Daher, G. Oria, S. Fauquenoy, K. Cailliau, E. Browaeys, S. Tomavo, and J. Khalife, "A toxoplasma gondii leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity," *Eukaryotic cell*, vol. 6, no. 9, pp. 1606–1617, 2007.
- [131] W. Daher, K. Cailliau, K. Takeda, C. Pierrot, N. Khayath, C. Dissous, M. Capron, M. Yanagida, E. Browaeys, and J. Khalife, "Characterization of schistosoma mansoni sds homologue, a leucinerich repeat protein that interacts with protein phosphatase type 1 and interrupts a g2/m cell-cycle checkpoint," *Biochemical Journal*, vol. 395, no. 2, pp. 433–441, 2006.
- [132] W. Daher, E. Browaeys, C. Pierrot, H. Jouin, D. Dive, E. Meurice, C. Dissous, M. Capron, S. Tomavo, C. Doerig *et al.*, "Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by pflrr1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite plasmodium falciparum," *Molecular microbiology*, vol. 60, no. 3, pp. 578–590, 2006.
- [133] H. Ceulemans and M. Bollen, "Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button," *Physiological reviews*, vol. 84, no. 1, pp. 1–39, 2004.
- [134] H. Ohkura, N. Kinoshita, S. Miyatani, T. Toda, and M. Yanagida, "The fission yeast dis2+ gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases," *Cell*, vol. 57, no. 6, pp. 997–1007, 1989.
- [135] A. Fernandez, D. L. Brautigan, and N. Lamb, "Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit." *The Journal of cell biology*, vol. 116, no. 6, pp. 1421–1430, 1992.
- [136] A. Bloecher and K. Tatchell, "Dynamic localization of protein phosphatase type 1 in the mitotic cell cycle of saccharomyces cerevisiae," *The Journal of cell biology*, vol. 149, no. 1, pp. 125–140, 2000.
- [137] P. R. Andreassen, F. B. Lacroix, E. Villa-Moruzzi, and R. L. Margolis, "Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 α , γ 1, and δ isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells," *The Journal of cell biology*, vol. 141, no. 5, pp. 1207–1215, 1998.
- [138] S. Moreno, J. Silva, A. E. Vercesi, and R. Docampo, "Cytosolic-free calcium elevation in trypanosoma cruzi is required for cell invasion." *Journal of Experimental Medicine*, vol. 180, no. 4, pp. 1535–1540, 1994.
- [139] R. Docampo and G. Huang, "Calcium signaling in trypanosomatid parasites," Cell calcium, vol. 57, no. 3, pp. 194–202, 2015.
- [140] Y. Li, S. Shah-Simpson, K. Okrah, A. T. Belew, J. Choi, K. L. Caradonna, P. Padmanabhan, D. M. Ndegwa, M. R. Temanni, H. C. Bravo *et al.*, "Transcriptome remodeling in trypanosoma cruzi and human cells during intracellular infection," *PLoS pathogens*, vol. 12, no. 4, p. e1005511, 2016.

10. Apéndices

10.1. Controles de IFI de epimastigotas

Para determinar la especificidad de la inmunode tección, se realizaron los siguientes controles en parásitos epimas tigotas:

- Dm28c Wild Type (ver Figura 32).
- pTREXn (ver Figura 33).
- pTREXn-TcCMF46HA (ver Figura 35).

La Figura 50 muestra los controles mencionados anteriormente.



(a)



(b)



(c)

Figura 50 – Control de especificidad de anticuerpos en epimastigotas. (a) Control de especificidad de inmunodetección del tag HA sobre epimastigotas Wild Type de la cepa Dm28c. (b) Control de especificidad de inmunodetección de la proteína TcCMF46 HA sobre epimastigotas pTREXn-TcCMF46HA. Para este caso, se incuba a los parásitos con el suero pre-inmune (dilución 1:870) y luego con el anticuerpo secundario anti-Rabbit conjugado a Cy3 (dilución 1:1000). (c) Control de especificidad del anticuerpo anti-Rabbit conjugado a Cy3. En este caso, se incuba a los parásitos únicamente con el anticuerpo secundario anti-Rabbit conjugado a Cy3 (dilución 1:1000).

10.2. Controles de IFI de ensayos de invasión e infección en células HeLa

La Figura 52 muestra los controles realizados sobre los siguientes ensayos in vitro

- Infecciones con pTREXn interrogados con suero pre-inmune.
- Infecciones con pTREXn interrogados con el anticuerpo secundario, sin el anticuerpo primario.
- Infecciones con pTREXn-TcCMF46HA interrogados con suero pre-inmune.
- Infecciones con pTREXn-TcCMF46HA interrogados con el anticuerpo secundario, sin el anticuerpo primario.









(c)



Figura 51 – Control de especificidad de anticuerpos en ensayos *in vitro*. (a) y (c) Control de especificidad del anticuerpo contra la proteína TcCMF46 en células infectadas con pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA, respectivamente. Se incuba a los parásitos con el suero pre-inmune (dilución 1:870) y luego con el anticuerpo secundario anti-Rabbit conjugado a Cy3 (dilución 1:1000). (b) y (d) Control de especificidad del anticuerpo secundario anti-Rabbit conjugado a Cy3 (dilución 1:1000) en células infectadas con pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA, respectivamente. En este caso, se incuba a los parásitos únicamente con el anticuerpo secundario anti-Rabbit conjugado a Alexa 546 (dilución 1:1000).



Figura 52 – Control de especificidad de anticuerpos en ensayos *in vitro*. (a) y (c) Control de especificidad del anticuerpo contra la proteína TcCMF46 en células infectadas con pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA, respectivamente. Se incuba a los parásitos con el suero pre-inmune (dilución 1:870) y luego con el anticuerpo secundario anti-Rabbit conjugado a Cy3 (dilución 1:1000). (b) y (d) Control de especificidad del anticuerpo secundario anti-Rabbit conjugado a Cy3 (dilución 1:1000) en células infectadas con pTREXn y pTREXn-TcCMF46HA, respectivamente. En este caso, se incuba a los parásitos únicamente con el anticuerpo secundario anti-Rabbit conjugado a Alexa 546 (dilución 1:1000).