



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Rol de la señalización mediada por AMPc  
en el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* y en célula  
hospedadora durante la invasión**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el área de Química Biológica

**Lic. Gabriel Ferri**

Director de tesis: Dr. Martín M. Edreira

Consejera de Estudios: Dra. Viviana Castilla

Lugar de trabajo: Instituto de Química Biológica, Departamento de Química Biológica,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN, UBA-CONICET)

Buenos Aires, 2022

*A mi familia*

## Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por brindarme todos los medios necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Martín Edreira, por abrirme las puertas de su laboratorio y ayudarme en el día a día. Gracias por los asados y las sonrisas, por el tiempo y por enseñarme que la ciencia no es solo académica, sino también humana.

A *The Company of Biologists* y *The Wellcome Trust Foundation*, por financiar mi estadía en el laboratorio del Dr. Ivan Campeotto en Leicester, Inglaterra. Al Dr. Ivan le agradezco por recibirme con la mejor onda en su laboratorio, por la confianza y por la ayuda durante mi estadía.

A mis compañeros del laboratorio de biología molecular de tripanosomátidos, a los que están y a los que se fueron, gracias. En particular a Lucía, por ser una luz que irradia todo a su alrededor.

A mis amigos, que han estado siempre a pesar de las distancias.

A mi familia, porque es el sostén de todo lo que uno hace. A mi hermano, por su apoyo incondicional, por ayudarme siempre a ser una mejor persona. A mi vieja, porque es lo más grande que hay, por querer siempre verme mejor, por estar siempre. A Santi, por que tu sonrisa siga iluminando nuestros corazones.

A Mica, por acompañarme, porque en definitiva es de lo que se trata la vida.

A todos, muchas gracias.

# Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>9</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>11</b>
<b>Introducción general .....</b>	<b>13</b>
Enfermedad de Chagas .....	13
Epidemiología y transmisión .....	15
<i>La situación en Argentina</i> .....	18
Aspectos clínicos de la enfermedad .....	18
Diagnóstico y tratamiento.....	20
El agente causal: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
Clasificación .....	23
Ciclo de vida .....	23
DTUs o Unidades Discretas de Tipificación.....	26
Aspectos destacables de la biología de <i>T. cruzi</i> .....	28
<i>Glicosomas</i> .....	28
<i>Acidocalcisomas</i> .....	29
<i>Reservosomas</i> .....	30
<i>Microtúbulos subpeliculares y bolsillo flagelar</i> .....	30
Organización genómica y expresión génica .....	32
<i>Familias multigénicas</i> .....	35
Regulación de la expresión génica.....	35
Kinetoplasto y edición del ARN .....	35
La comunicación con el entorno: señalización dependiente de AMPc .....	37
Síntesis del AMPc.....	37
Efectores del AMPc.....	38
Terminación de la señal.....	40
La vía del AMPc como blanco terapéutico .....	41
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>44</b>
Materiales.....	44

Cepas bacterianas ( <i>Escherichia coli</i> ) .....	44
Líneas celulares .....	44
<i>Células de mamífero</i> .....	44
<i>T. cruzi</i> .....	45
Anticuerpos comerciales .....	45
Primarios .....	45
Secundarios .....	46
Plásmidos .....	47
Métodos .....	51
Cultivos celulares .....	51
<i>Células de mamífero</i> .....	51
<i>T. cruzi</i> .....	51
Manipulación y análisis de ácidos nucleicos .....	52
Extracción de ADN genómico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	52
Preparación de ADN plasmídico .....	52
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	52
PCR de colonias .....	53
Electroforesis de ADN en gel de agarosa y purificación de los fragmentos de interés .....	53
Adición de dATP en el extremo 5'-terminal del ADN .....	54
Digestión con enzimas de restricción .....	54
Clonado de ORFs .....	54
Clonado por enzimas de restricción (pTREX-eGFP) .....	54
Clonado con vectores Gateway® .....	55
Clonado por "in fusion cloning" .....	55
Transfección de ADN de células de mamífero .....	57
Transfección estable de ADN en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	57
Metodología utilizada en bacterias .....	58
Preparación de bacterias termocompetentes .....	58
Transformación bacteriana .....	58
Preparación de extractos proteicos .....	59
Expresión de proteínas recombinantes en bacterias .....	59
Lisis bacteriana .....	59
Purificación de proteínas con resina glutatión-agarosa .....	59
Purificación de proteínas con resina de Ni-NTA-agarosa .....	60
Cromatografía de exclusión molecular .....	60

<i>Preparación de extractos proteicos a partir de células de mamífero</i> .....	61
<i>Preparación de extractos proteicos a partir de T. cruzi</i> .....	61
<b>Análisis de proteínas</b> .....	61
<i>Concentración de proteínas</i> .....	61
<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i> .....	61
<i>Western blot (WB)</i> .....	62
<i>Ensayo de precipitación diferencial (PDif)</i> .....	62
<i>Interacción entre proteínas CARPs</i> .....	63
<i>Rastreo de condiciones óptimas de cristalización</i> .....	63
<b>Técnicas de biología celular (T. cruzi)</b> .....	63
<i>Cuantificación de parásitos en cámara de Neubauer</i> .....	63
<i>Cuantificación de parásitos por reducción de resazurina (Rz)</i> .....	64
<b>Técnicas de biología celular (células de mamífero)</b> .....	64
<i>Ensayo de daño con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</i> .....	64
<i>Inmunofluorescencia indirecta (IFI)</i> .....	65
<i>Ensayo de invasión celular por T. cruzi</i> .....	65
<i>Ensayo de liberación de tripomastigotes</i> .....	66
<i>Ensayo de citotoxicidad por tinción con cristal violeta</i> .....	66
<i>Detección de ERK fosforilada (pERK)</i> .....	67
<i>Consideraciones estadísticas</i> .....	67
<b>Técnicas bioinformáticas</b> .....	67
<i>Búsqueda de secuencias</i> .....	67
<i>Diseño de primers</i> .....	67
<i>Sitios y bases de datos utilizadas</i> .....	68

<b>Capítulo 1: Señalización mediada por AMPc durante la invasión de la célula hospedadora</b> .....	<b>71</b>
La señalización durante la invasión .....	71
Rol del AMPc en la célula hospedadora durante la invasión por <i>T. cruzi</i> .....	72
Hipótesis y objetivos.....	76
Resultados .....	77
1. Epac como mediador de la invasión dependiente de AMPc .....	77
2. Rap1b como mediador de los eventos de señalización del AMPc .....	78
3. Rol de la fosforilación de Rap1b dependiente de PKA.....	80
4. Participación de la vía MEK/ERK durante la invasión de <i>T. cruzi</i> .....	81

5. ERK como efector río abajo de la invasión mediada por Epac .....	83
6. AMPc/Epac/Rap1b como potencial blanco terapéutico .....	83
Discusión .....	88
<b>Capítulo 2: Señalización mediada por AMPc en el ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>97</b>
La señalización del AMPc en <i>T. cruzi</i> .....	97
Hipótesis y Objetivos .....	100
Antecedentes .....	101
TcCARP1 .....	101
TcCARP2 .....	102
TcCARP3 .....	104
TcCARP4 .....	106
Resultados .....	108
1. Sobreexpresión de las proteínas CARP en <i>T. cruzi</i> .....	108
1.1. Efectos de las TcCARP1 sobre el crecimiento del parásito .....	108
1.2. Localización subcelular .....	109
1.3. Estrés oxidativo .....	112
2. Expresión y purificación de las proteínas TcCARP en bacterias .....	112
2.1. Interacción entre TcCARP .....	113
2.2. Determinar la estructura tridimensional de las proteínas CARP .....	115
Discusión .....	118
<b>Anexos .....</b>	<b>124</b>
1. Secuencias utilizadas .....	124
2. Listado de <i>primers</i> .....	127
3. Optimización de las condiciones de purificación .....	128
4. Puesta a punto del ensayo de precipitación diferencial .....	142
5. Control de citotoxicidad de las drogas/extractos utilizados .....	144
<b>Bibliografía .....</b>	<b>146</b>

# Rol de la señalización mediada por AMPc en el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* y en la célula hospedadora durante la invasión

## Resumen

La Enfermedad de Chagas, causada por el protozoario flagelar *Trypanosoma cruzi*, es considerada por el Ministerio de Salud de la Nación Argentina como uno de los principales problemas de salud pública del país. Sin embargo, no existen vacunas contra el parásito y los fármacos de primera línea, nifurtimox (Nfx) y benznidazole (Bnz), presentan alta toxicidad y baja eficiencia, especialmente en la fase crónica de la enfermedad. El desarrollo de drogas tripanocidas más eficientes requiere de la identificación de nuevos blancos moleculares, siendo un buen blanco terapéutico aquel que tenga una función exclusiva y/o esencial en la biología del parásito. En este sentido, las vías de señalización mediadas por AMP cíclico (AMPc), que demostraron ser esenciales en la biología del parásito, podrían representar potenciales blancos moleculares para el desarrollo de nuevos medicamentos en el tratamiento efectivo de la enfermedad de Chagas.

En este trabajo se estudiaron dos aspectos fundamentales de la señalización mediada por AMPc. En primer lugar, se identificaron y caracterizaron los efectores del AMPc del hospedador mamífero que participan en la invasión de *T. cruzi*, y se evaluaron como potenciales blancos terapéuticos. En segunda instancia, se estudiaron *in vivo* e *in vitro* las recientemente descubiertas proteínas de respuesta al AMPc (CARP), una familia de proteínas esenciales implicadas en la señalización de este nucleótido en el parásito.

En la primera parte se corroboró, en diferentes líneas celulares, que la activación de Epac era necesaria durante la invasión mediada por AMPc. Además, mediante experimentos de precipitación diferencial, se demostró la participación del efector activo de la vía AMPc/Epac, Rap1b-GTP. En línea con estos resultados, la invasión

celular y el número de tripomastigotes liberados luego de la invasión aumentaron significativamente en células que expresaban la mutante constitutivamente activa de Rap1b (Rap1b-G12V). Asimismo, los datos obtenidos sugieren que la fosforilación de Rap1b en la S179 tendría un efecto antagonista dependiente de PKA sobre la invasión mediada por AMPc. Con el fin de dilucidar las vías activadas río abajo de AMPc/Epac/Rap1b, se observó que durante el proceso de invasión de la célula hospedadora ocurría la activación, de manera independiente de PKC, de la vía MEK, y la consecuente inducción de la fosforilación de ERK. Al final de este capítulo, se evaluó la inhibición de la vía AMPc/Epac/Rap1b como potencial tratamiento contra la enfermedad de Chagas utilizando un extracto hidroalcohólico de *Crataegus oxyacantha* (CO-EE), una planta utilizada en medicina alternativa. Nuestros resultados sugieren que CO-EE otorga protección frente a la invasión de *T. cruzi* a través de la inhibición de la vía de señalización Epac/Rap1b. En este contexto, al utilizar CO-EE en células tratadas o no con Nfx, se observó una adición de los efectos inhibitorios de ambos tratamientos, abriendo la posibilidad de utilizar este extracto en conjunto con las drogas administradas actualmente.

En la segunda parte de este trabajo se realizó una validación funcional de CARP1 utilizando epimastigotes transgénicos que sobreexpresan esta proteína. Estos parásitos transgénicos no mostraron diferencias en el crecimiento en comparación con los parásitos de tipo salvaje, incluso en presencia de un análogo de AMPc (8-Br-AMPc). Curiosamente, presentaron una resistencia al estrés oxidativo alrededor de 2.6 veces menor respecto al control. Además, se observó que en los estadios epimastigote existe una co-localización de la proteína CARP1 con vesículas ácidas, aunque su localización mayoritaria sería citoplasmática. Por último, se logró expresar y purificar los cuatro integrantes de la familia CARP en bacterias, con el fin de realizar una futura caracterización estructural de las mismas.

**Palabras clave:** *T. cruzi*, invasión, AMPc, Epac, Rap1b, *Crataegus*, plantas medicinales, ERK, CARP.

# Role of cAMP-mediated signaling in the *Trypanosoma cruzi* life cycle and in the host cell during invasion

## Abstract

Chagas disease, caused by the flagellar protozoan *Trypanosoma cruzi*, is considered by the Argentinian Ministry of Health as one of the main public health problems in the country. However, there is no vaccine against the parasite and the first-line drugs, nifurtimox and benznidazole, present high toxicity and low efficiency, especially during the chronic phase of the disease. The development of more efficient trypanocidal drugs requires the identification of new molecular targets, being excellent therapeutic targets those with exclusive/essential functions in parasite biology. So, cyclic AMP (cAMP) signaling pathways, that shown to be essential in parasite biology, could represent key molecular targets in the development of new drugs for effective treatment against Chagas disease.

In this thesis, two fundamental aspects of cAMP-mediated signaling were studied. First, host cAMP effectors involved during the *Trypanosoma cruzi* invasion were identified, characterized, and evaluated as potential drug targets. Second, the recently discovered cAMP response proteins (CARPs), a family of essential proteins involved in cAMP signalling in the parasite, were studied in vivo and in vitro.

In the first part of this work, it was confirmed that Epac activation was necessary during the cAMP-mediated invasion in different cell lines. In addition, the participation of a key member of the cAMP/Epac pathway, Rap1b-GTP, was established by pull-down assays. In line with these results, cell invasion and trypomastigote-release significantly increased in cells expressing the constitutively active mutant form of Rap1b (G12V). Moreover, the results suggested that phosphorylation of Rap1b in the S179 would have a PKA-dependent antagonistic effect over the cAMP-mediated invasion. To elucidate activated signalling pathways

downstream cAMP/Epac/Rap1b, we observed that, during host cell invasion, PLC-independent MEK activation occurs with the consequent induction of ERK phosphorylation. At the end of this chapter, the cAMP/Epac/Rap1b pathway inhibition was evaluated as a potential treatment against Chagas disease using a hydroalcoholic extract of *Crataegus oxyacantha* (CO-EE), a plant used in alternative medicine. Our results suggested that CO-EE provides protection to *T. cruzi* invasion through the inhibition of Epac/Rap1b pathway. In this context, when CO-EE was used in cells treated or not with Nfx, an addition of the inhibitory effects of both treatments was seen, opening the possibility of testing this extract in conjunction with the drugs currently administrated.

In the second part of the work, a functional validation of CARP1 was done using transgenic epimastigotes overexpressing this protein. These transgenic parasites did not show differences in growth compared to wild-type parasites, even when treated with the cAMP analog 8-Br-cAMP. Interestingly, these parasites showed 2.6 times less resistance to oxidative stress than the control. Also, we found that there is a co-localization of CARP1 protein with acid vesicles in epimastigote stages, although the subcellular location of CARP1 is mostly cytoplasmatic. Finally, expression and purification of the four members of the CARP family in bacteria was completed in order to carry out a future structural characterization of them.

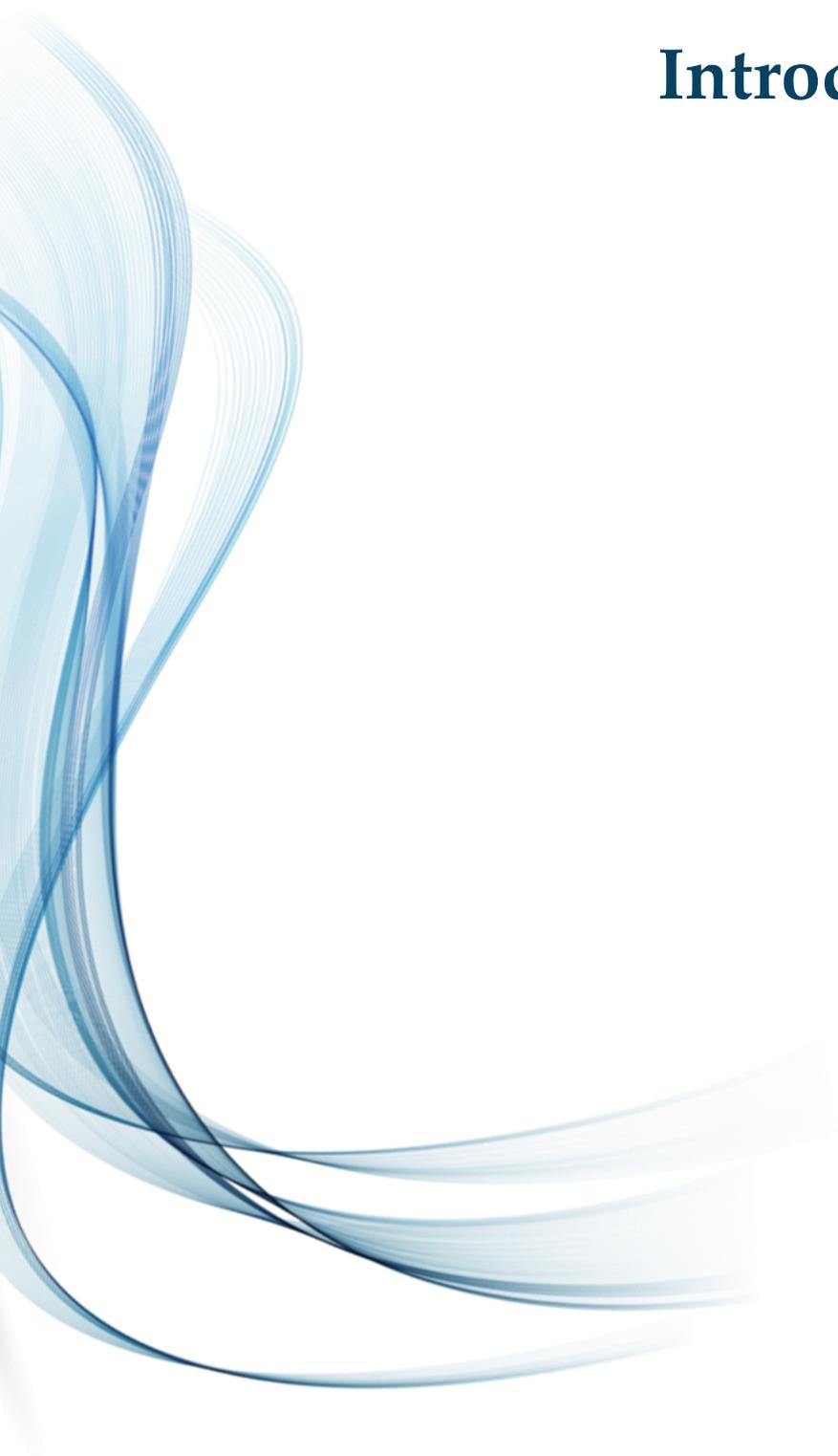
**Keywords:** *T. cruzi*, invasion, cAMP, Epac, Rap1b, *Crataegus*, medicinal plants, ERK, CARP.

## Abreviaturas

---

<b>AC:</b> adenilil ciclasa	<b>MT:</b> tripomastigote metacíclico
<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>MtQ:</b> cuarteto de microtúbulos
<b>AMPc:</b> adenosina 3', 5' monofosfato cíclico	<b>Nfx:</b> nifurtimox
<b>ARN:</b> ácido ribonucleico	<b>NTDs:</b> enfermedades tropicales desatendidas
<b>ATP:</b> adenosín trifosfato	<b>ORF:</b> marco de lectura abierto
<b>Bnz:</b> benznidazole	<b>PBS:</b> <i>buffer</i> fosfato salino
<b>BSA:</b> seroalbúmina bovina	<b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa
<b>BT:</b> tripomastigote sanguíneo	<b>PD:</b> PD98059, inhibidor de MEK1
<b>CARP:</b> proteína de respuesta al AMPc	<b>PDE:</b> fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos
<b>CBD:</b> dominio de unión al AMPc	<b>PDif:</b> precipitación diferencial
<b>CCC:</b> cardiopatía de Chagas crónico	<b>PEI:</b> polietilenimina
<b>CICs:</b> canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos	<b>PFA:</b> paraformaldehído
<b>CVC:</b> complejo vacuolar contráctil	<b>PFR:</b> filamento paraflagelar
<b>DAPI:</b> 4',6-diamidino-2-fenilindol	<b>pi:</b> post-infección
<b>DEP:</b> dominio de Epac involucrado en la asociación a la membrana plasmática	<b>PKA:</b> proteína quinasa dependiente de AMPc
<b>DMSO:</b> dimetilsulfóxido	<b>PKC:</b> proteína quinasa C
<b>dNTP:</b> 2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato	<b>PM:</b> peso molecular
<b>DO:</b> densidad óptica	<b>PMA:</b> phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>DTU:</b> unidad discreta de tipificación	<b>PMR:</b> ruptura mecánica de la membrana plasmática celular
<b>EAs:</b> amastigotes extracelulares	<b>polyPi:</b> polifosfato
<b>ECG:</b> electrocardiograma	<b>POPDCs:</b> proteínas que contienen dominios Popeye
<b>Epac:</b> proteína intercambiadora directamente activada por AMPc	<b>RyR:</b> receptores de rianodina
<b>ERK:</b> quinasa regulada por señales extracelulares	<b>Rz:</b> resazurina
<b>ERM:</b> proteínas ezrina-radixina-moesina	<b>SD:</b> desvío estándar
<b>ESI-09:</b> inhibidor específico de Epac 09	<b>SFB:</b> suero fetal bovino
<b>FAZ:</b> zona de unión del flagelo	<b>SL:</b> secuencia líder
<b>GDP:</b> guanosina difosfato	<b>TAE:</b> <i>buffer</i> acetato-EDTA
<b>GFP:</b> proteína fluorescente verde	<b>TBS:</b> <i>buffer</i> Tris salino
<b>GMPc:</b> guanosina monofosfato cíclico	<b>TcPV:</b> vacuola parasitófora
<b>GPCR:</b> proteína G acoplada a un receptor	<b>TCT:</b> tripomastigotes derivados de cultivo celular
<b>GSH:</b> glutatión	<b>Tp:</b> tripomastigote
<b>GST:</b> glutatión S transferasa	<b>TS:</b> trans-sialidasa
<b>GTP:</b> guanosina trifosfato	<b>TTBS:</b> <i>buffer</i> Tris-Tween salino
<b>His:</b> histidina	<b>UTR:</b> región no traducible
<b>IFI:</b> inmunofluorescencia indirecta	<b>WB:</b> <i>western blot</i>
<b>IPTG:</b> isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido	<b>wt:</b> genotipo salvaje

---



# Introducción general

## Introducción general

### Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una antropozoonosis potencialmente mortal causada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida principalmente por insectos triatominos hematófagos de la familia Reduviidae. Se estima que hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas, con cerca de 75 millones en riesgo de contraer la enfermedad y una incidencia anual de 30.000 nuevos casos y 10.000 muertes (WHO, 2020), aunque tanto la cantidad de personas infectadas como las muertes asociadas a esta enfermedad son imprecisas y probablemente estén subestimadas (Pinheiro et al., 2017; Echeverría et al., 2020). La enfermedad se encuentra dentro del grupo de Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs, por su sigla en inglés) ya que afecta principalmente a poblaciones de bajos recursos, es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad crónica en países tropicales en desarrollo y posee una baja asignación de capital por parte de organizaciones de investigación, ya sea gubernamentales o no gubernamentales (Bonney, 2014). Entre 2009 y 2018, la enfermedad de Chagas recibió solamente el 0.67% del total asignado a todas las NTDs (Sangenito et al., 2020), lo que constituye aproximadamente la mitad de lo recibido a nivel mundial por otras tripanosomiasis, como la leishmaniasis o la enfermedad del sueño (Echeverría et al., 2020).

A pesar de ser una zoonosis precolombina (Aufderheide et al., 2004), y que numerosos estudios muestran que el Chagas es tan antiguo como la presencia del hombre en las Américas (Ferreira et al., 2011); la enfermedad fue recién descubierta en 1909 por el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934) quien describió tanto el agente causal como el insecto vector y los aspectos clínicos de la misma, la cual bautizó como tripanosomiasis humana (Chagas, 1909). El médico brasileño capturó

vinchucas de la especie *Panstrongylus megistus* y halló en sus intestinos parásitos que más tarde denominó *Schyzotrypanum cruzi* (actualmente *T. cruzi*) en honor a su maestro Oswaldo Cruz. Con estos parásitos se inocularon monos, perros, conejos y cobayos; identificando luego el parásito sanguíneo y determinando que se trataba de una enfermedad infecciosa. Un año más tarde, al tratar a una niña con cuadro febril, adenomegalia, visceromegalia y parásitos en sangre, se definieron los aspectos clínicos de la enfermedad en seres humanos (Reyes López, 2009). En Argentina, la enfermedad fue estudiada por el Dr. Salvador Mazza (1886-1946) a partir de mediados de la década de 1920, quien describió las formas clínicas y publicó sus hallazgos a través de la “Misión de Estudios de Patología Regional Argentina” (MEPRA). Mazza fue uno de los principales divulgadores a nivel mundial de la importancia sanitaria de esta enfermedad (Zabala, 2009). En 1928, Carlos Chagas, en una carta dirigida a su par argentino, describió la situación social que circunda la enfermedad desde su origen hasta la actualidad: *Hay un designio nefasto en el estudio de la Tripanosomiasis. Cada trabajo, cada estudio, apunta un dedo hacia una población mal nutrida que vive en malas condiciones; apunta hacia un problema económico y social, que a los gobernantes les produce tremenda desazón pues es testimonio de incapacidad para resolver un problema tremendo. [...] Es un problema de vinchucas, que invaden y viven en habitaciones de mala factura, sucias, con habitantes ignorados, mal nutridos, pobres y envilecidos, sin esperanza ni horizonte social y que se resisten a colaborar. Hable de esta enfermedad y tendrá gobiernos en contra* (Reyes López, 2009). A más de cien años desde su descubrimiento, la enfermedad de Chagas sigue siendo una enfermedad asociada a zonas rurales en condiciones de pobreza, con falta de acceso a la información y a los servicios sanitarios básicos. Actualmente es una problemática compleja de salud socioambiental, en la cual convergen aspectos que van desde cuestiones biológicas (referidas al parásito, al insecto vector, y a la enfermedad en humanos), epidemiológicas (parámetros poblacionales, cambios migratorios y climáticos), socioculturales (prácticas culturales en zonas urbanas y rurales, estereotipos y prejuicios, como discriminación o estigmatización) y políticas (gestión pública, asignación de recursos y reglamentaciones sanitarias, educativas y

legislativas) (Sanmartino et al., 2015). A su vez, las condiciones socioeconómicas, independientemente del tratamiento y de la condición clínica de los pacientes analizados, son determinantes en la evolución de esta enfermedad (Viotti et al., 2009), y se estima que el 80% de las personas infectadas en el mundo no tiene acceso al diagnóstico y al tratamiento apropiado de la misma (Pinheiro et al., 2017).

## Epidemiología y transmisión

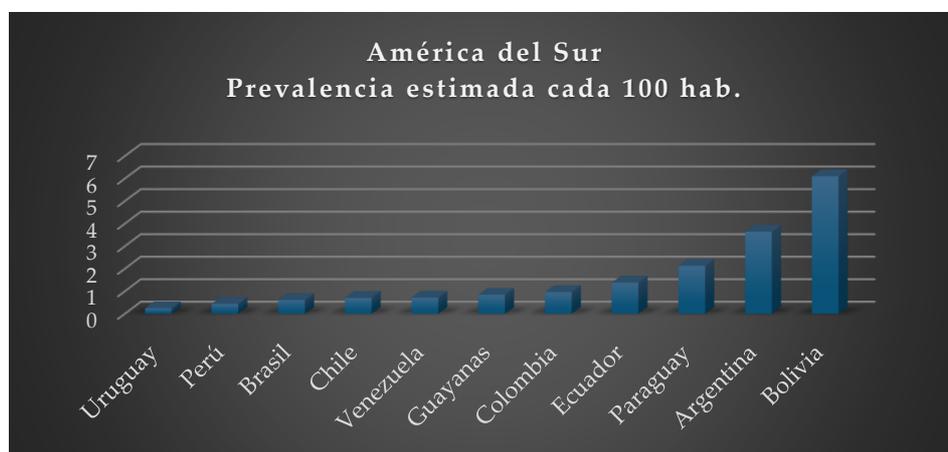
*T. cruzi* se transmite a los seres humanos y otros mamíferos por insectos vectores hemípteros de la subfamilia Triatominae (conocidos como vinchucas, chinches, chinchorros, barbeiros, y otros nombres populares) a través de la materia fecal. Los insectos triatominos pueden infectar más de 150 especies de animales mamíferos domésticos (gatos, perros, etc.) y salvajes (roedores, marsupiales, armadillos, etc.), generando ciclos biológicos superpuestos (ciclo doméstico, peridoméstico y salvaje), y haciendo muy ardua la tarea de erradicación de esta enfermedad (Rassi et al., 2010).

La enfermedad es endémica en 21 países de América Latina, desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile (Figura 1) (Pérez-Molina and Molina, 2018). Las zonas rurales son las más afectadas, donde la transmisión vectorial es la principal causa de su propagación, con una conexión directa con las condiciones sociales, culturales y económicas de la población afectada (Briceño-León and Galván, 2007).



**Figura 1.** Mapa de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas. Adaptado de Pérez-Molina y col. (2018).

Debido a que el área endémica se superpone en gran medida con la distribución de la mayoría de los insectos triatominos (Pérez-Molina and Molina, 2018), desde el año 1990 se han tomado medidas para controlar el insecto vector, logrando interrumpir la transmisión vectorial en Uruguay, Chile y gran parte de Brasil (Salvatella et al., 2014). Sin embargo, América permanece como una de las zonas más afectadas por esta enfermedad. De acuerdo con estimaciones basadas en datos del 2010; Argentina, Brasil y México son los tres países con el mayor número estimado de personas infectadas, siendo Argentina uno de los países con mayor prevalencia de casos cada 100 habitantes de la región, después de Bolivia (Figura 2) (WHO, 2015).

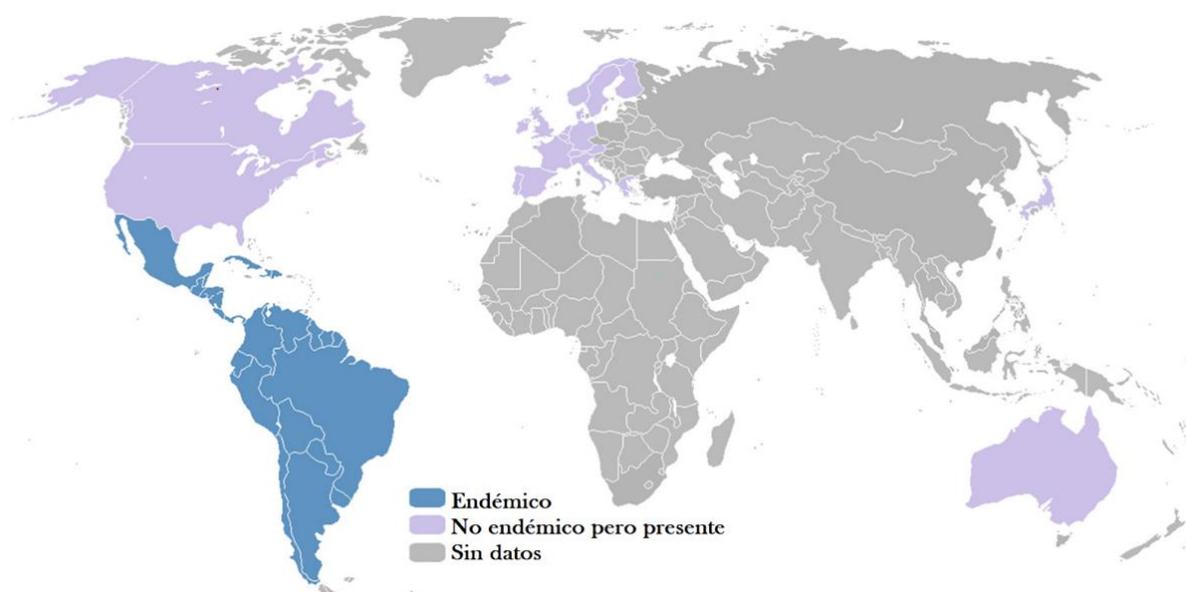


**Figura 2.** Prevalencia de la enfermedad de Chagas cada 100 habitantes.  
Fuente: datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015).

La enfermedad de Chagas se ha convertido en una problemática mundial debido principalmente a las migraciones humanas hacia zonas no endémicas, como Norteamérica (EE.UU y Canadá), Europa (mayormente España) y la región del Pacífico (Australia, Nueva Zelanda y Japón) (Figura 3) (Sangenito et al., 2020), aumentando considerablemente la prevalencia de la infección por *T. cruzi* fuera de América Latina, con un costo financiero mundial de 7,2 billones de dólares anuales (Lee et al., 2013) debido a la pérdida de aproximadamente 752.000 días hábiles (por muertes prematuras) y 1-2 millones de dólares en productividad (Conteh et al., 2010).

Sumado a esto, existen otras vías de transmisión: de la madre al hijo (transmisión congénita), por transfusión de sangre o trasplante de órganos (transmisión sanguínea), por alimentos y bebidas contaminadas (transmisión oral) o por accidentes

de laboratorio (Rassi et al., 2010). En el caso de la transmisión congénita, el riesgo de infección ocurre en promedio en el 5% y 2,7% de los embarazos en áreas endémicas y no endémicas, respectivamente (Carlier and Truyens, 2017), y constituye aproximadamente el 25% de los casos totales de la enfermedad en los países de América (PAHO, 2006). La transmisión congénita junto a la transmisión sanguínea son las principales formas de infección en zonas urbanas y en países no endémicos (Pérez-Molina and Molina, 2018). Menos frecuente, el ser humano puede infectarse por la ingesta de alimentos contaminados (Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012) o accidentes de laboratorio.



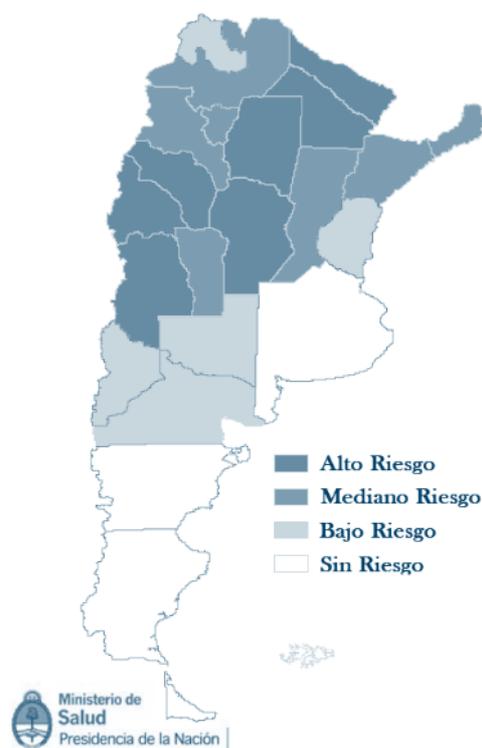
**Figura 3.** Distribución global de la enfermedad de Chagas. Se muestran los países endémicos donde la transmisión ocurre principalmente a través de la acción del insecto vector, como también los países que reciben personas infectadas de estas regiones debido al proceso migratorio. Adaptado de Sangenito y col. 2020.

A pesar de los esfuerzos realizados hasta la fecha, la Organización Mundial de la Salud (OMS), dentro de su hoja de ruta para las NTDs, estableció como meta para el año 2030 que el 37% de los países logren la interrupción de la transmisión a través de las cuatro vías principales (vectorial, transfusión, trasplante y congénita) (WHO, 2020).

### La situación en Argentina

A casi un siglo desde su descubrimiento, en el año 2007, se promulgó la ley 26.281, que declara de *interés nacional y de carácter prioritario la prevención y control de todas las formas de transmisión de la enfermedad de Chagas, hasta su definitiva erradicación de todo el territorio nacional.*

La enfermedad es endémica en Argentina, con distintos niveles de riesgo de transmisión vectorial en las diferentes provincias que componen nuestro territorio (Figura 4) (Ministerio de Salud, 2010). Se estima que 1.5 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* (WHO, 2015), y alrededor del 30-40% de esta población puede presentar diferente sintomatología (Lidani et al., 2019), frecuentemente relacionada con problemas en el corazón (Nunes et al., 2018).

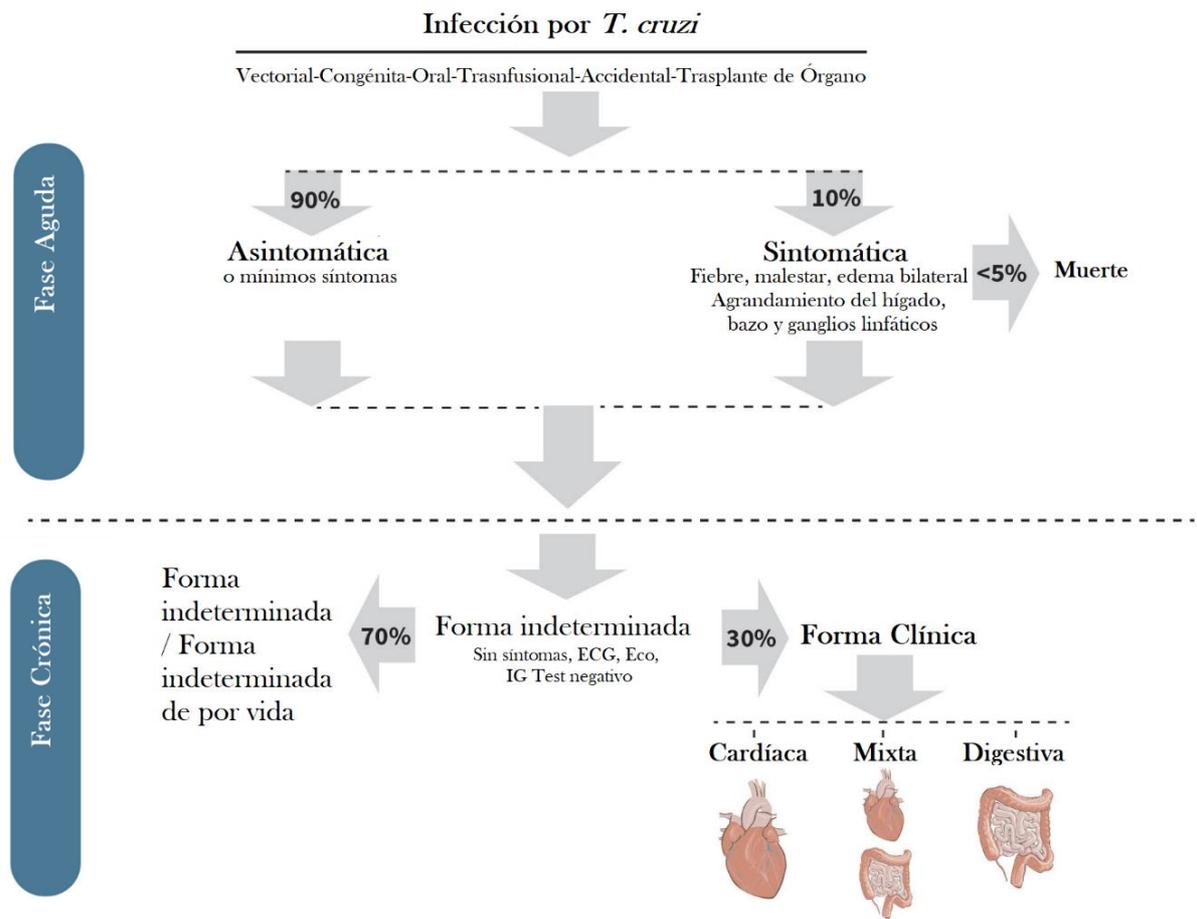


**Figura 4.** Enfoque de riesgo de transmisión vectorial de *T. cruzi*. Adaptado de Ministerio de salud (2010).

### Aspectos clínicos de la enfermedad

Una vez que el parásito entra al organismo, la infección se desarrolla en dos etapas o fases clínicas: una fase aguda y una fase crónica (Figura 5) (Echeverría et al., 2020). En la mayoría de las personas la fase aguda se cursa de manera asintomática, o bien con síntomas inespecíficos tales como fiebre, fatiga, sarpullido, anorexia, dolor de cabeza y corporal, diarrea y vómitos. En el caso de transmisión vectorial puede haber una manifestación clínica en el lugar de entrada del parásito llamada “signo de Romana” (si la entrada es a través de los ojos) o “*chagoma* de inoculación” (si la entrada es a través de la piel). Entre el 1-5% de los casos transmitidos por vectores pueden ocurrir síntomas severos que lleven a la muerte del paciente, entre los que se destacan miocarditis, hemorragia, taquicardia, arritmias, ictericia, bloqueo auriculo-ventricular

y meningoencefalitis. En el caso de transmisión congénita, aproximadamente el 10% de los recién nacidos infectados presenta hepatoesplenomegalia, insuficiencia respiratoria y bajo peso al nacer, o puede ocurrir un parto prematuro (Echeverría et al., 2020). Es importante aclarar que una mujer infectada cursando cualquier etapa de la enfermedad puede dar a luz a un bebé infectado (Carlier and Truyens, 2017).



**Figura 5.** Fases clínicas de la enfermedad de Chagas. Adaptado de Echeverría y col. (2020).

La fase aguda se caracteriza por un alto nivel de parásitos en sangre que, luego de 4-8 semanas, en el 90% de los casos, disminuye y la enfermedad entra en lo que se denomina fase crónica. Al comienzo de esta fase, en ausencia de síntomas y con la presencia de un electrocardiograma (ECG) y exámenes radiológicos (tórax, esófago y colon) normales, se dice que el paciente se encuentra en *fase crónica sin patología demostrada* (Benassi and Giunta, 2019). Aproximadamente un tercio de estos pacientes desarrollará eventualmente los síntomas típicos de la enfermedad crónica, que puede

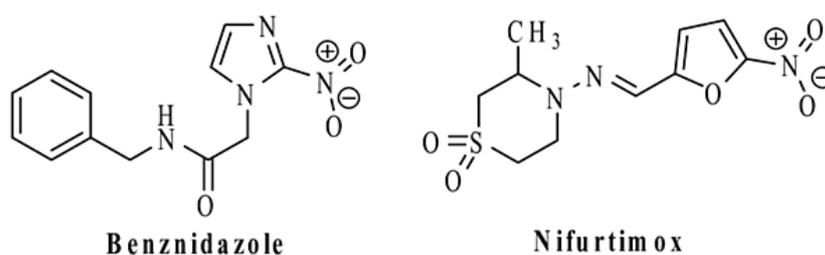
subdividirse en *fase crónica cardíaca, digestiva o mixta*, y cuyas manifestaciones clínicas dependerán del órgano afectado. La forma digestiva se desarrolla en aproximadamente 10-15% de los pacientes crónicos, y se sitúa exclusivamente al sur de la cuenca del Amazonas, y raramente en el norte de América del Sur, América central y México (Rassi et al., 2010), probablemente debido a las diferentes poblaciones de parásitos involucradas (ver “DTUs” más adelante). La forma cardíaca, también llamada cardiopatía crónica de Chagas (CCC), es la manifestación más frecuente entre los pacientes que desarrollan síntomas en esta etapa, y representa la mayoría de los casos de morbilidad y mortalidad. Los pacientes pueden sufrir muerte súbita (55-60%), síncope e insuficiencia cardíaca congestiva (25-30%), y sucesos embólicos (10-15%); resultado de una conducción eléctrica anormal, disfunción contráctil del miocardio, arritmias o tromboembolismo (Nunes et al., 2018).

### **Diagnóstico y tratamiento**

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas dependerá de la fase en la cual se encuentre la persona infectada. Durante la fase aguda, caracterizada por una alta parasitemia, se prioriza la búsqueda del parásito en circulación sanguínea mediante pruebas parasitológicas directas (frotis sanguíneo) o indirectas (por multiplicación; ej.: hemocultivo, xenodiagnóstico, PCR). En la fase crónica, en cambio, se estipula que deben realizarse al menos dos pruebas serológicas basadas en principios diferentes para poder llegar a un diagnóstico (WHO, 2020). Estas pruebas consisten en la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* (inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación, ELISA). Asimismo, otros exámenes que pueden ayudar a establecer el diagnóstico son ECGs, radiografías y hepatogramas (Lidani et al., 2019). Cuando se analiza la transmisión congénita, en recién nacidos con madres infectadas con *T. cruzi*, se necesitan al menos dos muestras de sangre (periodo perinatal y al mes de nacimiento) para rechazar el diagnóstico. En el caso de ser negativo se vuelve a realizar una prueba serológica a los diez meses de edad, cuando los anticuerpos IgG

transferidos de la madre han desaparecido (Echeverría et al., 2020). Debido a las situaciones socioeconómicas de gran parte de la población afectada, este seguimiento médico puede dificultarse, por lo que es necesario el desarrollo de pruebas más eficientes y la utilización de kits de detección rápida basados en herramientas de diagnóstico molecular (PCR), que puedan detectar la presencia del parásito directamente. Un ejemplo de ello es el “Chagas NeoKit”, una herramienta de diagnóstico molecular desarrollada por el grupo de la Dra. Carolina Carrillo, que permite detectar Chagas congénito en neonatos de una manera rápida y sencilla (ANMAT 1-47-3110-1994/17-5).

Con respecto al tratamiento, actualmente se utilizan dos drogas antiparasitarias desarrolladas en la década del 1970; el benznidazole (Bnz), un derivado del nitroimidazol, y el nifurtimox (Nfx), un derivado del nitrofurano (Figura 6) (Rodrigues Coura and de Castro, 2002; WHO, 2020).



**Figura 6.** Estructura química del benznidazole y del nifurtimox, las drogas más utilizadas contra la enfermedad de Chagas.

Se trata de compuestos nitroheterocíclicos que contienen un grupo nitro asociado a un anillo imidazol (Bnz) o furano (Nfx) y funcionan como prodrogas que se activan al ser sustrato de una enzima del parásito, la nitrorreductasa TcNTR-1. TcNTR-1 genera especies reactivas que poseen actividad tripanocida: glioxal (en el caso de Bnz) o un nitrilo insaturado de cadena abierta (en el caso de Nfx) (Francisco et al., 2020). Estas drogas son efectivas especialmente en casos agudos, congénitos, o en una reactivación de la enfermedad en pacientes inmunosuprimidos (Lidani et al., 2019). El tratamiento efectivo disminuye con el avance de la enfermedad, siendo la fase aguda la que posee

la tasa más alta de éxito (86% en menores de 14 años a 7–8% en adultos) (Pérez-Molina and Molina, 2018). Sin embargo, debido a su alta toxicidad, la larga duración del tratamiento (8 semanas) en altas dosis (300 mg) y la baja efectividad durante la fase crónica (Mansoldo et al., 2020), nuevas drogas son requeridas. Sumado a esto, Bnz y Nfx no pueden administrarse a embarazadas o personas con insuficiencia renal o hepática, mientras que el Nfx está contraindicado para personas con antecedentes de trastorno neurológico o psiquiátrico (Jackson et al., 2010). La frecuencia de los efectos adversos con Nfx es mayor al 40% y su tratamiento es discontinuado hasta en el 75% de los casos (Pérez-Molina and Molina, 2018). El Bnz generalmente es mejor tolerado y por ello es la droga de mayor uso en el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, debido al bajo consenso entre los profesionales de la salud sobre la efectividad del tratamiento con Bnz durante la fase crónica, numerosos ensayos clínicos han sido realizados para evaluar la progresión de la enfermedad en presencia del mismo. BENEFIT (“evaluación del benznidazole para interrumpir la tripanosomiasis”, por su sigla en inglés), un estudio multicéntrico, mostró que la aplicación de Bnz en pacientes crónicos con evidencia serológica de *T. cruzi* y miocardiopatía crónica no previno el desarrollo de la enfermedad cardíaca en comparación con el grupo control (placebo) (Morillo et al., 2015). Otro estudio, que evaluó la eficacia de diferentes regímenes de Bnz (BENDITA; “Nuevas dosis de benznidazole mejoraron el tratamiento y las asociaciones”, por su sigla en inglés), mostró que al aplicar la droga durante un menor tiempo (2 semanas; 300 mg Bnz) se obtuvo una eficacia mayor al 80% (sin parásitos detectables luego del tratamiento o en un seguimiento de 12 meses) y sin efectos adversos (DNDi, 2019). No obstante, la tasa de éxito depende de la fase y la duración de la enfermedad, de las pruebas de detección utilizadas, del tiempo de seguimiento del tratamiento y de las comorbilidades asociadas, como así también de la susceptibilidad de la población de *T. cruzi* a la droga utilizada. Por estos motivos es de fundamental importancia el desarrollo de nuevas drogas de mayor eficiencia y menor citotoxicidad que reemplacen las terapias existentes.

## El agente causal: *Trypanosoma cruzi*

### Clasificación

La clase Kinetoplastida, previamente conocida como orden (Levine et al., 1980), está compuesta por organismos flagelados tanto de vida libre como parásitos, que poseen una estructura subcelular de ADN mitocondrial empaquetado, fácilmente visible al microscopio, denominada kinetoplasto. Dentro de los kinetoplastidos se encuentra la familia monofilética Trypanosomatidae, que incluye una serie de patógenos humanos de importancia sanitaria, y que involucran insectos vectores hematófagos, como *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania spp.* que causan la enfermedad del sueño, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, respectivamente (Gibson, 2017). En particular, la clasificación taxonómica de *T. cruzi* se muestra a continuación (Schoch et al., 2020):

**Dominio:** Eukaryota

**Filo:** Euglenozoa

**Clase:** Kinetoplastida

**Orden:** Trypanosomatida

**Familia:** Trypanosomatidae

**Género:** Trypanosoma

**Subgénero:** Schizotrypanum

**Especie:** *T. cruzi* (Chagas, 1909)

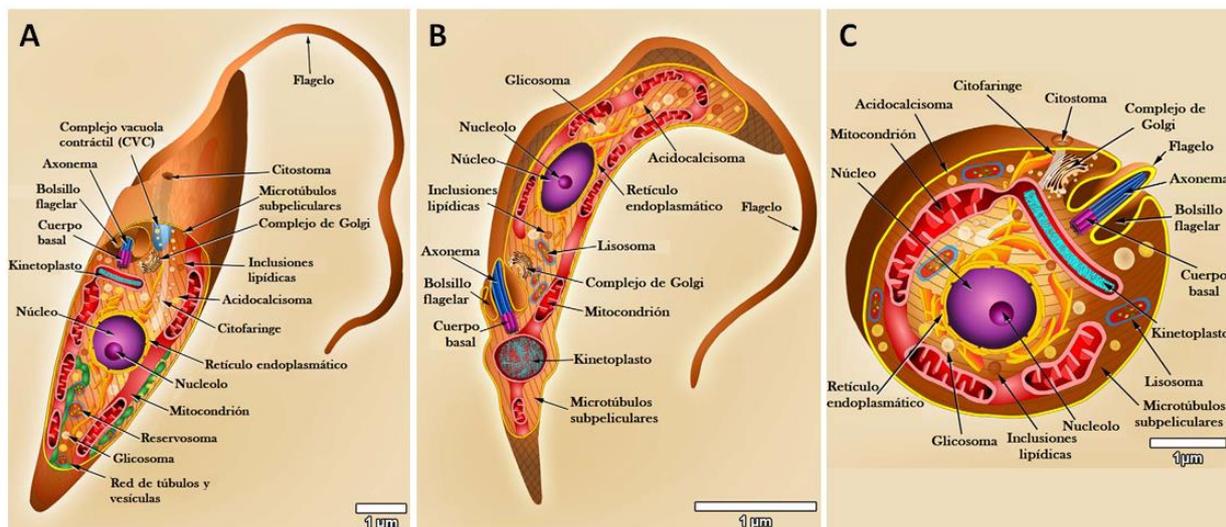
### Ciclo de vida

*T. cruzi* es un protozoo flagelado con un ciclo de vida digenético que alterna entre un hospedador vertebrado (mamífero) y uno invertebrado (insecto triatomino). Durante su paso entre los hospedadores, *T. cruzi* presenta tres estadios de desarrollo que pueden determinarse a través de características morfológicas como la posición del kinetoplasto con respecto al núcleo y la posición del bolsillo flagelar (Figura 7) (De Souza, 1984):

**Epimastigote:** forma replicativa y no infectiva que habita en el intestino medio del insecto vector. El flagelo emerge de la región lateral-anterior y forma una pseudomembrana ondulante corta (Figura 7A).

**Tripomastigote:** forma infectiva y no replicativa de *T. cruzi*. Se encuentra presente en la materia fecal del insecto vector (tripomastigote metacíclico o “MT”, por su sigla en inglés) o en el torrente sanguíneo de mamíferos infectados (tripomastigotes sanguíneos o “BT”, por su sigla en inglés). El kinetoplasto se sitúa por detrás del núcleo y el flagelo emerge del extremo apical-posterior, formando una pseudomembrana ondulante larga (Figura 7B). Es importante destacar que los MT difieren genótipicamente de los BT, aunque morfológicamente son similares.

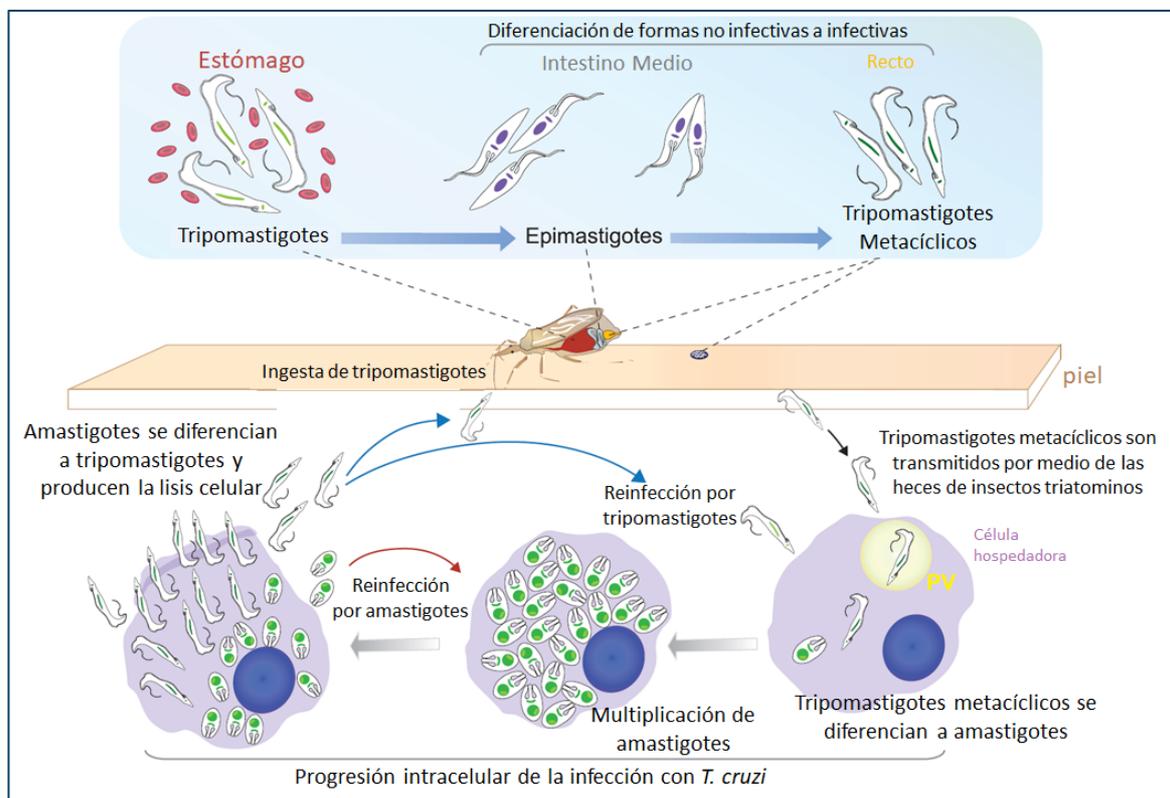
**Amastigote:** forma intracelular replicativa que puede ser infectiva. Se encuentra en el citoplasma de las células infectadas del hospedador. Son células ovaladas que no presentan un flagelo libre (Figura 7C).



**Figura 7.** Representación morfológica de los distintos estadios de *T. cruzi*: Epimastigote (A), Tripomastigote (B) y Amastigote (C). Adaptado de Teixeira y col. (2012).

En líneas generales, en el transcurso del ciclo de vida, un insecto vector se alimenta de un mamífero infectado e ingiere BTs, que se diferencian en el tubo digestivo a epimastigotes (Figura 8). Estos epimastigotes se multiplican por fisión binaria en el intestino medio del triatomino y forman un reservorio de parásitos que

posteriormente migran hacia la porción terminal del intestino, donde se adhieren y diferencian a MTs (Kollien and Schaub, 2000). Cuando el vector hematófago infectado vuelve a alimentarse libera los MTs en las heces, que ingresan al hospedador mamífero a través de heridas en la piel (producto de la picadura) o membranas mucosas, e invaden las células circundantes. La invasión involucra la activación de múltiples vías de señalización en la célula hospedadora (Ferri and Edreira, 2021) que llevan a la formación de una vacuola parasitófora (TcPV) que contiene al parásito y que se fusiona al sistema endolisosomal (Tardieux et al., 1992). Esta fusión ocasiona un descenso del pH que promueve la ruptura de la TcPV a través de varias proteínas del parásito, como la TS (Hall et al., 1992) y la porina LYT1 (Andrews et al., 1990; Manning-Cela et al., 2001). Una vez en el citoplasma, las vías metabólicas y celulares del hospedador son utilizadas por los amastigotes para poder replicarse con éxito.



**Figura 8.** Ciclo de vida de *T. cruzi*. Adaptado de Moretti y col. (2020).

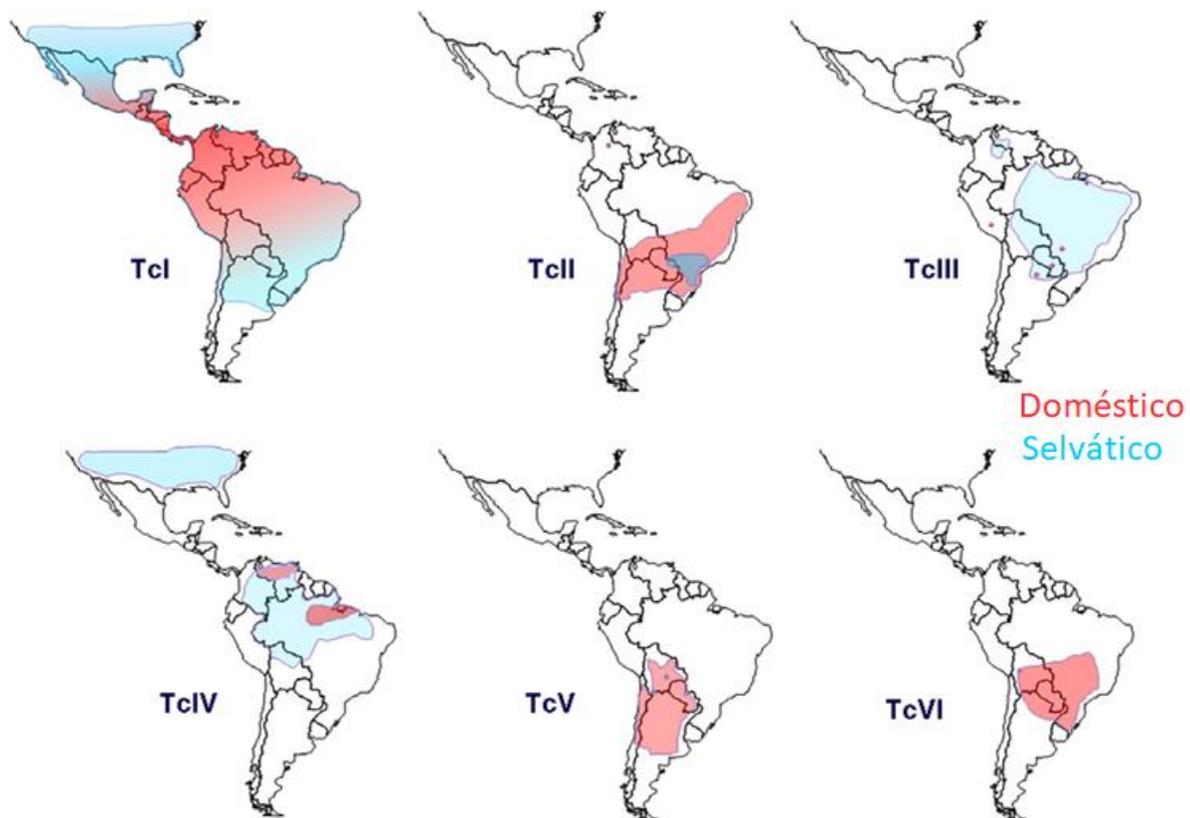
Entre cuatro y siete días después de la invasión, los amastigotes se diferencian a la forma BT, que es liberada al torrente sanguíneo mediante lisis celular. Estos tripomastigotes pueden infectar células vecinas y migrar a diferentes tejidos, o ser

ingeridas por otro insecto vector. Otra forma presente en el hospedador mamífero son los amastigotes extracelulares infectivos (EAs), que se originan a partir de la ruptura prematura de células infectadas y que pueden diseminarse a distintos tejidos (Walker et al., 2014; Bonfim-Melo et al., 2018a).

Es importante destacar que, aunque el parásito podría potencialmente infectar cualquier célula nucleada, se ha demostrado que diferentes cepas de *T. cruzi* exhiben diferente tropismo en órganos tales como esófago, hígado, bazo, intestino, corazón y músculo esquelético durante la fase aguda de la infección; mientras que el tropismo en la fase crónica es más homogéneo y restringido al intestino, músculo esquelético y corazón (Santi-Rocca et al., 2017). Durante esta fase, además, los adipocitos pueden representar un importante reservorio de parásitos a largo plazo (Combs et al., 2005).

### **DTUs o Unidades Discretas de Tipificación**

Además de un ciclo de vida complejo, *T. cruzi* es una especie extraordinariamente heterogénea que presenta múltiples cepas con un alto grado de variabilidad genética y biológica, y que han sido relacionadas con la distribución geográfica, las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento. En efecto, el tamaño del genoma puede variar hasta 48% entre especies (Zingales, 2018). Esta inmensa diversidad genética ha sido clasificada en seis Unidades Discretas de Tipificación (DTUs): TcI a TcVI (B Zingales et al., 2009). Una DTU se refiere a un conjunto de cepas que pueden ser caracterizadas por marcadores moleculares específicos, y que son genéticamente más similares entre sí que con otro conjunto de cepas (Tibayrenc, 1998). A pesar de que nuevos estudios propusieron otra clasificación (Barnabé et al., 2016), o la inclusión de TcBat como la séptima DTU (Lima et al., 2015), la clasificación de las “seis DTUs” se mantiene actualmente como la más aceptada. Dentro de este marco, estudios eco-epidemiológicos mostraron a cada DTU asociada a una distribución geográfica particular (Figura 9) (Zingales et al., 2012).



**Figura 9.** Distribución geográfica aproximada de las distintas DTUs de *T. cruzi* en los ciclos de transmisión doméstico y selvático. Adaptado de Zingales y col. (2012).

TcI es la DTU más abundante y está asociada a los ciclos de transmisión selvático y doméstico. Se encuentra en todo el rango de distribución del insecto vector, pero la infección humana se concentra en el norte de América del Sur y América Central y está vinculada con la CCC. TcII se encuentra en las regiones del sur y centro de América del Sur y está vinculada a manifestaciones cardíacas y digestivas (megaesófago y megacolon). Las infecciones humanas con TcIII son raras, y esta DTU se asocia principalmente al ciclo selvático en Brasil y países vecinos. Por otra parte, el patrón de distribución de TcIV es similar al de TcIII, pero TcIV se encuentra frecuentemente en humanos y es una de las causas más importantes de la enfermedad de Chagas en Venezuela. TcV y TcVI, dos DTU híbridas similares, se distribuyen por el sur y centro de América del Sur (Zingales et al., 2012).

## Aspectos destacables de la biología de *T. cruzi*

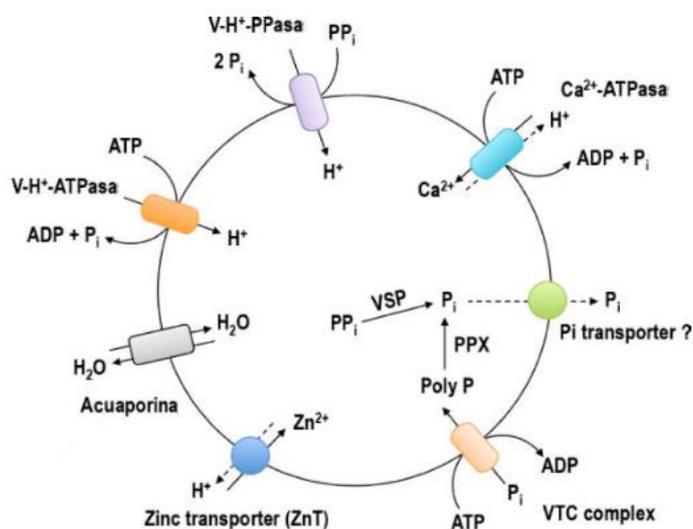
En términos evolutivos, los tripanosomátidos se separaron muy temprano del resto de los organismos del árbol eucariota. Esta larga evolución independiente junto a la selección constante que ocurre dentro de cada hospedador resultó en el desarrollo de una gran variedad de características exclusivas de este grupo, que resultan muy importantes al momento de buscar nuevos blancos moleculares contra los cuales desarrollar drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. A continuación, se muestra una breve descripción general de las características más llamativas que presentan estos parásitos.

### Glicosomas

Los glicosomas son organelas pequeñas (alrededor de  $0.27 \mu\text{m}$ ), fuertemente relacionadas con los peroxisomas, que se encuentran en el citoplasma de los tripanosomátidos y es el lugar en donde se inicia la glucólisis y otros procesos metabólicos (Figura 7). Estudios bioquímicos y análisis proteómicos realizados en glicosomas de *T. cruzi* mostraron que dentro de estas organelas se localizan la mayoría de las enzimas glucolíticas, así como también enzimas que participan en el metabolismo del carbono. Entre estas enzimas, se encontraron aquellas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, producción de NADPH, gluconeogénesis, síntesis de pirimidinas, rescate de purinas, defensa contra el estrés oxidativo, vía de las pentosas fosfato y síntesis de esteroides e isoprenoides (Quiñones et al., 2020). Es preciso señalar que muchas de estas enzimas glucolíticas, así como su ubicación dentro de los glicosomas, son esenciales para la viabilidad de estos parásitos, lo que las hace blancos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos (Barros-Alvarez et al., 2014).

## Acidocalcisomas

Por primera vez descritos en tripanosomátidos (Vercesi et al., 1994; Docampo et al., 1995), los acidocalcisomas son organelas ácidas electrodenudas, de entre 100 a 200 nm de diámetro, que contienen grandes cantidades de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y fosfato (ortofosfato,  $\text{P}_i$ ; pirofosfato,  $\text{PP}_i$ ; y polifosfato,  $\text{polyP}_i$ ) en su interior (Docampo et al., 2013). En la membrana plasmática poseen bombas de protones que mantienen la acidez y, además de cotransportadores antiparalelos ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ), bombas de proteínas, acuaporinas y ATPasas, contienen un canal de calcio (el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato o  $\text{IP}_3\text{R}$ ) que sugiere la participación en la señalización mediada por este ion (Figura 10) (Docampo and Huang, 2016).



**Figura 10.** Representación esquemática de un acidocalcisoma de *T. cruzi*. Adaptado de Docampo y Huang (2016).

Más allá de la función de reservorio de cationes, fósforo y aminoácidos básicos, los acidocalcisomas participan también en la autofagia y en la osmorregulación. En el caso de la autofagia, cuando se bloquea la biogénesis de los acidocalcisomas (pero no de los lisosomas), se inhibe la formación de autofagosomas inducida por privación de nutrientes (Li and He, 2014). Con referencia a la osmorregulación, frente a un estrés hipoosmótico, estas organelas ácidas se fusionan con la vacuola contráctil, incrementando la osmolaridad y forzando la entrada de agua a través de acuaporinas que se transportan a la membrana del complejo vacuolar contráctil (CVC) desde la

membrana de los acidocalcisomas, un mecanismo modulado por el aumento de los niveles de AMP cíclico (AMPC) (Rohloff et al., 2004).

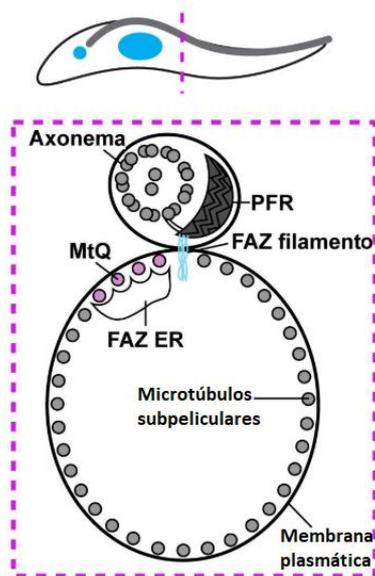
### **Reservosomas**

Los reservosomas son organelas esféricas, de 400 a 600 nm de diámetro, que almacenan proteínas y lípidos, y que se encuentran en la parte posterior de los epimastigotes (De Souza et al., 2000). Su nombre deviene de que las macromoléculas que ingresan al epimastigote a través de la vía endocítica se acumulan en esta organela. En 2009, un grupo de investigadores combinaron técnicas de fraccionamiento celular con espectrometría de masas (LC-MS/MS) y determinaron las proteínas presentes en estas organelas. Entre otras cosas, descubrieron la presencia de marcadores endocíticos, lo que confirma que los reservosomas se generan por la fusión de vesículas de las vías endocítica y secretora (Sant'Anna et al., 2009). Asimismo, es la mayor reserva de cruzipaina, una de las peptidasas más estudiadas de *T. cruzi*, sugiriendo una función lisosomal de estas organelas. Curiosamente, durante la metacicloogénesis (cuando los epimastigotes se diferencian a MTs), el contenido del reservosoma se degrada y la organela desaparece (Cunha-e-Silva et al., 2006), en un proceso inducido por autofagia (Losinno et al., 2020).

### **Microtúbulos subpeliculares y bolsillo flagelar**

Otra particularidad de este grupo es la presencia de una matriz de microtúbulos subpeliculares, por debajo de la membrana plasmática, que define la forma de estos parásitos. Esta matriz está conservada a lo largo de todos los parásitos y organismos de vida libre que componen los kinetoplastidos (Sinclair and de Graffenried, 2019). La cubierta de microtúbulos subpeliculares limita el acceso a la membrana plasmática, es decir, impide el intercambio con el exterior. Los procesos exo/endocíticos ocurren entonces en lugares donde la continuidad de la matriz se interrumpe. Uno de estos sitios se corresponde con una invaginación de la membrana plasmática desde donde emerge el flagelo: el bolsillo flagelar. El flagelo no se encuentra libre, sino que está

asociado a la membrana por medio de la zona de unión del flagelo (FAZ), que posee una longitud variable dependiendo de la forma. Adyacente al FAZ se ubica un cuarteto de microtúbulos (MtQ) que se origina cerca del cuerpo basal y que envuelve el bolsillo flagelar (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema de una sección transversal de un tripomastigote de *T. cruzi*. Los microtúbulos de la matriz se encuentran a solo 10 nm de la membrana plasmática. El cuarteto de microtúbulos (MtQ) tiene la polaridad opuesta a los otros microtúbulos de la matriz. El filamento de la zona de unión del flagelo (FAZ) interrumpe la matriz y une el flagelo a la superficie celular. PFR; varilla paraflagelar. Adaptado de Sinclair y col. (2019).

El MtQ tiene una polaridad invertida en comparación con los microtúbulos de la matriz, lo que puede facilitar el direccionamiento de complejos proteicos involucrados en la citocinesis y en la morfogénesis (Halliday et al., 2020). Por otra parte, el bolsillo flagelar está asociado al CVC, relacionado con la osmorregulación (Quiñones et al., 2020). El CVC responde al estrés hiperosmótico acumulando y expulsando el exceso de agua de la célula, en un proceso en el que participa la acuaporina TcAQP1 (Li et al., 2011). Se demostró que TcAQP1 participa tanto en el estrés hiperosmótico como en el hipoosmótico, en conjunto con los acidocalcisomas (Docampo et al., 2013). En síntesis, el bolsillo flagelar es una organela crucial de la biología celular de *T. cruzi*, que forma parte del sistema de endomembranas y que participa en múltiples y diversas funciones como la adquisición de nutrientes, la morfogénesis y la secreción de proteínas (Halliday et al., 2020). A su vez, el flagelo y su movimiento cumplen funciones críticas en la interacción e invasión de una célula hospedadora, en la motilidad y división celular, y en la evasión del sistema inmune (Ralston and Hill, 2008).

## Organización genómica y expresión génica

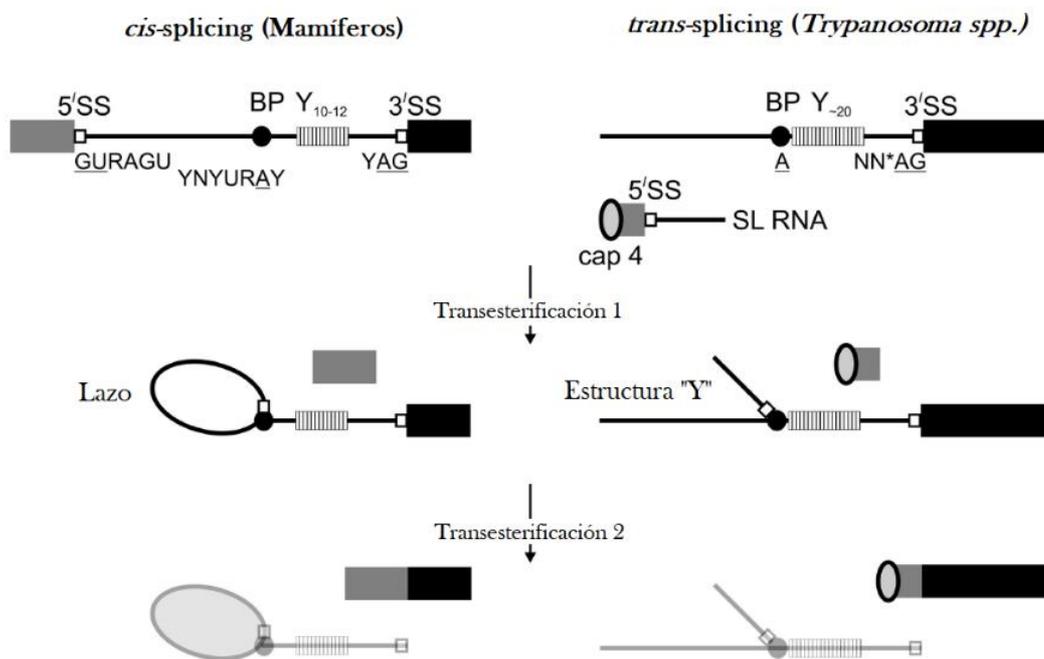
El primer genoma de *T. cruzi*, correspondiente a la cepa CL Brener (TcVI), fue publicado en 2005 (El-Sayed et al., 2005). CL Brener es una cepa híbrida que presenta diferente longitud y contenido genético en cromosomas homólogos, y que a su vez fue separada en dos haplotipos: Esmeraldo-like y Non-Esmeraldo-like. A pesar de que se ha mejorado la anotación de CL Brener, genomas más completos fueron obtenidos posteriormente. A la fecha de publicación de esta tesis, una gran cantidad de DTUs fueron secuenciadas con diferentes métodos, como se muestra en la tabla 1 y, sin embargo, la cepa de referencia del “Centro Nacional de Información Biotecnológica” (NCBI) sigue siendo CL Brener.

Cepa	DTU	Tamaño (Mbp)	Versión	Método de secuenciación
G	I	25.17	Nov-18	Roche 454
Dm28c	I	53.27	May-18	Illumina + PacBio
Sylvio X10/1	I	38.59	Oct-12	Roche 454 + Illumina
Berenice	II	40.8	Ene-20	Illumina + Nanopore
Y	II	39.34	Oct-17	Illumina
231	III	35.36	Ene-18	Illumina
Bug2148	V	55.22	Oct-17	PacBio
CL	VI	65	Nov-18	Roche 454
TCC	VI	87.06	May-18	Illumina + PacBio
CL Brener	VI	89.94	Jul-05	Sanger
BNEL	VI	32.53	Dic-15	Sanger
BEL	VI	32.53	Dic-15	Sanger
<i>T. c. marinkellei</i> B7	---	38.65	Oct-12	Roche 454 + Illumina

**Tabla 1.** Genomas anotados de *T. cruzi*. Adaptado de Herreros-Cabello y col. (2020).

*T. cruzi* es un organismo diploide, pero exhibe aneuploidía según la cepa estudiada, y hasta dentro de clones de la misma cepa. Notablemente, un 50% del genoma de este parásito corresponde a secuencias de función desconocida. La orientación de los genes es cabeza-cola, con pocos cambios de dirección; y no se han identificado promotores

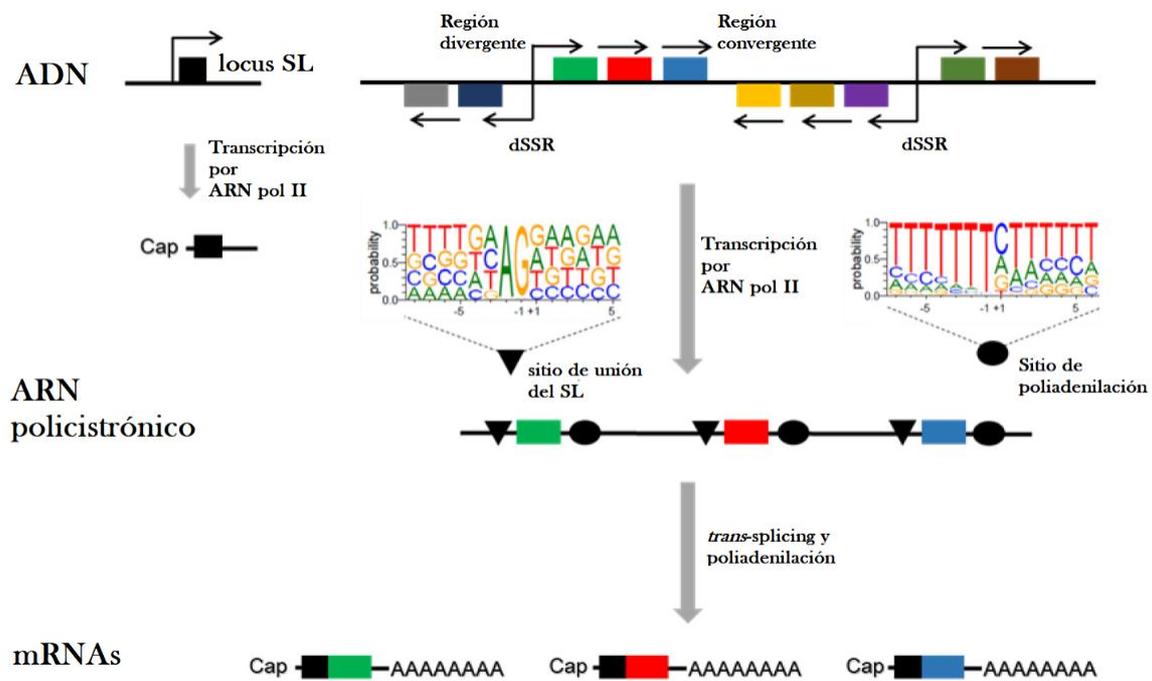
para la ARN polimerasa II (ARN pol II), excepto para el gen que codifica la proteína de secuencia líder o “*splice leader*” (SL) (Gilinger and Bellofatto, 2001). Al no haber secuencias promotoras, la ARN pol II inicia la transcripción en sitios donde hay modificaciones o variantes de histonas, que se encuentran en las regiones de cambio de hebra divergente (dSSR) (Puechberty et al., 2007; Respuela et al., 2008; Siegel et al., 2009). La transcripción en *T. cruzi* es policistónica y genera unidades de transcripto primario de hasta 100 kb (Clayton, 2019). El transcripto primario es procesado co-transcripcionalmente en ARN mensajeros individuales (ARNm) por dos mecanismos: *trans*-splicing y poliadenilación. El mecanismo de *trans*-splicing es un proceso por el cual dos ARNm codificados en diferentes *loci* del genoma reaccionan para formar un único transcripto (Figura 12).



**Figura 12.** El proceso de *trans*-splicing ocurre a través de dos reacciones de transesterificación, y como intermediario se genera una estructura en forma de Y, que es equivalente al lazo que se forma durante el *cis*-splicing. Adaptado de Günzl y col. (2010).

En el caso de los tripanosomátidos, uno de los ARNm participantes siempre es el SL-ARNm, que consiste en una secuencia de 39 nucleótidos que contiene una modificación en su extremo 5'-terminal, una 7-metilguanosa trifosfato (m<sup>7</sup>GpppG)

o “CAP” (Sutton and Boothroyd, 1986). El otro ARNm participante es el que se encuentra por procesar. La inserción del CAP-SL le otorga estabilidad al ARNm procesado. Este mecanismo es similar al de *cis*-splicing (que ocurre en mamíferos), e involucra las pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs, por su sigla en inglés) U2, U4, U5 y U6. U1 no participa del proceso y en su lugar los tripanosomátidos utilizan una snRNP que lleva consigo el ARN del SL (SL-snRNP). El proceso ocurre a través de dos reacciones de *trans*-esterificación, pero como producto intermedio se genera una estructura en forma de Y, que es equivalente al lazo que se forma durante el *cis*-splicing (Günzl, 2010). La poliadenilación ocurre de manera acoplada a través de una señal muy diferente a la de la mayoría de los organismos eucariotas. En lugar de un sitio de poliadenilación, en tripanosomátidos existe una distancia específica río arriba de un tracto de pirimidinas (timinas en el caso de *T. cruzi*) con un solo nucleótido que parece ser el sitio más probable de inicio de la poliadenilación (generalmente citosina) (Herrerros-Cabello et al., 2020) (Figura 13).



**Figura 13.** Proceso de transcripción en *T. cruzi*. La ARN polimerasa II produce ARN policistrónicos que se modifican mediante *trans*-splicing y poliadenilación. Los ARNm maduros finales contienen CAP-SL y cola de poli-A. SL: splice leader. Adaptado de Herrerros-Cabello y col. (2020).

### ***Familias multigénicas***

El genoma de *T. cruzi* presenta un núcleo conservado de genes y familias de proteínas de superficie multigénicas extremadamente variables (Berná et al., 2018). Estas familias multigénicas se expanden a lo largo del genoma de acuerdo con su estructura repetitiva y son una fuente rica de diversidad entre diferentes cepas (De Pablos and Osuna, 2012). Entre estas familias se encuentran la superfamilia trans-sialidasa (TS) (aproximadamente 1400 genes), la familia de mucinas (Muc) (aprox. 860 genes), la familia de genes dispersos 1 (DGF-1) (565 genes) y las proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASP), que comprenden alrededor de 1370 genes (El-Sayed et al., 2005; Kawashita et al., 2009).

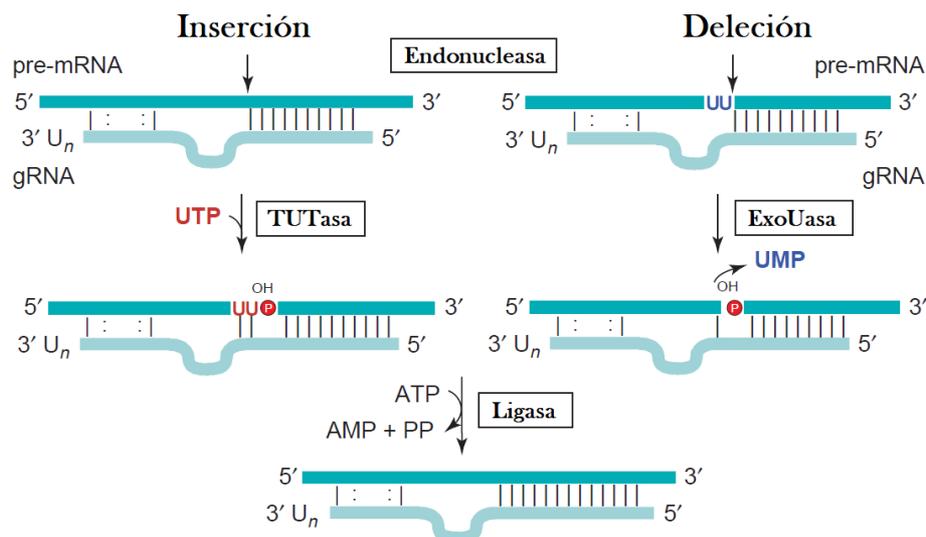
### **Regulación de la expresión génica**

Como en otros parásitos, en *T. cruzi* no existen regiones promotoras ni una variedad muy grande de factores de transcripción que regulen la expresión génica a nivel del ADN. En cambio, posee numerosas proteínas de unión al ARN que convergen en una regulación principalmente post-transcripcional, con un rol crítico de las regiones 3'-no traducidas (3'-UTR). Por ejemplo, el 3'-UTR puede contener sitios de unión a proteínas que le otorguen estabilidad o inestabilidad al transcripto, o bien contener sitios de poliadenilación alternativa (Clayton, 2019).

### **Kinetoplasto y edición del ARN**

El kinetoplasto es una región particular del mitocondrion que se encuentra adyacente a la base del cuerpo basal del flagelo (Figura 7). Contiene ADN altamente empaquetado (kDNA) dentro de una red de miles de moléculas de ADN circulares concatenadas, de diferente tamaño y función, que se denominan maxi y minicírculos. Cada minicírculo posee un tamaño de 1 a 2.5 kb, y contiene de uno a cuatro regiones conservadas; mientras que los maxicírculos pueden llegar a tener 40 kb con 16 kb de región conservada. Estos ADN circulares concatenados son importantes en un proceso que ocurre dentro del mitocondrion llamado edición del ARN. La edición es la modificación del ARNm luego de ser transcripto, lo que produce un ARN con distinta

información al gen correspondiente. Se describió por primera vez en 1986, cuando Benne y col. mostraron que la proteína CoxII sufre la inserción de cuatro nucleótidos de uridina (U), que restauran el marco de lectura correcto y producen un ARN traducible (Benne et al., 1986). Luego, se descubrió que la mayoría de los genes mitocondriales son editados mediante inserciones y deleciones de nucleótidos U. La región conservada en los minicírculos contiene genes que codifican ARN guías pequeños (ARNg), mientras que en los maxicírculos hay genes que codifican para otras proteínas con marcos de lectura abierta (ARN no editados) o con forma de “pre-edición” (Maslov et al., 2019). Existen miles de ARNg que guían la edición del ARN en compañía de proteínas que componen el editosoma (endonucleasa, ligasa, TUTasa, ExoUasa). Los pre-ARNm se editan de 3’ a 5’ a través de un ARNg (Stuart et al., 2005) (Figura 14). La unión entre los ARN (el ARNm a editarse y el ARNg) determina el sitio de escisión y el número de nucleótidos U que se insertan (TUTasa) o eliminan (ExoUasa). La edición de varios sectores es secuencial y coordinada, ya que por cada ARNg se crea una secuencia que es complementaria a la región de anclaje del ARNg posterior (Stuart et al., 2005).



**Figura 14.** La unión entre los ARN por Watson -Crick (líneas continuas) y por interacción G-U (dos puntos) determina el sitio de escisión y el número de nucleótidos U que se insertan/eliminan. Se produce entonces un corte río arriba de esta interacción (a 8-10 pb) por medio de una endonucleasa (flecha), y las U se agregan (TUTasa) o se eliminan (ExoUasa), según la secuencia del ARNg. Finalmente, ambos fragmentos se unen por la participación de una proteína ligasa.

## La comunicación con el entorno: señalización dependiente de AMPc

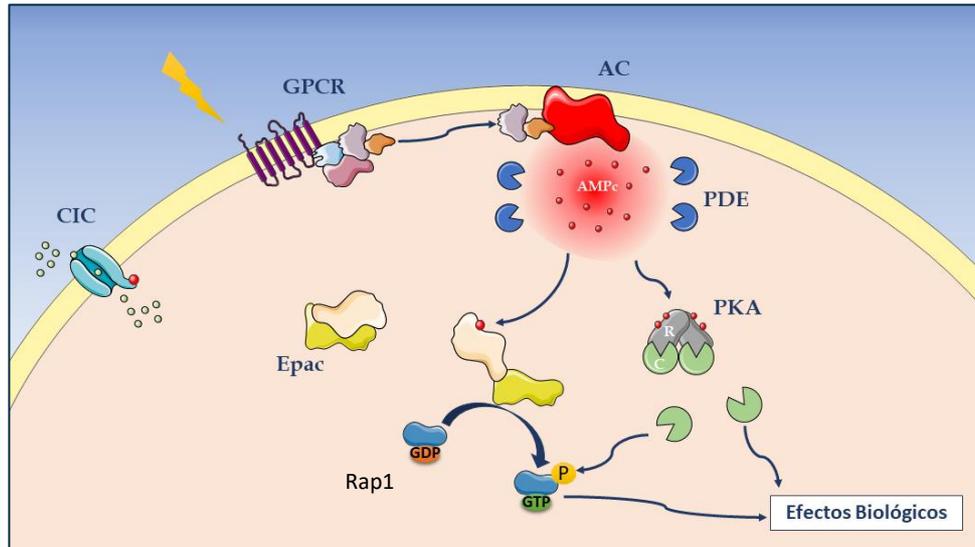
El desarrollo de drogas requiere la identificación de nuevos blancos moleculares novedosos que tengan una función exclusiva y esencial en la biología del parásito (Pinto et al., 2014); en otras palabras, las nuevas drogas deberían ser capaces de interrumpir su ciclo de vida. En este contexto, el estudio de las cascadas de señalización y de las proteínas involucradas resulta de gran interés. Las vías de señalización se activan tanto en el parásito (Schoijet et al., 2019) como en la célula hospedadora durante la invasión (Ferri and Edreira, 2021). Es de nuestro particular interés la vía de señalización dependiente de AMPc, que cumple un papel relevante a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi* (McDonough and Rodriguez, 2012) ya que participa tanto en la invasión de la célula hospedadora como durante el desarrollo del parásito en el vector, y podría representar potenciales blancos moleculares (Yan et al., 2016).

El AMPc (adenosín 3',5'-monofosfato cíclico), molécula descrita por primera vez en 1957 (Sutherland and Rall, 1958), actúa como segundo mensajero en un gran número de procesos biológicos y está presente en la mayoría de los organismos (Gancedo, 2013). La concentración intracelular de este nucleótido depende del balance entre su síntesis y su degradación, aunque en algunos organismos se encuentran involucrados procesos que permiten el intercambio de esta molécula con el medio externo.

### Síntesis del AMPc

En células eucariotas, la síntesis de AMPc es catalizada por una familia de enzimas llamadas adenilil ciclasas (AC) que pueden ser solubles, asociadas a membrana o proteínas integrales, con entre uno y siete pasos de transmembrana (Steebhorn, 2014). La actividad de las ACs se encuentra regulada por moléculas pequeñas, en el caso de las ACs solubles; o por la interacción con otra proteína, generalmente una subunidad de una proteína G acoplada a un receptor (GPCR), en el caso de las ACs asociadas o

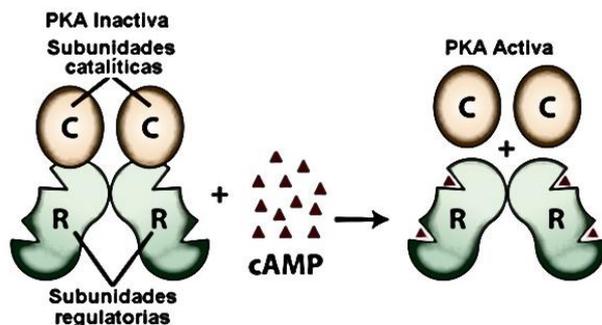
integrales de membrana. Una vez que aumenta la concentración del segundo mensajero, este se une y activa distintas proteínas que transducen la señal dentro de la célula (Figura 15).



**Figura 15.** Representación esquemática de la señalización dependiente de AMPc en una célula eucariota típica. AC: adenililciclase, GPCR: receptor acoplado a proteína G, PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc, Epac: proteína intercambiadora dependiente de AMPc, CIC: canal iónico activado por nucleótido cíclico, PDE: fosfodiesterasa, Rap1: proteína relacionada a Ras 1.

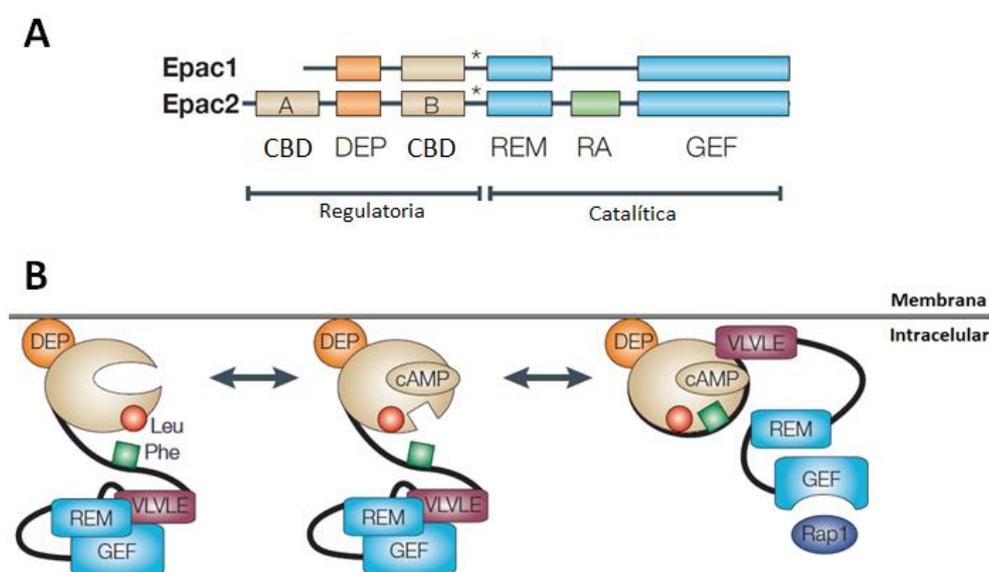
### Efectores del AMPc

Se han descrito cuatro efectores del AMPc: PKA (quinasa dependiente de AMPc), Epac (proteína intercambiadora directamente activada por AMPc), canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (CICs) y, más recientemente, las proteínas que contienen dominios Popeye (POPDCs). PKA es un heterodímero compuesto por dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C) que se activa mediante la unión del AMPc a dos sitios en cada una de las subunidades R, lo que provoca la disociación de las subunidades C (Taylor et al., 2005) (Figura 16).



**Figura 16.** Mecanismo de activación de PKA. La unión del nucleótido AMPc a las subunidades reguladoras produce un cambio conformacional de las mismas con la consecuente liberación de las subunidades catalíticas.

Por su parte, Epac es una proteína que promueve la activación de pequeñas GTPasas, como Rap1 y Rap2. La estructura de Epac puede dividirse en una región N-terminal regulatoria y una región C-terminal catalítica. La zona regulatoria posee un dominio involucrado en la asociación a la membrana plasmática (DEP) y uno (Epac1) o dos (Epac2) dominios de unión al AMPc; mientras que en la región catalítica se encuentran los dominios REM (motivo intercambiador de Ras) y GEF (factor intercambiador del nucleótido guanina), encargados de la activación de las proteínas Rap (Figura 17).



**Figura 17.** (A) Dominios de Epac. CBD: dominio de unión a AMPc; DEP: dominio de unión a membrana; REM: motivo intercambiador de Ras; RA: dominio de asociación Ras; y GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina. Los dominios REM y GEF forman la región catalítica de la proteína. La secuencia conservada Val-Leu-Val-Leu-Glu (VLVLE) se indica con un asterisco (B) Activación de Epac. Al unirse al AMPc, se desplaza una leucina conservada (Leu; círculo rojo) en el CBD, lo que permite que la región bisagra que contiene una fenilalanina conservada (Phe; cuadrado verde) se doble hacia el bolsillo de unión al AMPc. Luego, se induce un cambio conformacional que libera la restricción inhibitoria sobre el dominio catalítico GEF. La secuencia VLVLE podría tener un papel importante en la interacción entre el dominio de unión a AMPc y la región catalítica. Adaptado de Bos y col. (2003).

Cuando se une una molécula de AMPc, induce un cambio conformacional que expone el sitio catalítico de esta proteína, que a su vez induce el intercambio GDP/GTP que activa a la pequeña GTPasa (Roscioni et al., 2008). Rap1 es una GTPasa

monomérica que cicla entre un estado inactivo (unido a GDP) y un estado activo (unido a GTP) (De Rooij et al., 1998). La activación se revierte por acción de RapGAP (proteína de activación de la actividad GTPasa) que induce un aumento en la actividad GTPasa intrínseca y convierte GTP en GDP (Bourne et al., 1991). Por último, el AMPc puede unirse y modular la apertura de canales iónicos (Kaupp and Seifert, 2002) o bien unirse a una familia de receptores llamados POPDC que están involucrados en la homeostasis del tejido muscular liso y cardíaco (Amunjela et al., 2019).

### **Terminación de la señal**

La señalización mediada por AMPc finaliza debido a diferentes mecanismos: la desensibilización de los receptores, la liberación del AMPc fuera de la célula y/o la degradación de la molécula de AMPc por medio de la acción de proteínas de la familia de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE). Las PDEs catalizan la hidrólisis de AMPc a 5'-AMP y se dividen en tres clases, de acuerdo con su dominio catalítico. La clase I se encuentra en todos los organismos eucariotas, mientras que las PDEs de la clase II están presentes en levaduras, *D. discoideum* y algunos procariotas, y la clase III contiene solo PDEs de bacterias (Richter, 2002). La actividad de las PDEs puede estar modulada por un control de su transcripción, por fosforilación, por la interacción con otras proteínas o moléculas pequeñas y por su localización (Gancedo, 2013). Esta última característica es muy importante, pues restringe la señal a un compartimento o microdominio, evitando la difusión del AMPc en el interior celular y la consecuente activación inespecífica de sus efectores. Esta compartimentalización espacial no solo es a nivel de las PDE, sino que todas las proteínas involucradas en la señalización forman parte de estos microdominios. Las proteínas de anclaje de PKA (AKAP) proporcionan especificidad al acercar PKA a los efectores y sustratos específicos y tienen la capacidad de conformar plataformas de anclaje para otras proteínas involucradas en la señalización, como AC y PDE (Wong and Scott, 2004). Asimismo, Epac1 puede interaccionar con PDE-4D3 (una isoforma de PDE), que a su vez es reclutada junto a la PKA a un microdominio por medio de una proteína AKAP

(Dodge-Kafka et al., 2005); o bien interaccionar a través de su dominio DEP con miembros de la familia de proteínas ezrina-radixina-moesina (ERM), y colocalizar en otro microdominio junto a PKA (Hochbaum et al., 2011). En este último caso, la radixina actúa como proteína puente entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, y recluta a los dos efectores del AMPc (PKA y Epac) que colocalizan con AC activas.

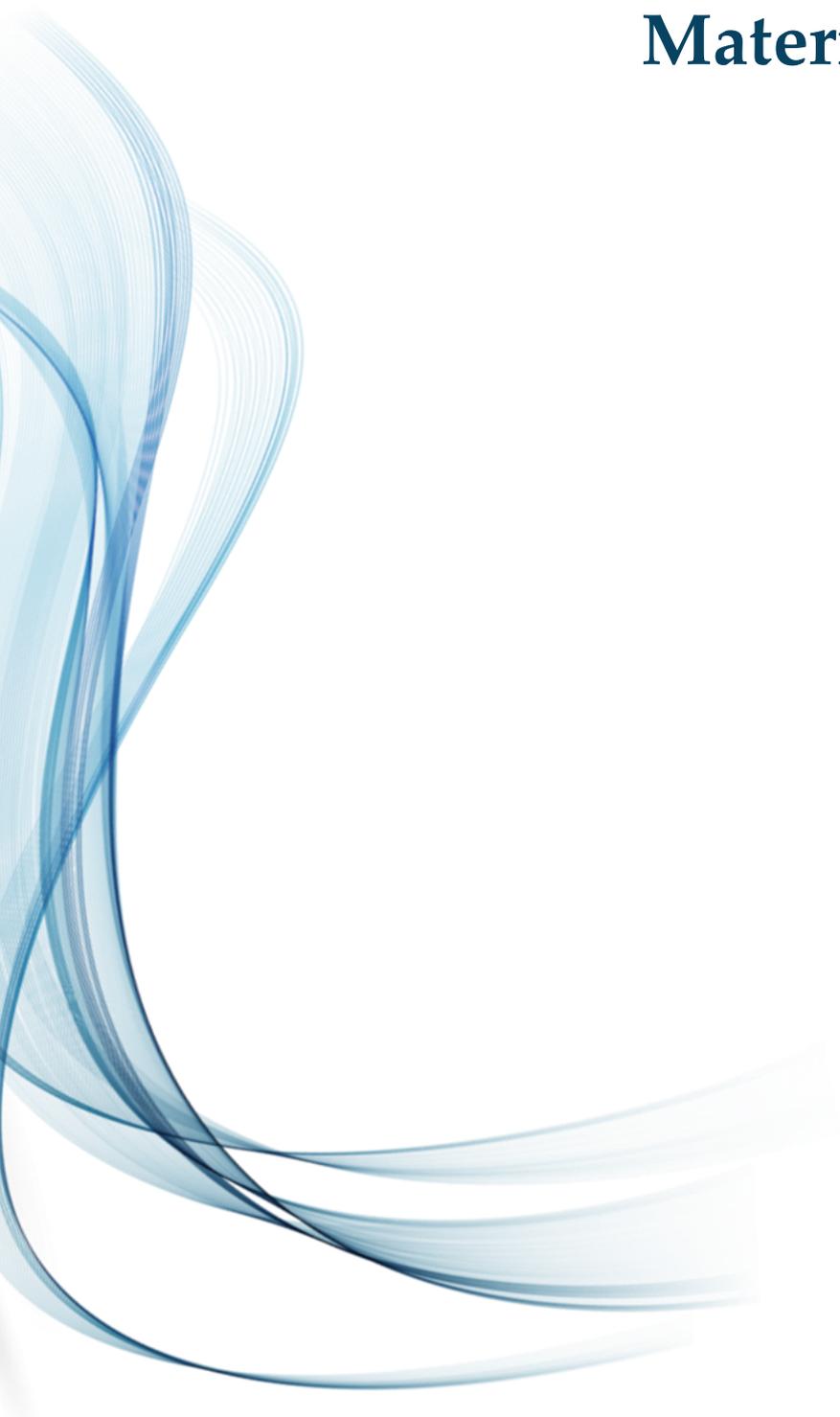
Cabe señalar que la vía del AMPc en *T. cruzi* difiere de la vía descrita en los párrafos anteriores en varios aspectos (algunos miembros de la cascada canónica están completamente ausentes, han sido reemplazados por proteínas exclusivas del parásito o poseen estructuras y/o funciones diferentes de las que se observan en una célula de mamífero particular), los cuales se desarrollan a lo largo del capítulo 2 de la presente tesis.

### **La vía del AMPc como blanco terapéutico**

Existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos tratamientos, lo que implica la identificación de nuevos blancos moleculares con actividad antiparasitaria o nuevas terapias que, en conjunto con las drogas utilizadas hoy en día, disminuyan los efectos adversos al reducir las dosis y/o tiempos empleados en los regímenes actuales. La “Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Olvidadas” (DNDi) lanzó en 2009 la “Plataforma de Investigación Clínica de Chagas” (CCRP) que reúne socios, expertos y partes interesadas para brindar apoyo en la evaluación y el desarrollo de nuevos tratamientos. Recientemente, en 2019, esta plataforma lanzó el proyecto “*Chagas Hit-to-lead*” con el objetivo de identificar compuestos que muestren una alta calidad en ensayos preclínicos para convertirse en nuevos tratamientos contra la enfermedad. Sin embargo, los ensayos clínicos completados y aquellos que todavía se encuentran en curso han mostrado pocas opciones innovadoras, puesto que la mayoría de ellos utilizan fármacos ya conocidos. Miembros de la vía de señalización canónica mediada por AMPc han sido objeto de numerosos fármacos. Por ejemplo, en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, la actividad de la AC fue modulada a través de

agonistas/antagonistas dirigidos hacia los GPCRs (Pavan et al., 2009; Pierre et al., 2009) o específicamente afectando a las ACs, a través de derivados de la forskolina (Toya et al., 1998; Alasbahi and Melzig, 2010). Otros miembros que se han modulado en enfermedades como EPOC, asma, depresión, esquizofrenia, disfunción eréctil, psoriasis, artritis reumatoide y en el tratamiento de neoplasias linfoides son las PDEs (Lerner et al., 2000; Millar et al., 2005; Diamant and Spina, 2011; Page and Spina, 2011; Chiricozzi et al., 2016). Por su parte, Epac recientemente ha sido blanco de distintas terapias a través de su inhibición específica, demostrando un efecto farmacológico en la prevención de la invasión y metástasis de cáncer de páncreas y mama, y generando protección contra rickettsiosis fatales (Ahmed et al., 2019).

En este contexto, el objetivo general de esta tesis de doctorado se centra en descifrar las vías efectoras del AMPc dentro de la célula hospedadora durante la invasión de *T. cruzi* (Capítulo 1), y en la identificación y caracterización de nuevos efectores de la señalización mediada por este nucleótido cíclico en la biología de este parásito (Capítulo 2), con la hipótesis general que múltiples vías efectoras del AMPc utilizadas por *T. cruzi* desempeñan un papel significativo en los mecanismos patogénicos, y con el fin de proporcionar nuevos blancos terapéuticos contra la enfermedad de Chagas.



# **Materiales y métodos**

# Materiales y métodos

## Materiales

### Cepas bacterianas (*Escherichia coli*)

Utilizadas en el clonado y amplificación plasmídica:

**DH5 $\alpha$** : F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rk<sup>-</sup>mk<sup>+</sup>),  $\lambda^-$ .

**DB3.1**: F<sup>-</sup> gyrA462 endA1 glnV44  $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm<sup>r</sup>) xyl5  $\Delta$ leu mtl1 (vector que se utiliza para propagar plásmidos que contienen el operón ccdB del sistema Gateway®).

Utilizadas en la expresión inducible de proteínas recombinantes mediante la adición de IPTG:

**BL21(DE3)**: B F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>( $\lambda^S$ ).

**Rosetta™(DE3)pLysS**: B F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon<sup>?</sup> hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>( $\lambda^S$ ) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori<sub>p15A</sub>](Cm<sup>R</sup>).

**Rosetta-gami(DE3)pLysS**:  $\Delta$ (ara-leu)7697  $\Delta$ lacX74  $\Delta$ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>).

### Líneas celulares

#### Células de mamífero

Utilizadas para la obtención y mantenimiento de las formas tripomastigotes de *T. cruzi*:

- **VERO** (ATCC® CCL-81™): células epiteliales provenientes de riñón de primate.

Utilizadas en ensayos de invasión por *T. cruzi*:

- **NRK-52E** (ATCC® CRL-1571™): células epiteliales provenientes de riñón de rata (fibroblastos).
- **HEL4** (ATCC® CCL-2™): células epiteliales provenientes de cuello uterino humano.
- **HL-1** (Claycomb et al., 1998): células de músculo cardíaco provenientes de corazón de ratón (cardiomiocitos).

### *T. cruzi*

Epimastigotes y tripomastigotes derivados de cultivo de la cepa Y (TcII).

## Anticuerpos comerciales

### Primarios

- **Penta.His HRP**: anticuerpo conjugado a HRP desarrollado en ratón, que reconoce un *tag* de cinco histidinas contiguas (Qiagen).
- **Anti-his**: anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón, que reconoce un *tag* de cinco histidinas contiguas (GenScript).
- **Anti-GST**: anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón, que reconoce la proteína de fusión GST (GenScript).
- **Anti-CARP1-Nt**: anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, que reconoce el extremo N-terminal de la proteína CARP1 (GenScript).
- **Anti-CARP1-Ct**: anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, que reconoce el extremo C-terminal de la proteína CARP1 (GenScript).
- **Anti-GFP**: anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, que reconoce la proteína fluorescente GFP (GenScript).

- **Anti-epac1:** anticuerpo policlonal desarrollado en ratón, que reconoce el extremo N-terminal de la proteína Epac1 (GeneTex).
- **Anti-RAP1A/B:** anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, que reconoce las proteínas RAP1A y B (Genscript).
- **Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2):** anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, que reconoce la proteína Erk1/2 (Cell Signaling).
- **Anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2):** anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, que reconoce la proteína Erk fosforilada en Thr202 y/o Tyr204 en el caso de Erk1 y Thr185 y/o Tyr187 en el caso de Erk2 (Cell Signaling).
- **Anti-HA:** anticuerpo monoclonal desarrollado en rata, que reconoce el *tag* de hemaglutinina (Roche).
- **Anti-GAPDH:** anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón, que reconoce la proteína GAPDH (Santa Cruz Biotechnology).

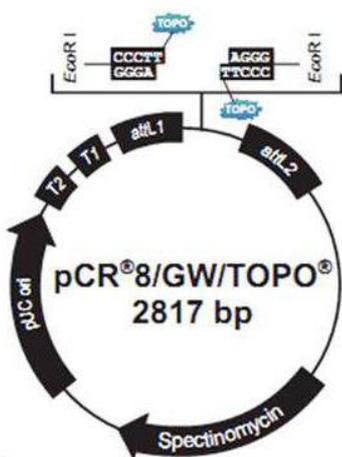
### Secundarios

- **Anti-IgG de ratón conjugado a HRP:** anticuerpo desarrollado en cabra, conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology).
- **Anti-IgG de conejo conjugado a HRP:** anticuerpo desarrollado en cabra, conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology).
- **Anti-IgG de rata conjugado a HRP:** anticuerpo desarrollado en cabra, conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology).
- **Anti-IgG (H+L) de ratón conjugado a Alexa Fluor®488:** anticuerpo desarrollado en burro, conjugado a Alexa Fluor®488 (Jackson ImmunoResearch).
- **Anti-IgG (H+L) de conejo conjugado a Alexa Fluor®488:** anticuerpo desarrollado en cabra, conjugado a Alexa Fluor®594 (Jackson ImmunoResearch).

- **Anti-IgG (H+L) de conejo conjugado a Alexa Fluor®594:** anticuerpo desarrollado en cabra, conjugado a Alexa Fluor®594 (Jackson ImmunoResearch).
- **Anti-IgG (H+L) de rata conjugado a Alexa Fluor®594:** anticuerpo desarrollado en burro, conjugado a Alexa Fluor®594 (Jackson ImmunoResearch).

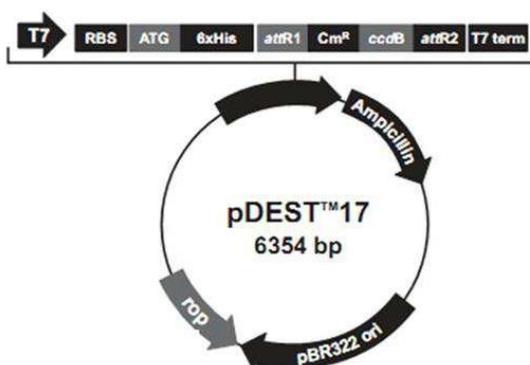
## Plásmidos

- **pCR™8/GW/TOPO®TA:** plásmido de entrada del sistema Gateway® (Invitrogen) (Figura 18).



*Figura 18. Mapa de plásmido de entrada del sistema Gateway® pCR™8/GW/TOPO®TA. Este plásmido contiene a la topoisomerasa I unida covalentemente. attL1 y attL2: sitios para la recombinación LR.*

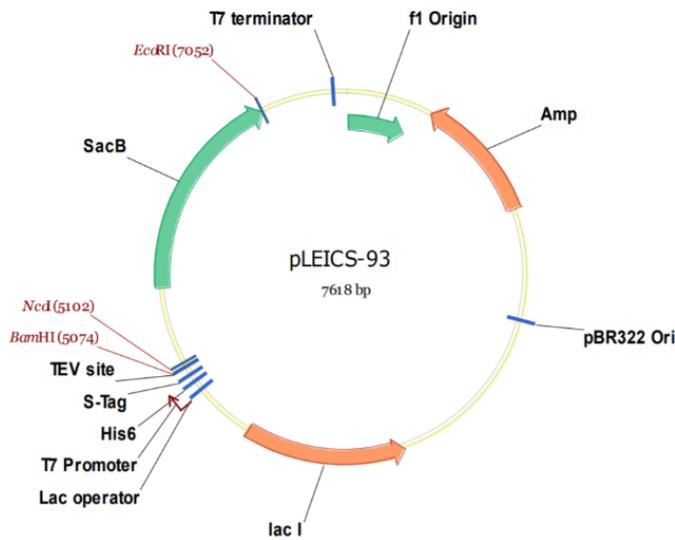
- **pDEST™17:** plásmido destino del sistema Gateway® (Invitrogen). Se utilizó para fusionar los ORF de interés con un tag de 6 histidinas en el extremo N-terminal (Figura 19).



*Figura 19. Mapa de plásmido destino del sistema Gateway® pDEST™17. La expresión del gen de interés se encuentra regulada por un promotor para la T7 ARN polimerasa. attR1 y attR2: sitios para la recombinación LR.*

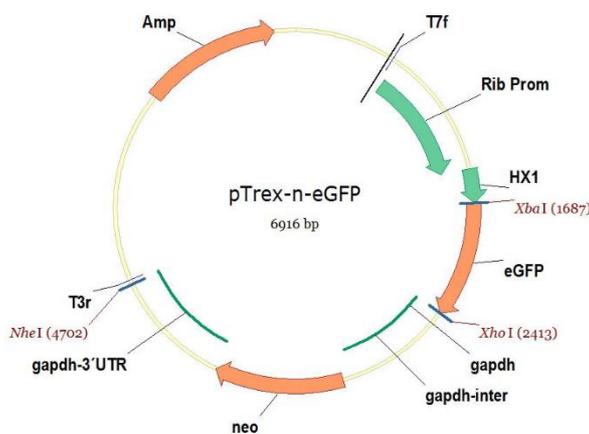


el extremo N-terminal (Figura 22). Nota: S-tag le otorga mayor solubilidad a la proteína (secuencia: -SSGLVPRGSGM-S-PDLGTGS).



**Figura 22.** Mapa de plásmido destino pLEICS-93 utilizado en la técnica de "in fusion cloning". La expresión del gen de interés se encuentra regulada por un promotor para la T7 ARN polimerasa.

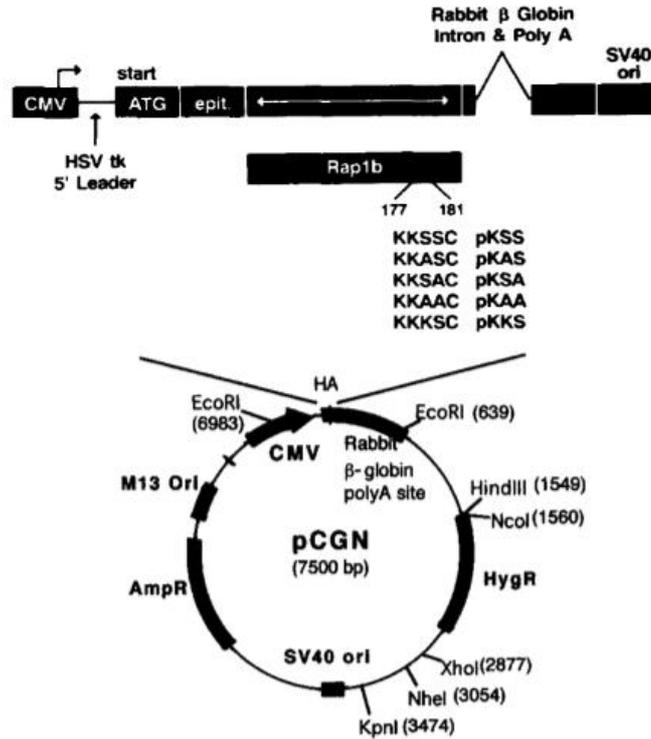
- **pTREX-eGFP:** plásmido de expresión en *T. cruzi* (Figura 23). Se utilizó para crear una proteína de fusión con el ORF de interés y la secuencia de la proteína GFP o un tag HA (hemaglutinina de la influenza humana) en el extremo C-terminal.



**Figura 23.** Mapa de plásmido de expresión en *T. cruzi* pTREX-eGFP.

- **pCGN:** plásmido de expresión en células de mamífero (Figura 24). Se utilizó para expresar mutantes de la proteína Rap1b: HA-Rap1b *wild type* (pCGN-S179), HA-Rap1b constitutivamente activa (pCGN-G12V), mutante no fosforilable (pCGN-S179A), mutante fosfo-mimética (pCGN-S179D) y las doble-mutantes (pCGN-G12V-

S179A y pCGN-G12V-S179D). Provisto gentilmente por el Dr. Daniel L. Altschuler (Dept. of Pharmacology and Chemical Biology, School of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA).



**Figura 24.** Vector de expresión y construcciones mutantes. La línea superior muestra la estructura del vector de expresión pCGN con los elementos de control importantes. Se muestran los residuos de aminoácidos (de la posición 177 a la 181) implicados en las construcciones mutantes (pKSS = Rap1b wild type).

## Métodos

### Cultivos celulares

**Células de mamífero.** Las líneas celulares NRK, VERO y HELA se cultivaron en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (BD Falcon), incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y mantenidas por pasajes en serie con DMEM con Glutamax™ (Gibco), suplementado con 10% (v/v) suero fetal bovino ("SFB"; Natocor), 100 U/ml penicilina y 0.1 mg/ml estreptomina (Sigma). La línea HL-1 se cultivó de la misma manera, pero utilizando botellas de cultivo previamente revestidas con una matriz de gelatina/fibronectina (5 µg de fibronectina por ml de 0.02% gelatina (m/v) -Sigma) y medio de cultivo Claycomb con Glutamax™ (Sigma) suplementado con 10% (v/v) SFB, 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomina y 0.1 mM de norepinefrina (Sigma). La tripsinización (TrypLE™ Express -Gibco) de cada pasaje se realizó cuando el cultivo había alcanzado entre un 80 y un 90% de confluencia, previamente lavando la botella con PBS (1.44 gr/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 gr/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 gr/L KCl, 8 gr/L NaCl; pH=7.2). Los recuentos celulares se hicieron en cámara de Neubauer realizando una dilución de las células en Azul de Tripán (Sigma).

*T. cruzi.* Formas tripomastigotes de cultivo (TCT) de la cepa Y de *T. cruzi* (TcII) fueron mantenidos en la línea celular VERO, la cual fue infectada en una relación 10:1 (parásitos:células). Luego de 5-7 días de infección se recuperó el medio de cultivo conteniendo los TCTs. Se realizó un recuento de parásitos y se ajustaron a la concentración necesaria para el mantenimiento o para los ensayos correspondientes. Como control experimental se procesó paralelamente el sobrenadante de células VERO sin infectar.

Formas epimastigotes de la cepa Y (TcII) y RA (TcVI) de *T. cruzi* se mantuvieron a 28 °C en medio LIT (5 g/L infusión de hígado, 5 g/L triptosa, 68 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 22 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% (m/v) glucosa; pH=7.4) suplementado con 10% (v/v) SFB, 0.002% hemina bovina, 100 U/ml penicilina y 0.1 mg/ml estreptomina. En el caso de

los epimastigotes transgénicos se agregó al medio geneticina ("G418", Sigma); para seleccionar (500 µg/ml) o mantener (250 µg/ml) los cultivos. El estado y recuento de los epimastigotes se realizó en cámara de Neubauer.

## **Manipulación y análisis de ácidos nucleicos**

### **Extracción de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi***

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de  $4 \times 10^8$  epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* (TcII) utilizando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizó una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes patentados que permite realizar una precipitación secuencial de ARN, ADN y proteínas a partir de una sola muestra. Después de homogeneizar la muestra con el reactivo TRIzol™, se agregó cloroformo e incubó hasta obtener una fase acuosa superior (que contiene ARN), una interfase y una fase orgánica inferior (que contiene el ADN y las proteínas). El ARN se precipitó de la fase acuosa con isopropanol, mientras que el ADN se lo obtuvo de la interfase/capa orgánica mediante una precipitación con el uso de etanol.

### **Preparación de ADN plasmídico**

El ADN plasmídico fue purificado mediante el uso de los kits *PureYield™ Plasmid Miniprep System* para la preparación de pequeñas cantidades de plásmido y los kits *Wizard® Plus Midi/Maxipreps DNA Purification System* para las preparaciones de grandes cantidades de ADN plasmídico, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La amplificación de los ORFs se realizó con el kit *iProof™ High-Fidelity PCR* (Bio-rad), utilizando el ADN genómico obtenido mediante la extracción con TRIzol™ y a partir de los *primers* específicos (ver [Anexo N° 2](#)). Brevemente, los ORFs se amplificaron a partir de una mezcla que contenía el templado (ADN genómico), los

*primers* forward y reverse, una mezcla de dNTPs (Invitrogen) y la iProof ADN polimerasa (Bio-Rad) en buffer iProof HF (Bio-Rad). Se utilizó el siguiente protocolo:

1. Desnaturalización inicial: 5 min. a 94 °C,
2. Desnaturalización: 30 seg. a 94 °C
3. Apareamiento de primers: 30 seg. a 55-60 °C
4. Extensión: 2 min. a 68 °C (x 30 ciclos de paso 2 a paso 4);
5. Extensión final: 10 min. a 68 °C.

### **PCR de colonias**

Para el rastreo de colonias transformadas positivamente se utilizó como templado dichas colonias, depositándolas directamente en buffer de reacción conteniendo dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, *primer* forward y reverse, y la taq ADN polimerasa (Invitrogen). Se utilizó el kit *Taq DNA Polymerase* (Sigma), con un *primer* complementario al ORF analizado y el otro al plásmido. La reacción se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo:

1. Desnaturalización inicial: 7 min. a 95 °C
2. Desnaturalización: 45 seg. a 95 °C
3. Apareamiento: 30 seg. a 45 °C
4. Extensión: 1.5 min. a 72 °C (x 30 ciclos de paso 2 a paso 4)
5. Extensión final: 10 min. a 72 °C.

### **Electroforesis de ADN en gel de agarosa y purificación de los fragmentos de interés**

Los fragmentos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TAE. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (100 V) en una cuba horizontal (Bio-rad) en el mismo buffer. Los geles de agarosa se revelaron con bromuro de etidio y se visualizaron con un transluminador de luz ultravioleta de 365 nm (G-BOX EF, Syngene); las muestras se sembraron junto a estándares de peso molecular (“PM”; *1 kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

Para la purificación de los fragmentos de PCR amplificados y revelados en geles de agarosa se removió la banda de interés del gel y se utilizó el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega).

### **Adición de dATP en el extremo 5'-terminal del ADN**

En el caso de los fragmentos clonados en los vectores pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>TA se agregó dATP en el extremo 5'-terminal, previo al clonado. Para ello, a estos fragmentos se le agregó una mezcla de dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y la taq ADN polimerasa en buffer PCR (-Mg<sup>+2</sup>) y se incubó la mezcla a 72 °C durante 10 min.

### **Digestión con enzimas de restricción**

Para los cortes con enzima de restricción se preparó una mezcla conteniendo los fragmentos de PCR, o el plásmido correspondiente, junto a la/s enzima/s de restricción en buffer y se incubó por un lapso de 2 a 16 hs (según enzima) a 37 °C. Todas las enzimas de restricción utilizadas fueron adquiridas en *New England BioLabs* (NEB), y los protocolos utilizados se siguieron según indicación del fabricante.

### **Clonado de ORFs**

Los ORFs amplificados por PCR y purificados en geles de agarosa se utilizaron en el clonado de los vectores pTREX (se realizó el clonado tradicional), pDEST17 (se utilizó el sistema *Gateway®*) y pLEICs (se utilizó el sistema *in fusion cloning*). En todos los casos, se verificó la identidad de los ORFs por secuenciación (Macrogen).

*Clonado por enzimas de restricción (pTREX-eGFP).* Los ORFs y el vector a utilizar fueron digeridos con las enzimas correspondientes y purificados como se menciona más arriba. Para la ligación, se utilizó una relación molar inserto:vector (10:1) y se llevó a cabo el siguiente protocolo de ligación: se agregó el vector y el inserto en la relación mencionada junto a la proteína T4 ADN ligasa (Promega) en buffer de ligación y se incubó durante toda la noche a 16 °C. Finalmente, se transformaron bacterias competentes (cepa DH5 $\alpha$ ) con la reacción de ligación y se plaquearon en LB-agar con ampicilina (100  $\mu$ g/ml).

El rastreo de colonias transformadas se realizó por “PCR de colonias”, con un *primer* complementario al ORF analizado y un *primer* M13.

*Clonado con vectores Gateway®.* Para el clonado al sistema Gateway, primeramente, se realizó el clonado del fragmento de interés al vector de entrada pCR™8/GW/TOPO (Gateway®) y luego se transfirió el inserto al vector destino pDEST™-17. Para la reacción de clonado se agregó producto de PCR y vector en buffer provisto por el fabricante (Invitrogen), y se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente. Luego, se transformaron bacterias competentes (cepa DH5α) con la reacción de clonado y se plaquearon en LB-agar con espectinomicina (100 µg/ml). El rastreo de colonias transformadas se realizó por “PCR de colonias” con un *primer* complementario al ORF analizado y un *primer* M13.

Una vez obtenidos los vectores pCR™8/GW/TOPO conteniendo las secuencias de las proteínas de interés se realizó el subclonado al vector pDEST™-17 por medio de una reacción de recombinación LR. Para ello, cada plásmido se colocó en buffer TE (pH=8), al que se le agregó la mezcla enzimática LR Clonase™ II (Invitrogen) y se incubó durante 1 hora a 25 °C o toda la noche a 16 °C. Para finalizar la reacción, se agregó proteinasa K (Invitrogen) y se incubó a 37 °C por 10 min. Finalmente, se transformaron bacterias competentes (cepa DH5α) con la reacción de recombinación y se plaquearon en LB-agar con ampicilina (100 µg/ml). El rastreo de colonias transformadas se realizó por “PCR de colonias” con un *primer* complementario al ORF analizado y al T7 promotor.

*Clonado por “in fusion cloning”.* En una segunda estrategia, se realizó el clonado en vectores pLEICs14/93. La técnica utilizada se denomina “in fusion cloning”, que consiste en amplificar los genes de interés junto a secuencias homólogas al vector y luego incubarlas con una enzima de fusión que digiere los extremos 3'-terminal de los fragmentos de PCR y del vector, permitiendo la unión de

ambos por complementariedad de bases. Luego de la obtención de los vectores, se transformaron bacterias competentes (cepa DH5 $\alpha$ ) con la reacción de recombinación y se plaquearon en LB-agar con ampicilina (100  $\mu$ g/ml). El rastreo de colonias transformadas se realizó por “PCR de colonias” con un *primer* complementario al ORF analizado y al vector pLEICs. Nota: debido a la longitud de la secuencia correspondiente a la proteína CARP4, se clonó la región N-terminal y la región C-terminal por separado. Para determinar la secuencia de ambas regiones se utilizó el programa [Pondr](#), el cual predice regiones desordenadas con el fin de evitar la interrupción de un potencial dominio proteico.

Los vectores con secuencia correcta obtenidos fueron:

Vectores de expresión en parásitos:

pTREX-CARP1 (C-HA tag)  
pTREX-CARP1 (C-GFP-HA tag)  
pTREX- $\Delta$ Nt.CARP1 (C-HA tag)  
pTREX-CARP2 (C-HA tag)  
pTREX-CARP3 (C-HA tag)  
pTREX- CARP4(1-396) (C-HA tag)  
pTREX- CARP4(381-782) (C-HA tag)

Vectores de expresión en bacterias:

pLEICs14-CARP1 (N-GST tag)  
pLEICs14- $\Delta$ Nt-CARP1 (N-GST tag)  
pLEICs14-CARP1-dom1 (N-GST tag)  
pLEICs14-CARP1-dom2 (N-GST tag)  
pLEICs93- $\Delta$ Nt-CARP1 (N-6xHis-S tag)  
pLEICs93-CARP1-dom1 (N-6xHis-S tag)  
pLEICs93-CARP1-dom2 (N-6xHis-S tag)  
pDEST<sup>TM</sup>-17-CARP3 (N-6xHis tag)

pLEICS-93-CARP4(1-396) (N-6xHis-S tag)

pLEICS-93-CARP4(381-782) (N-6xHis-S tag)

Nota: S-tag le otorga mayor solubilidad a la proteína (secuencia: -SSGLVPRGSGM-S-PDLGTGS).

### **Transfección de ADN de células de mamífero**

Para la transfección de células de mamífero se utilizó un protocolo de transfección transitoria con polietilenimina (PEI), basado en el trabajo de Longo y col. (Longo et al., 2013). En resumen, las células se plaquearon en una confluencia del 60-70% y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se lavaron con PBS y se realizó la transfección. Para ello, se preparó una mezcla de ADN:PEI (4:1) en OptiMEM (Gibco), se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente, y luego se agregaron a las células y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego de 24 hs, las células se lavaron con PBS y se agregó medio completo (DMEM o Claycomb 10% SFB, según el tipo celular). Las células transfectadas se utilizaron a las 24/48 hs.

### **Transfección estable de ADN en epimastigotes de *T. cruzi***

El protocolo de transfección de epimastigotes fue realizado en base al trabajo del grupo de Docampo y col. (Lander et al., 2017). Brevemente,  $1 \times 10^8$  epimastigotes de la cepa Y en fase exponencial se lavaron con PBS y se resuspendieron en buffer de electroporación frío (120 mM KCl; 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 25 mM HEPES; 2 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH=7.6). Se agregó el plásmido a transfectar (25 µg) y la mezcla se incubó durante 10 minutos a 4°C en cubetas de electroporación de 0.2 cm (Bio-rad). Luego de la incubación, se electroporaron usando el equipo *Gene Pulser II* (Bio-rad) ajustado a 1.5 kV y 25 µF con 3 pulsos, dejando las cubetas por 1 minuto en hielo entre pulsos. Los epimastigotes transfectados se recuperaron a temperatura ambiente durante 10 min., se transfirieron a botellas de cultivo con 5 ml de medio LIT completo y se cultivaron como se explicó anteriormente. Al cabo de 24 hs, se agregó el agente de selección (200 µg/ml de G418), y se aumentó progresivamente la

concentración hasta alcanzar los 500 µg/ml. Como control de selección, se electroporaron parásitos sin agregado de plásmido.

## **Metodología utilizada en bacterias**

### **Preparación de bacterias termocompetentes**

Una colonia bacteriana de *E. coli* se inoculó en medio Luria-Bertani ("LB": 10.00 g/L peptona tríptica de caseína; 10.00 g/L NaCl; 5 g/L extracto de levadura) (Sambrook et al., 1989) y se incubó en agitación a 37°C. Al día siguiente, se diluyó el cultivo 1:25 en LB, se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm y se incubó en agitación hasta llegar a una DO entre 0.4 y 0.6. Se enfrió el cultivo y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Luego, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 50 ml de 50 mM CaCl<sub>2</sub> frío y se incubó por 20 min. en hielo. Se repitió este paso nuevamente y, finalmente, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 50 mM CaCl<sub>2</sub> con 20% glicerol frío. Se separaron en alícuotas de un solo uso, se pasaron por N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -70 °C.

### **Transformación bacteriana**

Bacterias *E. coli* termocompetentes se transformaron con el plásmido correspondiente para cada experimento. Se les agregó el ADN plasmídico (aprox. 200 ng) y se incubaron por 40 min. en hielo. Luego, se transfirieron a un baño térmico a 42°C por 30 segundos e inmediatamente se colocaron en hielo por 2 min. Se agregó LB y se incubó por 1 hora a 37 °C. Se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante dejando un pequeño volumen para resuspender el precipitado y se plaqueó la totalidad de la resuspensión en LB-agar con el antibiótico de selección. Las placas se incubaron por 24 hs en estufa a 37 °C.

## Preparación de extractos proteicos

### Expresión de proteínas recombinantes en bacterias

Se optimizaron las condiciones de expresión y purificación de cada proteína de interés. Para ello, se inoculó medio líquido LB con el/los antibióticos correspondientes con una colonia de *E. coli* (cepa BL21, Rosetta™ o Rosetta™-gami) transformada con el plásmido de expresión. El cultivo se dejó crecer a 37 °C con agitación hasta llegar a una DO<sub>600nm</sub> entre 0.4 y 0.6. Se indujo la expresión de las proteínas con IPTG a distintas concentraciones y se tomaron alícuotas a distintos intervalos de tiempo. Las alícuotas se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min. y se lisó el pellet con la combinación de distintos buffers de lisis, el sonicado de las muestras y la utilización de un *Cell Disruptor*. Para el análisis, las muestras se colocaron en baño a 100 °C durante 5 min. y se sembraron en un gel SDS-PAGE 10-12% (ver [Anexo N° 3](#)).

### Lisis bacteriana

La lisis bacteriana con detergentes se realizó resuspendiendo el precipitado bacteriano en buffer de resuspensión al que se le agregó un coctel de inhibidores de proteasas (Roche), lisozima y sarkosyl (50 mM NaPi; 500 mM NaCl; 0.2 mg/ml Lisozima; 1% Sarkosyl; pH=7.6). Se incubó en hielo durante 15 min., se pasó por el *Cell disruptor* (28 kpsi) y luego se sonicó 4 veces a una amplitud de 50% durante 20 seg., intercalando 30 seg. de incubación en hielo. A continuación, se centrifugó a 9.500 rpm por 20 min. a 4 °C y el pellet fue descartado. Alternativamente, se realizó el mismo procedimiento, pero sin el agregado de detergentes. Se agregó glicerol (15% final) a los sobrenadantes y se almacenaron a -80 °C para ser utilizadas posteriormente.

### Purificación de proteínas con resina glutatión-agarosa

Las proteínas de fusión a GST se purificaron utilizando una resina de GSH-agarosa (Sigma). Brevemente, se lavó la resina con el buffer de resuspensión utilizado en la lisis bacteriana y luego se incubó con el sobrenadante correspondiente durante 2 hs a 4 °C en constante agitación. Se centrifugó a 2.500 rpm durante 4 min. a 4 °C, se descartó

el sobrenadante y se lavó la resina nuevamente con buffer de resuspensión frío. Para la elusión de las proteínas, se agregó al buffer 50 mM de GSH (pH=8) y se centrifugó a 2.500 rpm por 4 min. a 4 °C. Se añadió glicerol 15% para la preservación de los mismos a -80 °C.

### **Purificación de proteínas con resina de Ni-NTA-agarosa**

Las proteínas de fusión a la etiqueta de histidinas se purificaron utilizando una resina de Ni-NTA-agarosa (Qiagen). Brevemente, se lavó la resina con el buffer de resuspensión utilizado en la lisis bacteriana y luego se incubó con el sobrenadante correspondiente durante 2 hs a 4 °C en constante agitación. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 4 min. a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó la resina nuevamente con buffer de resuspensión frío, con el agregado de 30 mM de imidazole. Para la elusión de las proteínas, se agregó al buffer 500 mM de imidazole (pH=8) y se centrifugó a 3.000 rpm por 4 min. a 4 °C. Se añadió glicerol 15% para su preservación a -80 °C.

### **Cromatografía de exclusión molecular**

Con el fin de obtener la estructura proteica por cristalografía, las proteínas purificadas fueron sometidas a un segundo paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular. Se utilizó el sistema de cromatografía líquida de proteínas (FPLC) ÄKTA pure (GE™ Healthcare) junto a columnas Superdex® S75 16/60 (para la purificación de proteínas de fusión pequeñas, de entre 3 a 70 kDa; como los dominios del AMPc de CARP1) y S200 16/600 (para proteínas de fusión de entre 10 a 200 kDa). Ambas columnas se equilibraron con buffer 50 mM NaPi; 500 mM NaCl (pH=8) y las fracciones recolectadas se dializaron en membranas de diálisis, en el mismo buffer, durante toda la noche a 4°C con agitación. Finalmente, se inyectaron en la columna, luego de concentrarlas mediante el uso de centricones Millipore® (3 kDa o 10kDa, según correspondiese), a una velocidad de elución de 0.5 ml/min. mediante el software de control UNICORN™. Se tomaron alícuotas durante la purificación que fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (“SDS-PAGE”) o *western blot* (“WB”) y se conservaron a -80° C hasta su uso.

### **Preparación de extractos proteicos a partir de células de mamífero**

Para su lisis, las células se lavaron con PBS, se agregó buffer de lisis (50mM Tris-HCl; 200mM NaCl; 2.5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5% Triton-x100; 0.5% NP-40; 10% glicerol; pH=7.4; con inhibidores de proteasas) y se incubaron durante 30 min. a 4 °C en agitación. Luego, se sonicaron 4 veces por 10 seg. a una amplitud de 50% intercalando 30 seg. de incubación en hielo. Antes de utilizarse, los lisados se centrifugaron y el pellet fue descartado.

### **Preparación de extractos proteicos a partir de *T. cruzi***

Formas epimastigotes y tripomastigotes se lavaron con PBS y se sometieron a 5 ciclos sucesivos de congelado a -80°C y descongelado a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron y el sobrenadante utilizado inmediatamente. Para los ensayos de WB, los parásitos se lavaron con PBS y fueron resuspendidos directamente en *cracking* buffer (62.5 mM Tris-HCl, 10% glicerol; 2% SDS; 1% BME; 0.002%; pH=6.8).

## **Análisis de proteínas**

### **Concentración de proteínas**

Para determinar la concentración proteica se utilizó la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976) por medio del uso de reactivos comerciales (Bio-rad) en microplacas de 96 pocillos (BD Falcon). La concentración se obtuvo por comparación con una curva de calibración de BSA, a través de la medición de la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (PHERAstar FS).

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis se llevó a cabo en un sistema *Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (Bio-Rad). Una alícuota de las muestras a analizar se desnaturizó por calentamiento a 95 °C durante 10 min. previa resuspensión en *cracking* buffer. Las corridas electroforéticas se realizaron en buffer de corrida (25mM Tris; 192 mM Glicina y 0.1% SDS; pH=8,3) a 150 V durante aproximadamente 75 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla de estándares de PM (*PageRuler™*;

Thermo Fisher). Los geles se utilizaron para realizar la técnica de WB o se tiñeron con 0.5% de azul de Coomasie R-250 (Sigma) disuelto en 30% metanol/10% ácido acético con agua destilada.

### **Western blot (WB)**

Realizada la electroforesis, el gel se equilibró en buffer de transferencia (25 mM Tris; 192 mM Glicina y 20% Metanol; pH=8.3). Luego, se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (Amersham™ Hybond, GE Healthcare), previamente hidratadas con metanol, en una cuba vertical (*Mini-PROTEAN® Tetra Cell*, Bio-Rad) en buffer de transferencia a 4 °C, aplicando un voltaje constante de 100 V durante 90 min. Finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con TTBS-leche (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.05% Tween20 y 5% leche en polvo descremada; pH=7.5) en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se incubó con una dilución del anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios se diluyeron en una solución de dilución de anticuerpos (1% BSA; 3% gelatina; 0.1% Tween20; 0.05% azida sódica; en PBS), según indicaciones del fabricante. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de la membrana y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (diluido en TTBS-leche según indicaciones del fabricante). Luego, se lavó la membrana 3 veces con TTBS y las bandas se revelaron utilizando una solución de luminol (0.88 mg/ml luminol; 0.066 mg/ml ácido p-cumárico; 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 100 mM Tris-HCl; pH=8.8). La señal de quimioluminiscencia fue registrada con el escáner *C-DiGit* (LI-COR), y la intensidad de las bandas fue cuantificada con el software ImageJ.

### **Ensayo de precipitación diferencial (PDif)**

La detección de Rap1 en su estado activo (unido a GTP) se realizó a través de ensayos de PDif empleando el dominio de unión a Rap1b de la proteína RalGDS (RBD) (De Rooij et al., 1998). Para la expresión en bacterias del RBD como proteína de fusión a glutatión S-transferasa (GST) se utilizó el vector pGEX(3X)-RalGDS-RBD. Para ello, lisados provenientes de bacterias *E. coli* sobreexpresando GST-RalGDS-RBD se

incubaron con 20 µg de una resina de agarosa-GSH durante 2 hs a 4 °C en agitación. Tras centrifugar a 2500 rpm durante 2 min. a 4 °C, el precipitado se lavó con PBS 2x. Posteriormente, células de mamífero (1x10<sup>6</sup> células) transfectadas con el vector pCGN-Rap1b (HA-Rap1b) fueron lisadas y el sobrenadante incubado con la resina agarosa-GSH unida a RalGDS-RBD por 16 hs a 4 °C. Seguidamente, se agregó *cracking* buffer y se calentó por 10 min. a 95 °C. Por último, las muestras fueron analizadas por WB.

### **Interacción entre proteínas CARPs**

Las proteínas se unieron previamente a la resina de agarosa correspondiente por incubación durante 2 hs a 4 °C en agitación. Luego, la resina se lavó e incubó con un lisado de *E. coli* sobreexpresando otro de los miembros de la familia de proteínas CARP, con una etiqueta distinta, por 1 hora a 4 °C. Se lavó con PBS y se eluyó con 0.5 M de imidazole (resina de NiNTA-agarosa) o 50 mM GSH (resina de GSH-agarosa). Finalmente, se sembraron los eluidos para ser analizados mediante WB.

### **Rastreo de condiciones óptimas de cristalización**

Se realizó un rastreo extensivo de condiciones de cristalización y las más promisorias fueron optimizadas para obtener cristales individuales y de buena difracción. Para el rastreo se realizó el método de difusión del vapor (configuración *Sitting drop*) utilizando los kits ProPlex™, MemGold™ y Morpheus® (Molecular Dimensions Ltd.), que cubren una gran variedad de agentes precipitantes (PEGs y sales) y pH.

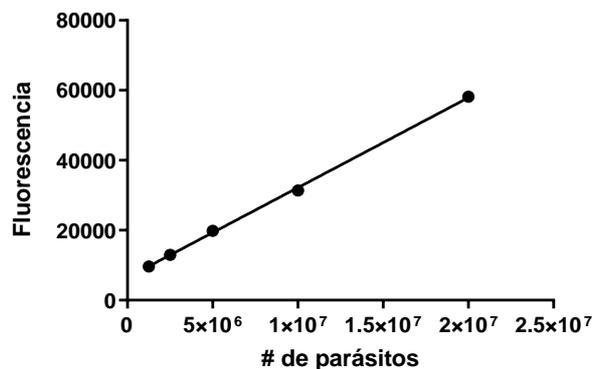
### **Técnicas de biología celular (*T. cruzi*)**

#### **Cuantificación de parásitos en cámara de Neubauer**

El recuento en cámara de Neubauer se realizó al microscopio óptico y el número de células totales se calculó por medio de la siguiente fórmula: células/ml = # de células promedio por cuadrante x factor de dilución x 10<sup>4</sup>.

### Cuantificación de parásitos por reducción de resazurina (Rz)

El ensayo de reducción de Rz utilizado en la cuantificación de epimastigotes y tripomastigotes se realizó de acuerdo a lo descrito por Rolón y col. (Rolón et al., 2006). Los epimastigotes se resuspendieron en PBS + 2% glucosa y se plaquearon en microplaca de 96 pocillos con fondo negro. A cada pocillo se le agregó Rz hasta una concentración de 0.15 mM y se incubó a 28 °C durante 3 hs. Para el caso de tripomastigotes liberados de cultivo celular, el sobrenadante de cada pocillo conteniendo los parásitos se centrifugó a baja velocidad para eliminar restos celulares, y luego se le agregó Rz hasta una concentración de 0.15 mM y se incubó a 37 °C durante 3 hs. Finalmente, se midió la fluorescencia a 595 nm en lector de microplacas (Optima Fluostar). En todos los casos se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado. La curva de calibración obtenida se muestra en la figura 25.



*Figura 25: Curva de calibración del método por reducción de resazurina.*

### Técnicas de biología celular (células de mamífero)

#### Ensayo de daño con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Para realizar el ensayo de daño o tolerancia al estrés oxidativo, epimastigotes se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS + 2% glucosa. Luego, se los incubó por 10 min. con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se lavaron con PBS, se resuspendieron en LIT 10% SFB y se cuantificaron según los métodos descritos anteriormente. Como

control se realizó el mismo procedimiento, pero sin el agregado de peróxido de hidrógeno.

### **Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

En los ensayos de IFI las formas celulares de *T. cruzi* se adhirieron a vidrios previamente tratados con 40 µg/ml de poli-D-lisina (Sigma), se fijaron con PBS-paraformaldehído 4% ("PBS-PFA"; Sigma), se lavaron con PBS y se incubaron con NH<sub>4</sub>Cl por 15 min. para disminuir la fluorescencia basal. Pasado ese tiempo, se permeabilizaron con 0.5% saponina o 0.2% Triton-x100 y se incubaron con anticuerpo primario a 4 °C. Luego de 16 hs, se lavaron con PBS, se incubaron con anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo (Alexa FLuor®488 o 594) y se tiñeron los núcleos con DAPI. Finalmente, los vidrios se montaron sobre portaobjetos con solución de montaje FluorSave™ (Merk Millipore). Los preparados se analizaron en el microscopio confocal Olympus FV1000 o en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600, según correspondiese.

### **Ensayo de invasión celular por *T. cruzi***

Las células hospedadoras se cultivaron por 24 hs sobre vidrios en una microplaca de 24 pocillos, a una densidad de 1-2x10<sup>4</sup> células/pocillo en DMEM con 10% SFB. Luego, las células se transfectaron o trataron, según correspondiese, se lavaron y se agregaron tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* (relación 100:1 parásitos:células) por 2 hs. Se removieron los parásitos y las células se incubaron por 48 hs en DMEM 10% SFB. Pasado ese tiempo, se lavaron nuevamente con PBS, se fijaron con PBS-PFA 4%, se tiñeron con 1 µg/ml de DAPI (4',6'diamidino-2-phenylindole) (Invitrogen) y los vidrios se montaron con el reactivo Mowiol (Calbiochem) para ser analizados en un microscopio Nikon Eclipse E600 acoplado a una cámara SPOT RTTM. El porcentaje de infección se calculó como (# células infectadas/células totales) x 100 y, además, se determinó el número de amastigotes cada 100 células. Se contaron 3000 células de cada tratamiento, a partir de fotos obtenidas de los experimentos, usando el programa ImageJ. El porcentaje de infección fue calculado en al menos 3 experimentos

independientes para cada droga o vector testeado y se analizó por ANOVA de 1 factor realizando el post-test de Dunnett. En ambos casos, el análisis fue realizado utilizando el programa Graph Pad Prism versión 8 (GraphPad Software, USA). Drogas utilizadas en ensayos de invasión: ESI-09 37.5  $\mu$ M (Sigma); 8-Br-AMPc 300  $\mu$ M (Biolog); PD98059 50  $\mu$ M.

### **Ensayo de liberación de tripomastigotes**

Las células se cultivaron y trataron como se describe en el punto anterior. Al cuarto día post infección (pi) se reemplazó el medio por medio fresco (SFB al 4%) y en los días 5-8 pi se contaron los tripomastigotes liberados en el sobrenadante de células infectadas usando el método por reducción de Rz (ver “[Cuantificación de parásitos](#)”).

### **Ensayo de citotoxicidad por tinción con cristal violeta**

Células de mamífero se cultivaron en una microplaca de 96 pocillos en una densidad de  $1-2 \times 10^4$  células/pocillo en DMEM 10% SFB. A las 24 hs se reemplazó el medio de cultivo por DMEM 5% SFB con los tratamientos correspondientes (drogas utilizadas en los ensayos de invasión) y se incubó por el tiempo correspondiente a cada tratamiento. Luego, se removió el medio de cultivo con los tratamientos, se realizó un lavado con PBS y las células se incubaron por 2 hs con DMEM 10% SFB. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y se fijaron por 10 minutos con metanol (Biopack) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los pocillos se lavaron con agua destilada y la placa se dejó secar a temperatura ambiente. Se agregó cristal violeta (Sigma) al 0.5% en metanol durante 20 min. para realizar la tinción. Pasado este tiempo, se realizaron exhaustivos lavados con agua y la placa se dejó secar durante 16 hs. Finalmente, a cada pocillo se le agregó 10% de ácido acético durante 30 min. y se determinó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro de placa (Glomax, Promega). Los datos se analizaron considerando como 100% de viabilidad el promedio de los pocillos en los que se sembraron células tratadas con 0.3% de DMSO, y se analizaron 3 experimentos independientes para cada droga testeada por ANOVA de 1 factor realizando el post-

test de Dunnett. En ambos casos, el análisis fue realizado utilizando el programa Graph Pad Prism versión 8 (GraphPad Software, USA) (ver [Anexo N° 5](#)).

### **Detección de ERK fosforilada (pERK)**

1x10<sup>6</sup> células se cultivaron en medio completo (10% SFB) a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se agregaron los tratamientos correspondientes durante el tiempo indicado: medio sin tripomastigotes (2 hs); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750 µM durante 5 min. (control positivo) y tripomastigotes de la cepa Y (moi 100:1) (2 hs). Luego, se lavaron con PBS y las células se incubaron con *cracking buffer* 2x directamente en el pocillo para ser analizadas por WB utilizando anticuerpos anti-ERK total, anti-pERK y anti-GAPDH (control de carga).

### **Consideraciones estadísticas**

Para cada experimento mencionado se realizaron al menos tres ensayos independientes, cada uno por triplicado. En los casos en los que se comparan dos grupos, las diferencias fueron analizadas con un test *t de student*. En los casos en los que se comparan tres o más grupos, las diferencias fueron analizadas con un ANOVA de 1 factor, y con el post-test de Dunnett.

### **Técnicas bioinformáticas**

#### **Búsqueda de secuencias**

La base de datos utilizada para la búsqueda de secuencias de *T. cruzi* fue *TriTrypDB*, y las secuencias utilizadas pueden encontrarse en la sección “[Anexo N° 1](#)” de esta tesis. El programa *BLAST* fue utilizado en la búsqueda de regiones de similitud entre secuencias o contra una base de datos de proteínas.

#### **Diseño de primers**

Los oligonucleótidos necesarios para amplificar las secuencias de las proteínas CARP desde ADN genómico de *T. cruzi* y realizar el clonado en los distintos vectores utilizados durante el desarrollo de la tesis se diseñaron utilizando distintos programas

bioinformáticos. Entre ellos, *OligoCalc* se utilizó para calcular las propiedades del oligonucleótido, *PrimerBlast* para comprobar la especificidad del mismo y *OligoAnalyzer™ Tool* para identificar posibles estructuras secundarias dentro de la secuencia o entre oligonucleótidos. La lista completa de los *primers* diseñados puede consultarse en la sección “Anexo N° 2”.

### Sitios y bases de datos utilizadas

**Prosite.** Base de datos de dominios de proteínas, familias y sitios funcionales, así como patrones y perfiles asociados para identificarlos.

**TrypTAG.** Proyecto que tiene como objetivo determinar dónde se localiza cada proteína de *T. brucei* dentro de la célula.

**ProtParam.** Herramienta que permite el cálculo de varios parámetros físicos y químicos de una secuencia proteica determinada. Los parámetros calculados incluyen el peso molecular, el pI teórico, la composición de aminoácidos, la composición atómica, el coeficiente de extinción, la vida media estimada, el índice de inestabilidad, el índice alifático y el gran promedio de hidropatía (GRAVY).

**Pfam.** Base de datos de familias de proteínas, cada una representada por múltiples alineamientos de secuencia y modelos ocultos de Markov (HMM).

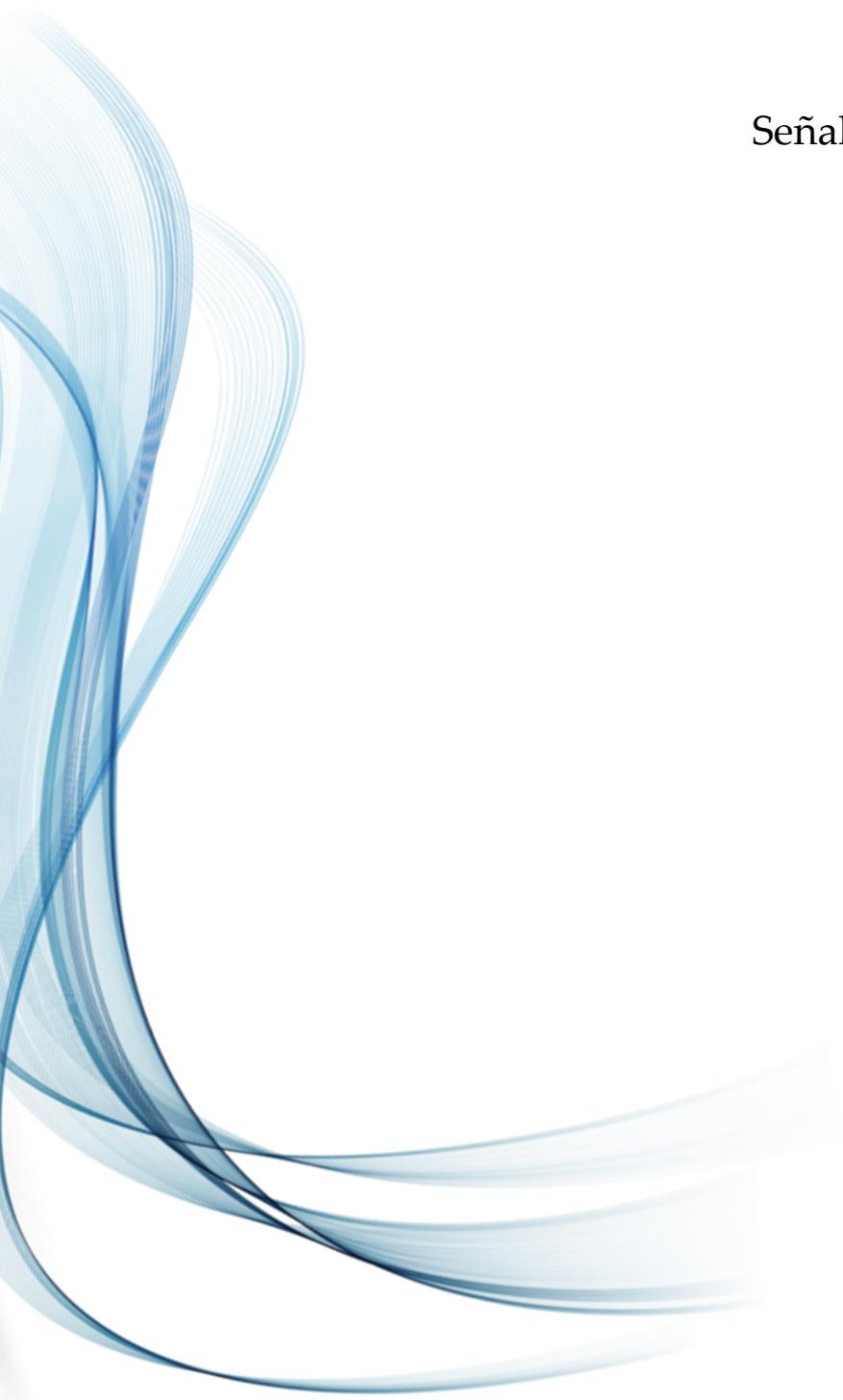
**Superfamily.** Base de datos de anotaciones estructurales y funcionales para todas las proteínas y genomas. Se basa en una colección de HMM, que representan dominios de proteínas estructurales a nivel de superfamilia SCOP. Una superfamilia agrupa dominios que tienen una relación evolutiva. La anotación se produce escaneando secuencias de proteínas de más de 2.478 genomas completamente secuenciados frente a HMM.

**Pondr.** Predictor de regiones desordenadas, definidas como proteínas completas o regiones de proteínas que carecen de una estructura terciaria fija.

**SymMap.** Base de datos que integra la medicina tradicional china con la medicina moderna a través del mecanismo molecular interno y el mapeo de síntomas externos (Wu et al., 2019).

**Herb.** Base de datos de alto rendimiento guiada por experimentos y referencias de la medicina tradicional china.

**HerbMed PRO®.** Base de datos de hierbas electrónica e interactiva que proporciona acceso con hipervínculos a los datos científicos que sustentan el uso de hierbas para la salud. Es un recurso de información basado en evidencia para profesionales, investigadores y público en general.



# Capítulo 1

Señalización mediada por AMPc  
durante la invasión de la  
célula hospedadora

# Capítulo 1: Señalización mediada por AMPc durante la invasión de la célula hospedadora

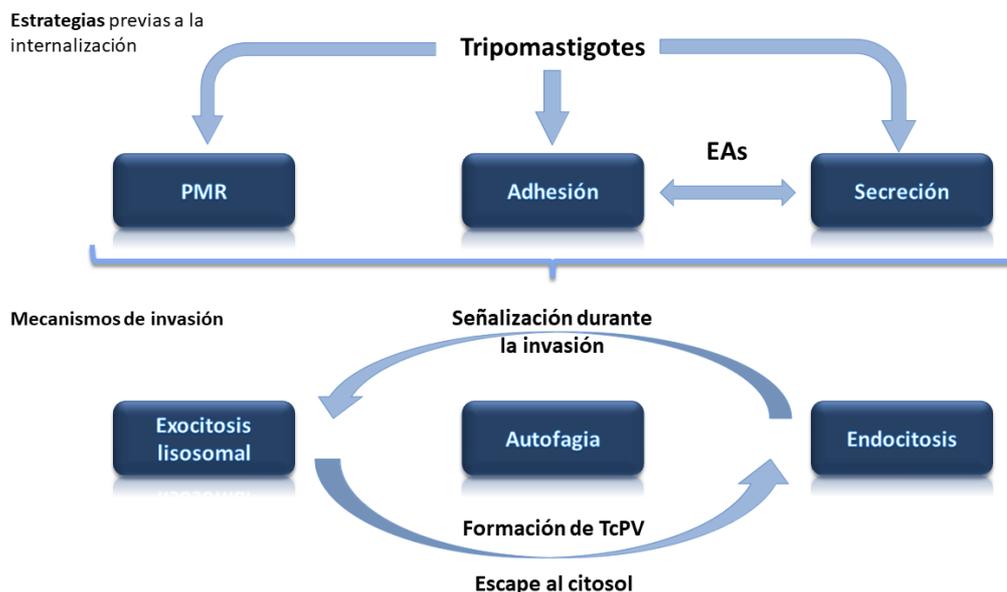
## La señalización durante la invasión

Una vez que los MTs ingresan al organismo, al tratarse de parásitos intracelulares obligados, despliegan una gran variedad de estrategias que facilitan su internalización dentro de la célula hospedadora. Al ingresar a la misma, los MTs residen inicialmente en la TcPV, de la cual escapan al citoplasma donde se diferencian a la forma amastigote. Luego de varias rondas de replicación, los amastigotes se diferencian a TCTs, que son liberados al torrente sanguíneo al lisis de la célula hospedadora. Adicionalmente, la ruptura prematura de células infectadas puede liberar amastigotes al medio extracelular (EAs), que también poseen la capacidad de infectar células vecinas.

Además de un ciclo de vida complejo, *T. cruzi* es un organismo notablemente heterogéneo, que presenta múltiples cepas con un alto grado de variabilidad genética (ver “DTUs”). Esta inmensa diversidad genética le permite reconocer e interactuar un gran número de receptores de superficie en las diferentes células hospedadoras, requisito fundamental para una invasión eficiente.

La invasión de *T. cruzi* se puede dividir en cuatro pasos principales: 1) reconocimiento y adhesión a la célula hospedadora, 2) internalización del parásito, 3) formación y maduración de la TcPV, y 4) escape al citosol (Ferri and Edreira, 2021). Durante los primeros dos pasos, *T. cruzi* despliega una batería de estrategias que preceden a la internalización y permiten el reconocimiento de la célula, la adhesión del parásito y la activación de las vías de señalización. Estas estrategias pueden estar mediadas por proteínas de superficie de *T. cruzi* que se unen a receptores en la célula hospedadora (Alba Soto and González Cappa, 2019), proteínas y moléculas

secretadas, incluidas microvesículas y exosomas (Borges et al., 2016; Watanabe Costa et al., 2016), y/o la ruptura mecánica de la membrana plasmática celular (PMR, por su sigla en inglés) (Fernandes and Andrews, 2012). Una vez activadas las vías de señalización en la célula hospedadora, los parásitos ingresan a la misma a través de diferentes mecanismos celulares, como el reclutamiento de lisosomas dependiente de  $Ca^{+2}$ , la endocitosis y la autofagia (Salassa and Romano, 2019) (Figura 26).



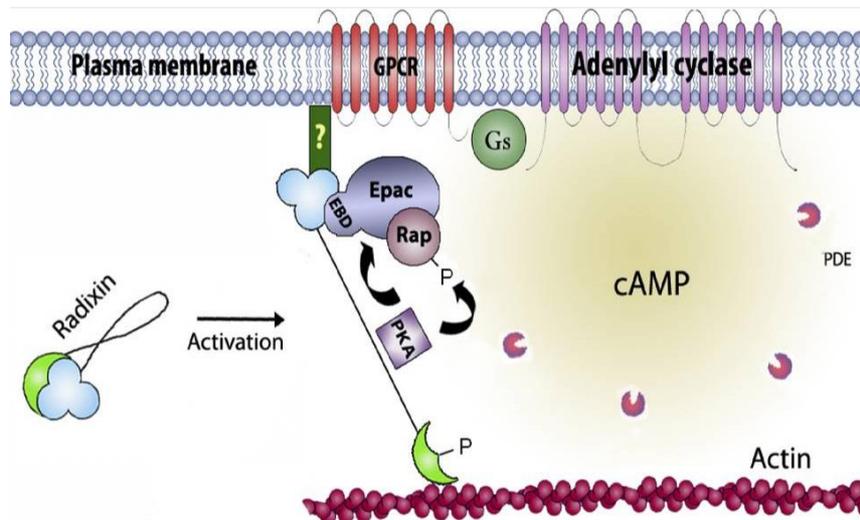
**Figura 26.** Estrategias y mecanismo de *T. cruzi* durante la invasión de la célula hospedadora.

Independientemente de la cepa, la etapa de desarrollo, el repertorio de moléculas superficiales y/o secretadas expresadas y las cascadas de señalización activadas en la célula hospedadora, todos los mecanismos de internalización conducen a la biogénesis de la TcPV (Batista et al., 2020).

### **Rol del AMPc en la célula hospedadora durante la invasión por *T. cruzi***

Uno de los mecanismos principales de invasión es a través del reclutamiento y fusión de lisosomas al sitio de entrada del parásito (Andrews, 1995). Se ha demostrado que *T. cruzi* induce la elevación de los niveles de AMPc en la célula hospedadora, y que el AMPc favorece la exocitosis lisosomal dependiente de  $Ca^{+2}$  y la invasión celular mediada por lisosomas (Rodríguez et al., 1999). Aunque el aumento transitorio de la

concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  y el reclutamiento de lisosomas al sitio de entrada son características comunes de la invasión de MTs y TCTs (Rodríguez et al., 1999; Martins et al., 2011), las vías de señalización que inducen estos parásitos en la célula hospedadora son distintas. Entre ellas, la activación de la señalización mediada por AMPc por parte de los TCTs es un proceso poco estudiado. La intervención farmacológica de la vía del AMPc fue capaz de modular la invasión parasitaria (Rodríguez et al., 1999; Fernandes et al., 2006) y se ha demostrado que las dos vías efectoras mencionadas, PKA y Epac, participan en eventos de exocitosis dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$  (Seino and Shibasaki, 2005). En nuestro laboratorio se demostró que Epac es el mediador principal de la invasión dependiente de AMPc en la célula hospedadora (Musikant et al., 2017). TCTs de la cepa CL Brener (TcVI) indujeron un aumento en los niveles de AMPc durante la invasión de células NRK, que fue acompañado por un mayor porcentaje de invasión. Sumado a esto, utilizando un conjunto de herramientas farmacológicas, que activan o inhiben selectivamente a los efectores PKA y Epac, se demostró que la activación diferencial de PKA no tuvo un efecto sobre la invasión del parásito, mientras que la invasión aumentaba significativamente cuando las células eran tratadas con un análogo del AMPc que activa exclusivamente a Epac. En concordancia, la inhibición farmacológica de Epac llevó a una disminución en la invasión (Musikant et al., 2017). Es interesante notar que, en contraste con lo esperado, la inhibición de PKA también mostró un aumento significativo en el porcentaje de invasión, sugiriendo una interconexión entre las vías dependientes de PKA y Epac. En efecto, se ha descrito que ambas proteínas pueden ser reclutadas al mismo microdominio por medio de la asociación con radixina (Hochbaum et al., 2011), una proteína estructural del grupo de proteínas ERM que une la membrana plasmática al citoesqueleto de actina cortical (Figura 27) (McClatchey, 2014).



**Figura 27.** Radixina, una proteína ERM que une la membrana plasmática al citoesqueleto de actina cortical, recluta ambos efectores del AMPc (Epac y PKA) en un compartimento donde se expresa la AC. Epac1, a través de su dominio EBD (“DEP”), se une al dominio Nt de radixina; mientras que la PKA se recluta a través de una región helicoidal anfipática similar a AKAP. De Hochbaum y col. (2011).

Estudios de microscopía confocal han demostrado que las proteínas ERM se asocian con el sitio de invasión de EAs, donde colocan con F-actina (Ferreira et al., 2017). Recientemente, se comprobó el vínculo entre radixina y la vía dependiente de AMPc-Epac durante la invasión con TCTs al bloquear la invasión en células NRK con un péptido permeable de 15 aminoácidos que abarca el dominio DEP de Epac. Este péptido desplaza a la proteína Epac de su asociación con radixina en la membrana plasmática y la deslocaliza de su microdominio. En estas condiciones, el porcentaje de invasión es similar al obtenido cuando se inhibe la proteína Epac por el fármaco ESI-09 (Musikant et al., 2017). En su conjunto, estos resultados establecieron un rol crucial para Epac durante la invasión. Sin embargo, no se conocen las proteínas efectoras que son activadas por Epac durante la invasión por *T. cruzi*. Rap1, un miembro de la vía AMPc/Epac, fue localizado en endosomas y lisosomas tardíos (Pizon et al., 1994), y su activación mediada por Epac ha sido descrita durante la exocitosis regulada en espermatozoides humanos (Miro-Moran et al., 2012), la secreción de insulina (Tengholm and Gylfe, 2017) y la liberación de amilasa pancreática (Sabbatini et al., 2008). En cardiomiocitos, la vía AMPc/Epac/Rap1 estimula la liberación de  $Ca^{+2}$  a

través de los receptores de rianodina (RyR) modulando el mecanismo de excitación-contracción. A su vez, en células musculares lisas, Rap1 inhibe la actividad de RhoA y promueve la desensibilización de  $\text{Ca}^{+2}$  y la relajación del músculo liso. La activación de Rap1 induce la hiperpolarización muscular al disminuir la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la apertura de canales  $\text{K}^{+}$  sensibles a  $\text{Ca}^{+2}$ , impulsando la vasodilatación (Kosuru and Chrzanowska, 2020). Además, Rap1 modula quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), en particular ERK1/2 (“quinasa regulada por señales extracelulares”, por su sigla en inglés), induciendo la estimulación o inhibición de estas quinasas según el tipo celular. Recientemente, se demostró el papel de Rap1 en la fosforilación y activación de ERK en músculo liso (Li et al., 2018). Por otro lado, Ral-GDS, un efector de Rap1, promueve la autofagia de cardiomiocitos (Rifki et al., 2013), y el efector río abajo de Ral-GDS, RalB, une subunidades específicas de la maquinaria de exocitosis, y media la activación del ensamblaje del autofagosoma (Bodemmann et al., 2011).

En suma, el músculo liso y el corazón son los órganos blanco más importantes para la infección y persistencia de *T. cruzi* durante la fase crónica, siendo la CCC la manifestación clínica más grave y potencialmente mortal de esta enfermedad (ver “Aspectos clínicos”). Por lo tanto, si consideramos que (1) Epac tiene un papel crítico en la regulación de diversas funciones dependientes de AMPc en el músculo liso y en el corazón, posiblemente modulando la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la activación de Rap1 y la participación de ERK1/2 (Ruiz-Hurtado et al., 2013; Lezoualc’H et al., 2016; Kosuru and Chrzanowska, 2020), y (2) que existe una gran variedad de terapias que tienen como objetivo a la señalización mediada por AMPc (Parnell et al., 2015), lo que valida esta vía como potencial blanco para la terapia de Chagas; entonces la caracterización de efectores de esta vía de señalización ayudaría a comprender los mecanismos mediados por AMPc y proporcionaría un atractivo conjunto de nuevos blancos terapéuticos para el reposicionamiento de drogas ya utilizadas en los tejidos mencionados, o bien para el desarrollo de nuevas drogas antiparasitarias.

## Hipótesis y objetivos

El AMPc regula eventos de exocitosis y secreción, siendo Epac uno de sus principales efectores. A su vez, interviene en el reclutamiento de lisosomas al sitio de entrada del parásito y en la formación de la TcPV; mientras que, miembros de la vía, incluido Rap1, fueron localizados en endosomas/lisosomas tardíos y participan en la exocitosis en diferentes tejidos. Por otra parte, Rap1, junto a ERK1/2, modula la liberación de calcio en dos tejidos considerados de gran relevancia en la enfermedad de Chagas: el músculo liso y el cardíaco. De este modo, planteamos la hipótesis de que la vía de AMPc/Epac/Rap1 está involucrada en el establecimiento de la infección por *T. cruzi*.

**Hipótesis:** la vía AMPc/Epac/Rap1 es requerida durante la invasión de la célula hospedadora por *T. cruzi*.

**Objetivo general:** elucidar los mecanismos de invasión mediados por AMPc/Epac durante la invasión de la célula hospedadora por *T. cruzi* y evaluar potenciales roles terapéuticos de esta vía de señalización.

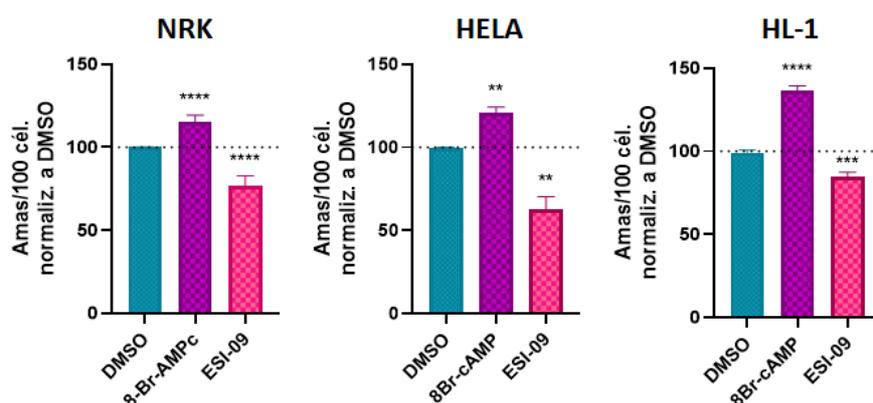
### Objetivos específicos:

1. Comprobar la activación de la vía AMPc-Epac por parte de *T. cruzi* en diferentes líneas celulares.
2. Determinar la participación de Rap1b en la señalización mediada por AMPc.
3. Evaluar el rol de la fosforilación de Rap1b dependiente de PKA.
4. Evaluar la activación de la vía MEK/ERK durante la invasión.
5. Examinar potenciales efectores de Rap1b durante la invasión de *T. cruzi*.
6. Evaluar la vía AMPc/Epac/Rap1b como potencial blanco terapéutico.

## Resultados

### 1. Epac como mediador de la invasión dependiente de AMPc

Desde hace tiempo se conoce que *T. cruzi* induce un aumento en los niveles intracelulares de AMPc que potencia la exocitosis lisosomal dependiente de  $Ca^{+2}$  y la invasión celular (Rodríguez et al., 1999). Recientemente, se demostró el rol esencial de Epac durante la invasión de células NRK por *T. cruzi* (Musikant et al., 2017). Para profundizar el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la invasión mediada por AMPc y evaluar la universalidad de esta vía, se decidió comprobar este rol en otras líneas celulares y determinar los efectores que participan durante la invasión río abajo de AMPc/Epac. A través de ensayos de invasión celular (ver “Ensayo de invasión”) se demostró que, al igual de lo que sucede en células NRK, altos niveles de AMPc, inducidos a partir del 8-Br-AMPc (análogo permeable no hidrolizable del AMPc que activa las vías de señalización de dicho nucleótido en la célula hospedadora), modulan positivamente la invasión por *T. cruzi* tanto en células HELA como en HL-1. Consistentemente con este resultado, la inhibición farmacológica específica de Epac resultó en una disminución significativa en la invasión en ambas líneas celulares (Figura 28).

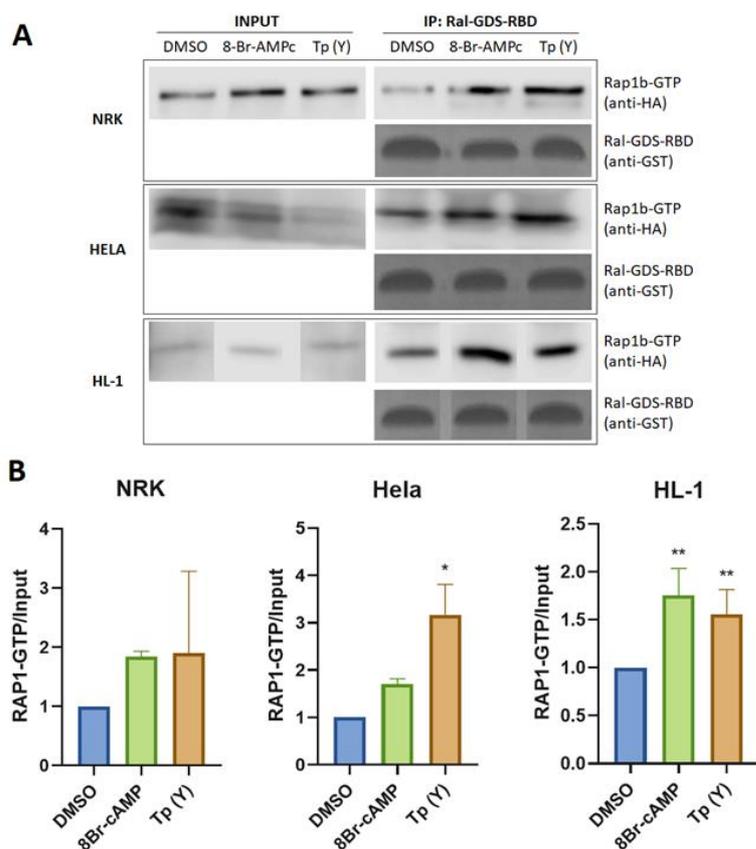


**Figura 28.** La vía AMPc-Epac es requerida durante la invasión de *T. cruzi* en diferentes líneas celulares. Ensayos de invasión en células NRK, HELA o HL-1 pretratadas con 8-Br-AMPc o ESI-09. Las células se lavaron e infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y (moi 100:1). Luego de 48 hs, se fijaron y tiñeron con DAPI, y el n° de amastigotes fue determinado utilizando un microscopio de fluorescencia. La invasión en células pretratadas con DMSO fue considerada como basal. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ ; ANOVA y post test de Dunnett.

## 2. Rap1b como mediador de los eventos de señalización del AMPc

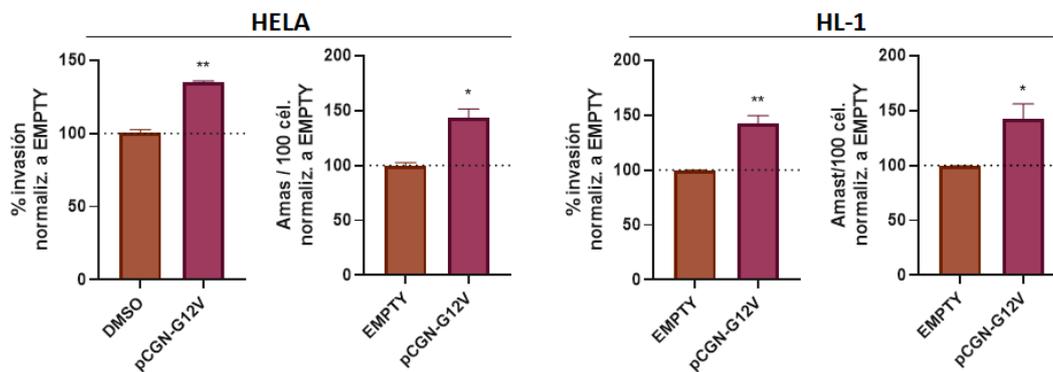
Establecida la participación de la vía AMPc/Epac1 en las líneas celulares estudiadas, se analizó si durante la invasión por *T. cruzi* existía una activación de Rap1b, uno de los efectores principales de Epac en células de mamífero. Para lograr este objetivo se utilizaron distintas estrategias:

En primer lugar, se realizó un ensayo de PDif (ver “Ensayo de precipitación diferencial”). Para ello, se incubaron células transfectadas con HA-Rap1b en presencia de 8-Br-AMPc o tripomastigotes de la cepa Y (Tp Y) durante 2 hs. Luego, las células se lisaron y se realizó el ensayo de PDif con una resina de glutatión-agarosa previamente incubada con GST-RalGDS-RBD, una proteína de fusión que posee el dominio de unión a Rap1 de su efector RalGDS. La resina se lavó y eluyó con *cracking* buffer para el análisis por WB (ver Anexo N° 4). Como se observa en la figura 29, se detectó una mayor cantidad de Rap1b activo (Rap1b-GTP) en lisados de células infectadas y en células pretratadas con el análogo permeable del AMPc (8-Br-AMPc), respecto al control con DMSO, tanto en células HELA como en HL-1.

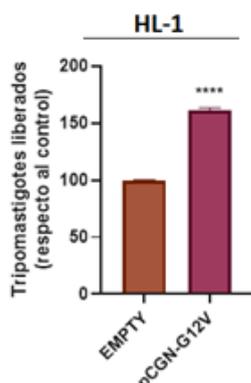


**Figura 29.** Rap1b como mediador de los eventos de señalización del AMPc. Células transfectadas con el vector pCGN-S179 (HA-Rap1b wt) se pretrataron con DMSO, 8-Br-AMPc o tripomastigotes de la cepa Y (moi 100:1) durante 2 hs. Luego, se lisaron y los lisados se sometieron a ensayo de Pdif utilizando una resina de agarosa-GST-Ral-GDS-RBD. (A) Los niveles de Rap1b activo (unido a GTP) se determinaron mediante WB. (B) Las intensidades de las bandas se cuantificaron con el programa ImageJ y normalizaron contra el Input. Los datos representan la media  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ; ANOVA y post-test de Dunnett.

Una segunda estrategia fue la de evaluar la invasión en células previamente transfectadas con una mutante constitutivamente activa de Rap1b (Rap1b-G12V). En línea con lo observado anteriormente, la invasión aumentó significativamente en células transfectadas con Rap1b-G12V, en comparación con el control (vector vacío o “EMPTY”) (Figura 30). Además, se analizaron los tripomastigotes liberados (ver “[Ensayo de liberación de tripomastigotes](#)”) al día 6 pi y, consistentemente, se observó un mayor número de tripomastigotes liberados en el sobrenadante de células infectadas que sobreexpresaban la mutante constitutivamente activa de Rap1b respecto a aquellas células que no lo hacían (“EMPTY”) (Figura 31).

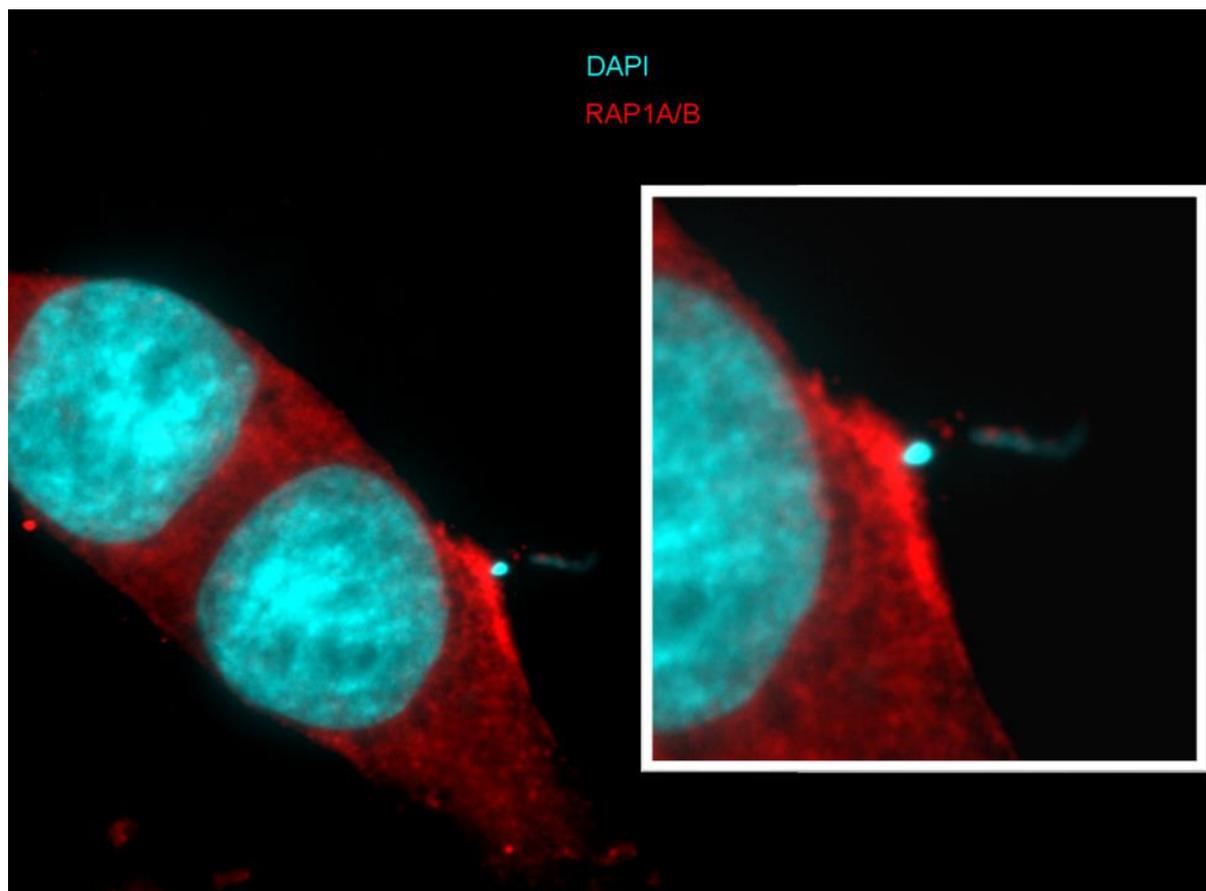


**Figura 30.** Rap1b-GTP modula la invasión de *T. cruzi* en diferentes líneas celulares. Ensayos de invasión en células HELA o HL-1 transfectadas con el vector pCGN-G12V (HA-Rap1b-G12V). Las células se lavaron e infectaron con tripomastigotes de la cepa Y (moi 100:1). Luego de 48 hs, se fijaron y tiñeron con DAPI, y el n° de amastigotes y el porcentaje de invasión fue determinado utilizando un microscopio de fluorescencia. La invasión en células transfectadas con vector vacío (pCGN) fue considerada como basal. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ; ANOVA y post-test de Dunnett.



**Figura 31.** Células HL-1 transfectadas con pCGN-G12V se infectaron según protocolo de invasión (ver “[Ensayo de liberación de tripomastigotes](#)”). Al cuarto día después de la infección (pi) se reemplazó el medio por medio fresco (SFB al 4%) y en el día 8 pi se analizó la cantidad de tripomastigotes liberados en el sobrenadante de células infectadas usando el método por reducción de resazurina (ver “[Cuantificación de parásitos](#)”). Los tripomastigotes liberados en el sobrenadante de células transfectadas con vector vacío (pCGN) fueron considerados como 100%. Los datos representan la media  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; *t* de student test.

En concordancia con lo observado, al analizar los eventos de invasión por microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce Rap1, se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia de esta proteína en el sitio de contacto del parásito con la célula hospedadora (Figura 32).



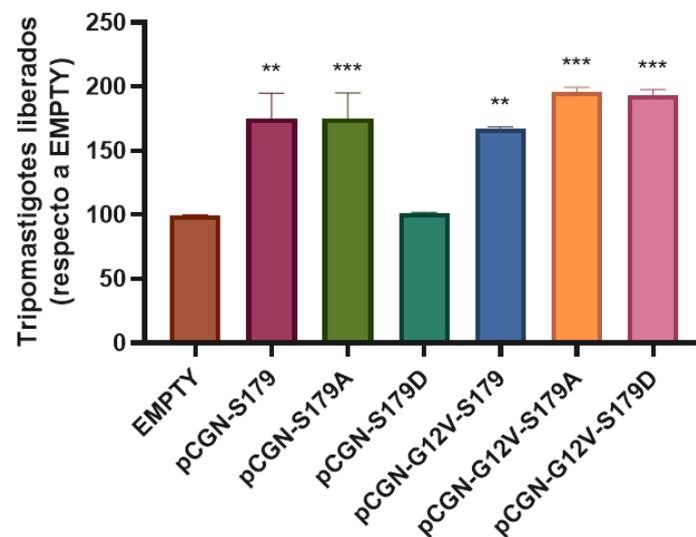
**Figura 32.** Inmunofluorescencia de células HL-1 incubadas con *Tp* Y utilizando un anticuerpo primario contra la proteína Rap1 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa594. Las fotos fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus). Se muestra sólo una imagen representativa.

Estos resultados demuestran que Rap1b-GTP es requerido como mediador de la vía AMPc/Epac1 durante la invasión por *T. cruzi*.

### 3. Rol de la fosforilación de Rap1b dependiente de PKA

Con el objetivo de evaluar el rol de la fosforilación de Rap1b dependiente de PKA, se infectaron células HL-1 previamente transfectadas con una mutante fosfo-mimética

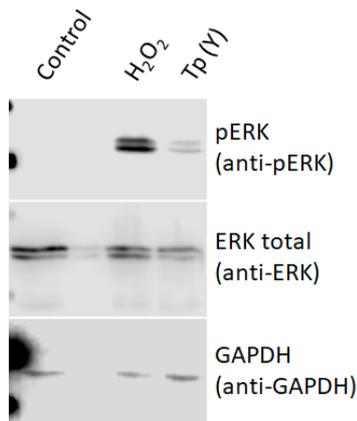
(S179D) o fosfo-deficiente (S179A) de Rap1b y se realizó un ensayo de liberación de tripomastigotes. Mientras que no se observó un cambio en el número de tripomastigotes liberados al día 6 pi en el caso de células transfectadas con la mutante fosfo-mimética (S179D), en el caso de los cultivos celulares transfectados con S179A, G12V, G12V-S179A y G12V-S179D se observó un aumento del número de tripomastigotes liberados con respecto al control (Figura 33).



**Figura 33.** Rol de la fosforilación de Rap1b dependiente de PKA. Células HL-1 transfectadas con los vectores indicados se infectaron según protocolo de invasión (ver “Ensayo de liberación de tripomastigotes”). Al día 2 y 4 pi se reemplazó el medio por medio fresco (SFB al 4%) y en el día 6 pi se analizó la cantidad de tripomastigotes liberados en el sobrenadante de células infectadas usando el método por reducción de resazurina (ver “Cuantificación de parásitos”). Los tripomastigotes liberados en el sobrenadante de células transfectadas con vector vacío (pCGN) fueron considerados como 100%. Los datos representan la media  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ; ANOVA y post-test de Dunnett.

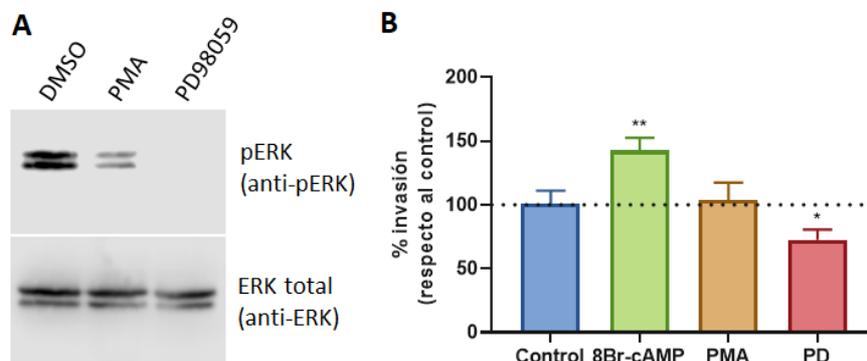
#### 4. Participación de la vía MEK/ERK durante la invasión de *T. cruzi*

Con el fin de dilucidar la participación de MEK/ERK en la invasión dependiente de AMPc, se evaluó la activación de ERK1/2 mediante WB (ver “Detección de ERK fosforilada”). En ensayos de invasión con Tp Y se observó una inducción de la fosforilación de ERK1/2 tanto en células NRK (Figura 34) como en HL-1 (datos no mostrados), lo que corrobora la activación de ERK durante el proceso de invasión.



**Figura 34.** Fosforilación de ERK. Las células (NRK o HL-1) fueron incubados por 2 hs con tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* (Tp) o  $H_2O_2$  750  $\mu M$  por 5 min. (control positivo). Luego, las células se lisaron y los lisados se analizaron por WB. Se muestra un análisis representativo en células NRK. GAPDH: control de carga.

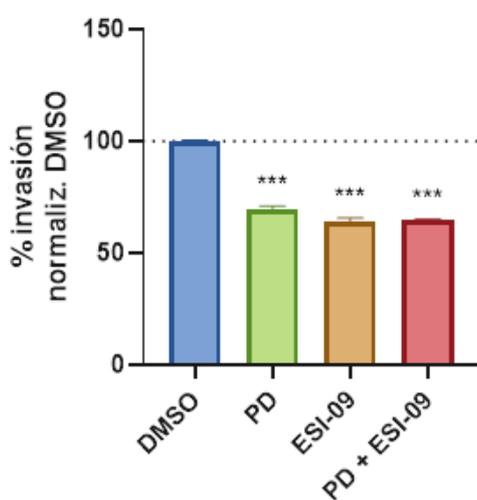
Para determinar si esta activación de ERK1/2 modula los niveles de invasión, se infectaron células pretratadas con PD (PD98059), un compuesto que inhibe la quinasa MEK1/2. En paralelo, se evaluó la participación de la proteína quinasa C (PKC), otro posible efector de la vía del AMPc, por medio de la utilización del compuesto PMA, un activador de esta quinasa. Brevemente, células NRK se incubaron por 30 minutos con las drogas mencionadas, se lavaron y se infectaron con Tp Y por 2 hs (moi 100:1). Se removieron los parásitos y las células se incubaron por 48 hs. Luego se lavaron, fijaron, tiñeron y se calculó el porcentaje de invasión. Como puede observarse en la figura 35, la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 produjo una disminución significativa de la invasión, en tanto que la activación de la PKC no produjo diferencias significativas con respecto al control, lo que podría traducirse en que esta última vía no estaría involucrada en la invasión.



**Figura 35.** La inhibición de la fosforilación de ERK modula los niveles de invasión. (A) WB de lisados celulares incubados con las drogas mencionadas (B) Ensayos de invasión en células NRK pretratadas por 30 minutos con el tratamiento indicado. El ensayo de invasión se realizó según protocolo descrito anteriormente. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ; ANOVA y post test de Dunnett.

## 5. ERK como efector río abajo de la invasión mediada por Epac

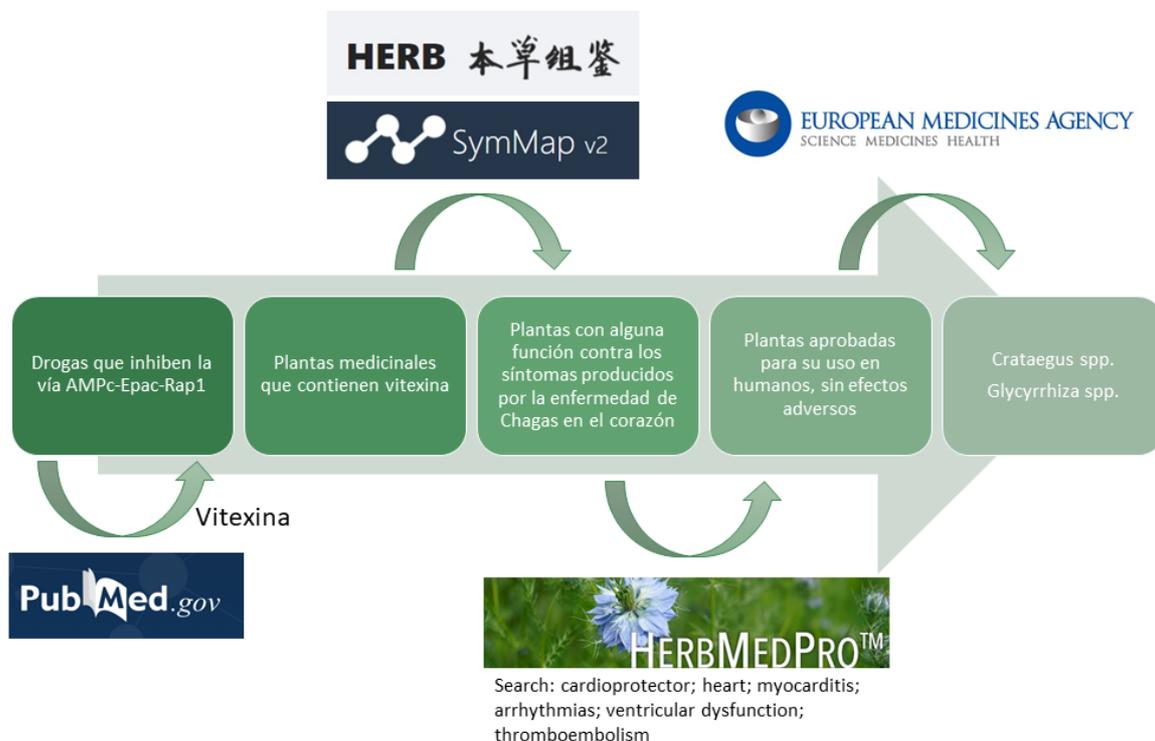
Para establecer si MEK/ERK y Epac/Rap1b son efectores de la misma vía de señalización se realizó la co-inhibición de Epac1 y ERK1/2, y se evaluó el porcentaje de invasión. La inhibición de MEK1/2 indujo un descenso similar en la invasión al que se produjo cuando se inhibió específicamente a la proteína Epac1 (ESI-09), y no se observaron efectos aditivos o sinérgicos cuando se inhibieron ambas proteínas simultáneamente (Figura 36); sugiriendo que ERK1/2 es un efector río abajo de la invasión mediada por Epac1.



**Figura 36.** ERK es un efector río abajo de la invasión mediada por Epac. Ensayos de invasión en células NRK pretratadas por 30 minutos con el tratamiento indicado. El ensayo de invasión se realizó según protocolo descrito anteriormente. La invasión en células pretratadas con DMSO fue considerada invasión basal. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*\*\*  $p < 0.001$ ; ANOVA y post test de Dunnett.

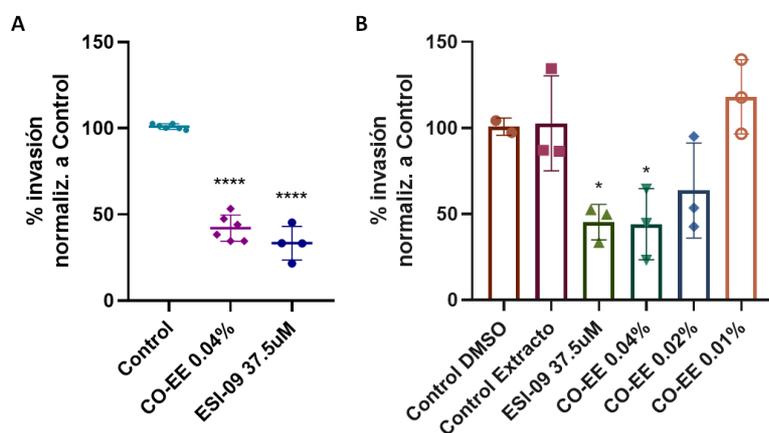
## 6. AMPc/Epac/Rap1b como potencial blanco terapéutico

A partir de una búsqueda bibliográfica encontramos que la vitexina actuaría inhibiendo la expresión de las proteínas Epac y Rap1 (Che et al., 2016; Yang et al., 2021). Analizando bases de datos de hierbas medicinales que contengan vitexina (Herb, SymMap) y cruzando estos datos con hierbas aprobadas para su uso en humanos y que protegen contra los síntomas producidos por la enfermedad de Chagas, encontramos que plantas del género *Crataegus spp.*, conocidas tradicionalmente como majuelo o espino blanco, resultaron de gran interés como potencial tratamiento contra esta enfermedad (Figura 37).



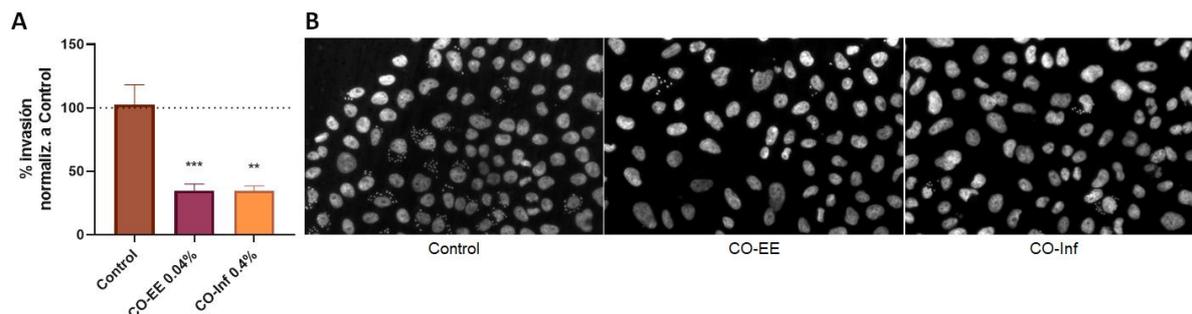
**Figura 37.** Estrategia utilizada en la búsqueda de hierbas medicinales que actúen inhibiendo la vía AMPc-Epac-Rap1b y protejan contra los síntomas de la enfermedad de Chagas.

El análisis por HPLC-HRMS y MS<sup>2</sup> confirmó la presencia de vitexina en el extracto hidroalcohólico de *C. oxyacantha* (CO-EE), así como de otros flavonoides ya reportados para la especie previamente (Elsadig Karar and Kuhnert, 2016). El pretratamiento de células HELA con CO-EE produce un efecto dosis-dependiente sobre la invasión de *T. cruzi* comparable al del inhibidor de Epac1 (ESI-09) (Figura 38).



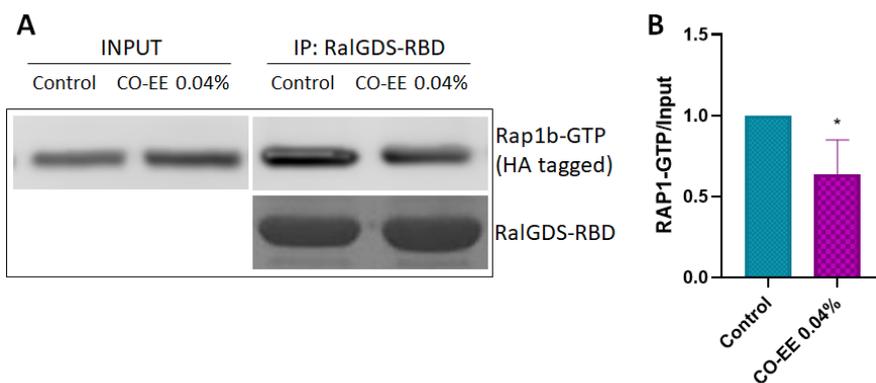
**Figura 38.** Ensayos de invasión en células HELA pretratadas por 1 h con el tratamiento indicado (CO-EE: extracto hidroalcohólico de *C. oxyacantha*). El ensayo de invasión se realizó según protocolo descrito anteriormente. La invasión en células pretratadas con DMSO fue considerada invasión basal. Los datos representan la media  $\pm$  SD de seis (A) o tres (B) experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ANOVA y post test de Dunnett.

A su vez, células pretratadas con una infusión de partes aéreas de la planta *C. oxyacantha* (CO-Inf) mostraron niveles de invasión similar al obtenido pretratando con CO-EE (Figura 39).



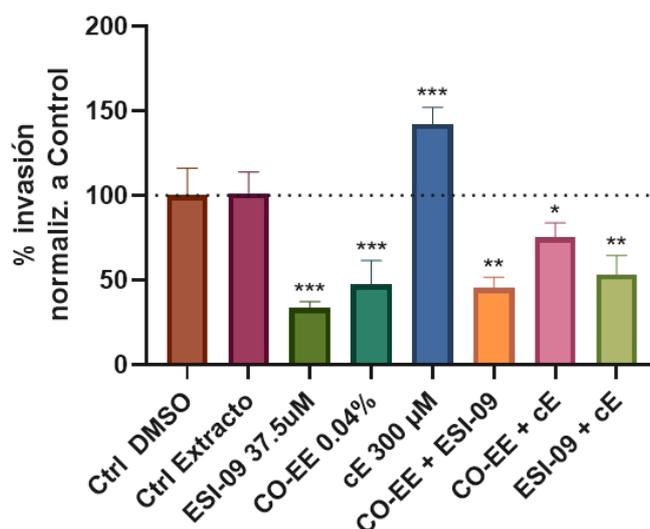
**Figura 39.** (A) Ensayo de invasión en células HELA pretratadas por 1 hora con el tratamiento indicado (CO-Inf: Infusión de la planta *C. oxyacantha*). El ensayo de invasión se realizó según protocolo descrito anteriormente. La invasión en células pretratadas con DMSO fue considerada invasión basal. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ANOVA y post test de Dunnett. (B) Imágenes representativas de las infecciones realizadas con los tratamientos indicados.

Por otra parte, en experimentos de precipitación diferencial en células tratadas con el extracto se detectó una menor cantidad de Rap1b-GTP (Figura 40).



**Figura 40.** Rap1b como mediador de los efectos de CO-EE. Células HELA transfectadas con el vector pCGN-S179 (HA-Rap1b wt) se pretrataron por 1 hora con los tratamientos indicados. Luego, se lisaron y los lisados se sometieron a ensayo de PDif utilizando una resina de agarosa-GST-Ral-GDS-RBD. (A) Los niveles de Rap1b activo (unido a GTP) se determinaron mediante WB. (B) Las intensidades de las bandas se cuantificaron con el programa ImageJ y normalizaron contra el Input. Los datos representan la media  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*  $p < 0.05$ ; t de student.

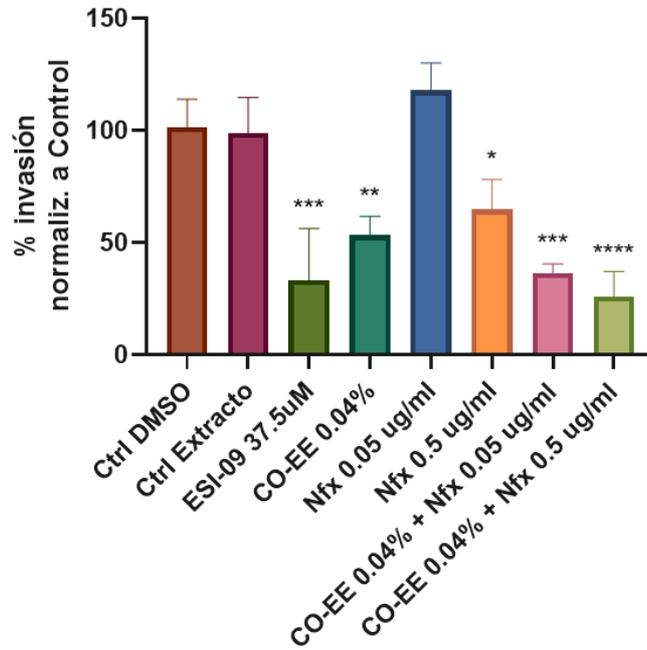
Al co-incubar las células con el inhibidor de Epac y el extracto de *C. oxyacantha* (CO + ESI-09) no se produjeron efectos aditivos. Sumado a esto, el tratamiento con CO-EE o ESI-09 en conjunto con el activador de Epac (cE) produjo una inhibición comparable en ambos casos (Figura 41).



**Figura 41.** CO-EE actuaría mediante la vía de señalización AMPc/Epac. Ensayo de invasión en células HELA pretratadas por 1 hora con los tratamientos indicados. El ensayo de invasión se realizó según protocolo descrito anteriormente. La invasión en células pretratadas con DMSO o Ctrl Extracto fueron consideradas invasión basal. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ANOVA y post-test de Dunnett.

En suma, estos resultados sugerirían fuertemente que CO-EE actuaría mediante la vía de señalización Epac/Rap1b.

Finalmente, en ensayos de invasión en células pretratadas con CO-EE y luego incubadas por 48 hs con o sin Nfx se observó una adición de los efectos sobre el porcentaje de invasión (Figura 42), confirmando vías de acción distintas y abriendo la posibilidad de un co-tratamiento para la inhibición de la invasión.



**Figura 42.** Ensayo de invasión en células HELA pretratadas por 1 hora con Ctrl, ESI-09 o CO-EE. Las células se lavaron e infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y (moi 100:1). Los Tp se retiraron y se incubaron con DMSO o Nfx por 48 hs. Luego se lavaron, fijaron y tiñeron con DAPI, y el porcentaje de invasión fue determinado utilizando un microscopio de fluorescencia. La invasión en células pretratadas con DMSO o Ctrl Extracto fue considerada invasión basal. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ANOVA y post test de Dunnett.

## Discusión

La invasión de la célula hospedadora por *T. cruzi* es un proceso complejo si se tienen en cuenta las diferentes DTUs, el gran número de moléculas de superficie/secretadas, el tropismo celular y las vías de señalización involucradas. La evolución de este parásito le ha proporcionado herramientas moleculares diversas que aseguran su capacidad de infección y evasión del sistema inmune (Shao et al., 2019; Ferri and Edreira, 2021). A pesar de poder infectar potencialmente cualquier célula nucleada, se ha demostrado que *T. cruzi* exhibe cierto tropismo celular (Santi-Rocca et al., 2017) y que las vías de señalización involucradas difieren según el estadio del ciclo celular (Maeda et al., 2012). En este contexto, se ha reportado que la activación de vías de señalización mediadas por AMPc desencadenan la exocitosis lisosomal dependiente de  $Ca^{+2}$  y promueven la invasión de la célula hospedadora por parte de *T. cruzi* (Rodriguez et al., 1999). La liberación de  $Ca^{+2}$  de los compartimentos celulares, como el retículo endoplasmático, es acompañada de una activación de la fosfolipasa C (PLC) y una elevación de los niveles intracelulares del AMPc. En células de mamíferos, efectores del AMPc, PKA y Epac, están involucrados en eventos de exocitosis activados por  $Ca^{+2}$  (Seino and Shibasaki, 2005). Además, los miembros de esta última vía, incluido Rap1, se han localizado en endosomas/lisosomas tardíos (Pizon et al., 1994), y la activación de Rap1 mediada por Epac ha sido identificada en la exocitosis regulada en espermatozoides humanos (Miro-Moran et al., 2012), la secreción de insulina (Tengholm and Gylfe, 2017) y la liberación de amilasa pancreática (Sabbatini et al., 2008). En nuestro laboratorio se demostró que la señalización mediada por Epac1 representa el mecanismo principal para la invasión dependiente de AMPc por *T. cruzi* (Musikant et al., 2017). Además, dentro de las proteínas involucradas en la internalización de los parásitos, se encuentran las proteínas ERM, que son esenciales para la función y arquitectura de la corteza celular al unir la membrana plasmática al citoesqueleto de actina subyacente (McClatchey, 2014). Estas proteínas se han asociado con la invasión de EAs de *T. cruzi* (Ferreira et al., 2017) y, en estudios de

microscopía confocal, se demostró que las proteínas ERM se reclutan en el sitio de invasión de EAs donde colocalizan con F-actina, mientras que su depleción inhibe la invasión en células HELA (Ferreira et al., 2017). Cabe destacar que uno de sus integrantes, radixina, se identificó como una unidad de andamiaje para los efectores del AMPc en la regulación espacial de la señalización mediada por Epac1/Rap1 (Gloerich et al., 2010; Hochbaum et al., 2011). Con relación a esto último, nuestro trabajo evidenció un vínculo entre la invasión de TCTs mediada por Epac1 y radixina, al bloquear la invasión luego de pretratar células NRK con un péptido permeable de 15 aminoácidos que abarca el dominio mínimo de unión a ERM de Epac (Musikant et al., 2017).

Con el objetivo de elucidar el rol de efectores río abajo del AMPc involucrados en la invasión por *T. cruzi*, se evaluó la activación de la vía AMPc/Epac por parte de TCTs de la cepa Y (DTU II) sobre las líneas celulares NRK, HELA y HL-1 (Figura 28). Las células NRK son fibroblastos provenientes de riñón de rata que fueron utilizados por primera vez en el establecimiento del AMPc como modulador de los eventos de invasión (Rodriguez et al., 1999) y en nuestro laboratorio al demostrar la participación de Epac1 como el efector principal de esa modulación (Musikant et al., 2017). Por otro lado, las células HELA son células epiteliales provenientes de cuello uterino humano que han sido ampliamente utilizadas en ensayos de invasión celular (Clemente et al., 2016; Ferreira et al., 2019; Rodrigues et al., 2019) y las células HL-1, utilizadas anteriormente en ensayos de invasión (Benatar et al., 2015), son cardiomiocitos provenientes de corazón de ratón, uno de los órganos blanco más importante en la infección y persistencia de *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos demuestran que la activación de la vía AMPc/Epac por parte de TCTs de *T. cruzi* ocurre independientemente del origen (rata, ratón, humano) o del tipo celular (riñón, cuello uterino, corazón) que el parásito esté invadiendo. Una vez demostrada la activación de la vía AMPc/Epac, nos propusimos investigar la participación de Rap1b en la invasión mediada por Epac1. Se sabe que Rap1b, GTPasa

de la familia de Ras, integra eventos dependientes de Epac y/o PKA para lograr una transducción eficiente de la señal del AMPc (Hochbaum et al., 2008; Jaśkiewicz et al., 2018; Kosuru and Chrzanowska, 2020). En el presente trabajo, se detectó una mayor proporción de Rap1b-GTP en lisados de células infectadas mediante experimentos de precipitación diferencial, a través de la interacción específica con un dominio de unión a proteínas de la familia de Rap en su estado activo (GST-RalGDS-RBD) (Figura 29). Asimismo, células transfectadas con la forma constitutivamente activa de Rap1b (G12V) fueron más susceptibles de ser invadidas en comparación con el control (Figura 30), observándose también un mayor número de tripomastigotes liberados al sobrenadante de estas al día 6 pi (Figura 31). En concordancia, se observó un reclutamiento de Rap1b en el sitio de entrada del parásito (Figura 32).

Por otra parte, al estudiar la participación de PKA utilizando un inhibidor específico de esta quinasa, se observó que el porcentaje de invasión de TCTs aumentaba respecto al control (Musikant et al., 2017), sugiriendo un efecto antagonista dependiente de PKA. Este efecto podría estar mediado por la fosforilación por parte de PKA de alguno de los efectores de la vía AMPc/Epac1/Rap1b, ya que tanto Epac como Rap1b son potenciales blancos de esta quinasa. En el caso de Epac, resultados preliminares obtenidos en el laboratorio de nuestro colaborador, el Dr. Daniel Altschuler, mostraron que la fosforilación dependiente de PKA en la serina en posición 11 (S11) de Epac desacopla su compartimentalización junto a radixina (datos no mostrados). Sumado a esto, ya ha sido establecida la fosforilación dependiente de PKA en S179 de Rap1b (Altschuler and Lapetina, 1993). Los resultados presentados en este trabajo avalarían el efecto antagonista de PKA a través de, al menos, la fosforilación de Rap1b, ya que el número de tripomastigotes liberados al día 6 pi disminuye en células transfectadas con una mutante fosfo-mimética de Rap1b (S179D) respecto a células que sobreexpresan Rap1b *wt* o una mutante fosfo-deficiente (S179A) (Figura 33). En sintonía con estas observaciones, es interesante notar que la fosforilación de Rap1b sería capaz de desestabilizar la asociación con la membrana

plasmática y promover la inactivación de Rap1b (Ntantie et al., 2013; Takahashi et al., 2013). De acuerdo con lo expuesto, en el presente trabajo se demostró que la activación de Rap1b es requerida durante la invasión de TCTs como mediadora de la vía AMPc/Epac1 y que, durante la invasión, dicha proteína se relocaliza al sitio de entrada del parásito. Sin embargo, en ensayos de invasión de células que expresan una mutante constitutivamente activa y fosfo-mimética (G12V-S179D) de Rap1b, se observó que la activación constitutiva de Rap1b anula el efecto negativo de la fosforilación en S179 sobre la invasión (Figura 33). Este resultado indicaría que Rap1b es requerido en la forma fosforilada e inactiva para anular completamente la vía AMPc/Epac/Rap1b y que esta regulación, como se mencionó anteriormente, podría ocurrir a través de la inactivación por fosforilación dependiente de PKA de Epac. En este sentido, futuros estudios con mutantes dominantes negativas de Rap1b (N17, N17-S179A y N17-S179D) y fosfo-mimética/deficiente de Epac (S11A y S11D) contribuirán a dilucidar la participación de PKA en la invasión por *T. cruzi*.

Establecida la participación de Rap1b en la invasión por TCTs de *T. cruzi*, nuestros esfuerzos se volcaron en determinar otros efectores de la vía del AMPc, y su relación con la vía Epac1/Rap1b. Se ha descrito que la vía MEK/ERK puede ser activada o inhibida por AMPc (Stork and Schmitt, 2002) y que participa en la invasión a través de su activación por medio de la interacción de la célula hospedadora con moléculas de superficie del parásito, como TS (Chuenkova and Pereira, 2001), Tc85 (Magdesian et al., 2007) o TSSAII (Cánepa et al., 2012). A su vez, Rap1 se asocia con la fosforilación y activación de ERK1/2 en músculo liso (Li et al., 2018). En línea con estos resultados, nuestros datos revelan que TCTs de *T. cruzi* inducen la fosforilación de ERK1/2 en células de mamífero (Figura 34), que ERK1/2 participa en la invasión de estos parásitos (Figura 35), y que esta participación sería río abajo de Epac1/Rap1b (Figura 36).

Pese a que el aumento transitorio de la concentración de  $Ca^{+2}$  citosólico y el reclutamiento de lisosomas que ocurren durante la invasión son características compartidas entre MTs y TCTs (Rodríguez et al., 1999; Martins et al., 2011), las vías de

señalización desencadenadas por ambas formas de parásitos en la célula hospedadora son distintas. En TCTs, la activación de ERK1/2 es una característica de la invasión mediada por la exocitosis lisosomal dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la regulación de F-actina, y por medio de la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) (Onofre et al., 2019). En MTs, en cambio, la PKC promueve la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de compartimentos sensibles a inositol 3-fosfato (IP3) a través de la unión de la glicoproteína de superficie gp82 al receptor LAMP-2 durante la invasión (Maeda et al., 2012; Onofre et al., 2021). La actividad de PKC no es necesaria para la invasión de TCTs en células NRK, ya que el tratamiento con inhibidores de PKC no afecta la respuesta a  $\text{Ca}^{+2}$  o la reorganización de F-actina, y no tiene efecto sobre la internalización de los parásitos (Rodríguez et al., 1995). De acuerdo con esto, nuestros resultados con un compuesto activador de PKC (PMA) confirman que esta vía no está involucrada en la invasión de TCTs de *T. cruzi* (Figura 35). La diferencia entre las vías de señalización desencadenadas por MTs y TCTs puede asociarse con el hecho de que la internalización de los TCTs se inicia por la invaginación de la membrana plasmática (Woolsey et al., 2003), en un proceso dependiente de la exocitosis lisosomal generada por una lesión de la membrana y la activación del mecanismo PMR (Fernandes et al., 2011), con cambios que ocurren a través de la inhibición de la vía de señalización Rho/Rho por medio de PKA (Woolsey and Burleigh, 2004; Mott et al., 2009). El hecho de que RhoA promueva la polimerización de actina, pero tenga un efecto negativo en la internalización de EAs durante la invasión de células HELA (Bonfim-Melo et al., 2018b), y que Rap1b inhibe la actividad de RhoA/ROCK en músculo liso (Lakshmikanthan et al., 2014), permite sugerir la hipótesis de que la vía de señalización AMPc/Epac1/Rap1b podría activarse en los primeros pasos de la invasión por *T. cruzi*, promoviendo la exocitosis lisosomal dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y la reorganización del citoesqueleto. Una vez que el parásito se encuentra dentro de la célula, una inhibición de Epac/Rap1b mediada por PKA podría ser necesaria para la retención del parásito dentro de la célula. En concordancia con esta hipótesis, nuestros resultados demuestran que Rap1b se asociaría a la membrana plasmática en el sitio de

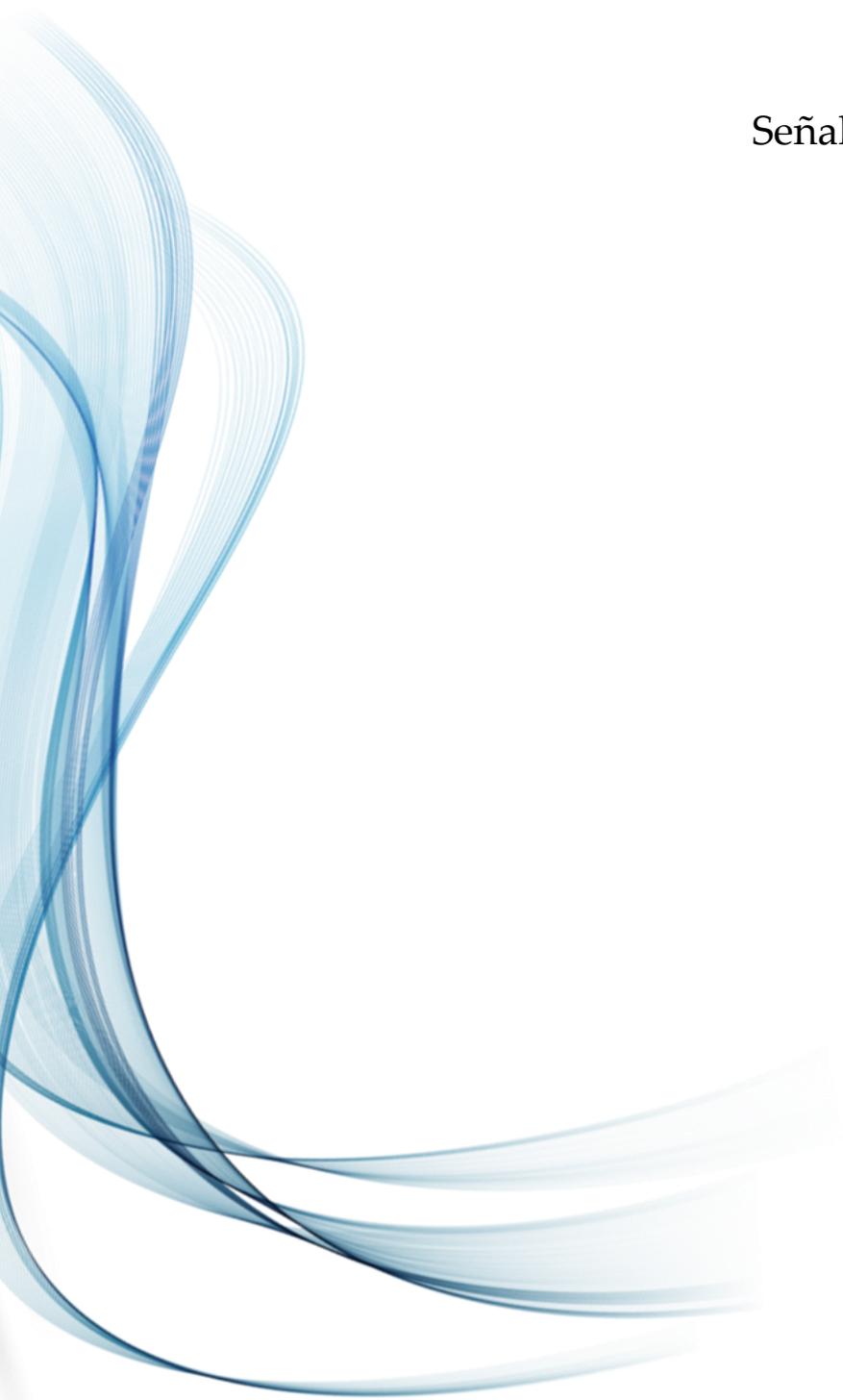
ingreso del parásito (Figura 32), donde sería requerido durante el proceso de internalización (Figura 29-31) y que PKA tendría un efecto antagonista a través de la fosforilación de S179 de Rap1b (Figura 33).

Por último, se evaluó la posibilidad de utilizar la inhibición de la vía AMPc/Epac/Rap1b como blanco terapéutico. Como se ha visto, la manifestación más frecuente entre los pacientes que desarrollan síntomas en la etapa crónica es la cardiopatía de Chagas crónica ([CCC](#)). La CCC se considera una miocardiopatía arritmogénica, caracterizada por arritmias auriculares y ventriculares y una amplia variedad de anomalías del sistema conductor (Nunes et al., 2018). En un modelo de cultivo en 3D de cardiomiocitos infectados con *T. cruzi* se observó la presencia de fibrosis e hipertrofia (Adesse et al., 2008; Calvet et al., 2012) y, además, se registró un aumento en la frecuencia de taquiarritmias utilizando medio proveniente de un cultivo de células VERO infectadas, sugiriendo que las proteínas secretadas por *T. cruzi* tienen la capacidad de potenciar las arritmias, probablemente aumentando los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular (Rodríguez-Angulo et al., 2013). A su vez, la activación de Epac mediada por AMPc es necesaria para la estimulación de la liberación de  $Ca^{+2}$  inducida por  $Ca^{+2}$  a través de los receptores de rianodina (RyR) en cardiomiocitos (Oestreich et al., 2007), mientras que la depleción de Epac1 protege contra el daño miocárdico por isquemia-reperfusión (I-R), reduciendo el tamaño del infarto y la apoptosis celular (Fazal et al., 2017). En relación a esto, la vitexina (un compuesto flavonoide derivado de productos naturales que protege contra el daño por I-R) actuaría inhibiendo la expresión de las proteínas Epac y Rap1, impidiendo la apoptosis mediada por mitocondrias (Yang et al., 2021). La vitexina se encuentra presente en una gran variedad de hierbas utilizadas tradicionalmente en medicina alternativa. En particular, plantas del género *Crataegus*, conocidas vulgarmente como majuelo, espino albar o espino blanco, resultan de gran interés debido a su uso altamente documentado como cardioprotectores (Figura 37) (Popovic-Milenkovic et al., 2014; Rastogi et al., 2016; Cuevas-Durán et al., 2017; Saoudi et al., 2019). Nuestros

resultados muestran que el extracto hidroalcohólico de *C. oxyacantha* (CO-EE) otorga protección contra la invasión de *T. cruzi* en células HELA (Figura 38). Esta inhibición de la invasión podría deberse a la acción del extracto sobre Epac/Rap1b, como sugieren los datos obtenidos: (1) el pretratamiento de las células produjo el mismo efecto en la invasión de *T. cruzi* que el inhibidor de Epac1 (ESI-09) (Figura 38), (2) en las células tratadas con CO-EE se detectó una disminución de la activación de Rap1b (Figura 40), y (3) al inhibir Epac junto con el extracto no se observaron efectos aditivos (Figura 41). Por otro lado, al utilizar CO-EE en conjunto con Nfx observamos una adición de los efectos sobre la invasión, confirmando que ambas drogas actuarían sobre blancos diferentes y abriendo la posibilidad de disminuir las dosis/tiempos del Nfx, lo cual contribuiría a evitar efectos tóxicos del mismo, como también el costo del tratamiento *per cápita* de la enfermedad (Figura 42). Además, el hecho de que CO-EE se utiliza para tratar patologías cardíacas a través de sus propiedades antioxidantes y antiarrítmicas, entre otras (Wang et al., 2013), le otorga a esta hierba medicinal características únicas en el potencial tratamiento de esta enfermedad, pudiendo evitar la propagación de *T. cruzi* en el tejido mientras que se tratan los síntomas producidos por este parásito en el corazón. A su vez, la vía MEK/ERK, potencial efector río abajo de Epac/Rap1, también regula la hipertrofia y se ha asociado con el desarrollo de insuficiencia cardíaca (Bueno and Molckentin, 2002), aunque algunos modelos sugieren un papel protector y anti-apoptótico en el corazón (Kehat and Molckentin, 2010). Es sabido que las vías de señalización también se manipulan para evitar la apoptosis (Stahl et al., 2014), como puede ser el caso de esta vía. En conjunto, la desregulación de la vía Epac/Rap1 en tejidos cardíacos de personas infectadas durante la fase crónica de la enfermedad podría desencadenar los síntomas característicos de la CCC por un lado, y la activación de la vía MEK/ERK podría ayudar al establecimiento de una infección eficiente y persistente por otro, al asegurar la integridad celular. Descifrar los mecanismos de señalización del AMPc activados por *T. cruzi* proporcionará una visión más profunda de los mecanismos de invasión de la célula hospedadora mediados por este nucleótido cíclico. Teniendo en cuenta que

existe una gran variedad de terapias que tienen como objetivo a la señalización mediada por AMPc (Parnell et al., 2015), revelar los actores de la vía AMPc/Epac1/Rap1b podría proporcionar un conjunto atractivo de nuevos blancos terapéuticos para el reposicionamiento o el desarrollo de drogas antiparasitarias contra la enfermedad de Chagas.

En conclusión, con el objetivo de elucidar los mecanismos de invasión por *T. cruzi*, se ha logrado demostrar que la vía AMPc/Epac/Rap1b es requerida durante la invasión de la célula hospedadora, y que este efecto sería regulado negativamente por PKA posiblemente a través de la fosforilación de Epac y Rap1b.



## Capítulo 2

Señalización mediada por AMPc

en el ciclo de vida de

*T. cruzi*

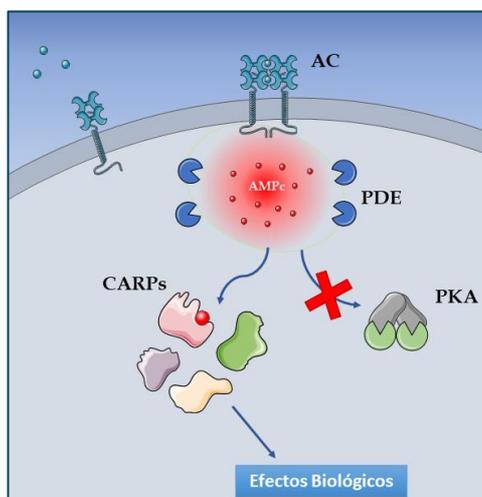
## Capítulo 2: Señalización mediada por AMPc en el ciclo de vida de *T. cruzi*

### La señalización del AMPc en *T. cruzi*

Al transitar entre dos hospedadores, *T. cruzi* se enfrenta a múltiples y diversos ambientes, alternando estadios extracelulares e intracelulares. Entre el insecto vector y el mamífero hospedador este parásito atraviesa cambios de temperatura (26°C a 37°C), de osmolaridad (600-1000 mOsm a 300 mOsm), de pH (5.0 a 7.0), de tipo/disponibilidad de nutrientes y diferentes mecanismos de defensa (Schoijet et al., 2019). A pesar de eso, ha logrado adaptarse principalmente por medio del reconocimiento de señales extracelulares a través de la activación de múltiples cascadas de transducción. Entre ellas, la vía de señalización dependiente del AMPc resulta de particular interés debido a las diferencias que presenta con respecto a la vía de señalización canónica, presente en mamíferos. Esta particular vía de señalización ofrece componentes esenciales, ausentes en el hospedador mamífero, que pueden ser potenciales blancos para el desarrollo de nuevas drogas antiparasitarias. *T. cruzi* posee ACs, PDEs y PKA, pero con estructuras y/o funciones distintas de las que se observan en células de mamífero. Sumado a esto, algunos miembros de la cascada canónica están completamente ausentes o han sido reemplazados por proteínas exclusivas del parásito (Figura 43).

En primera instancia, en el genoma del parásito no se han encontrado secuencias codificantes para GPCRs. En su lugar, las ACs de *T. cruzi* contienen un dominio N-terminal extracelular que podría actuar como receptor y un dominio C-terminal catalítico altamente conservado que cataliza la síntesis del AMPc en el interior celular (Gould and de Koning, 2011). Estas proteínas poseen un solo paso transmembrana y su actividad depende de la dimerización de su dominio catalítico (Naula et al., 2001).

A su vez, en *T. cruzi*, se ha descrito la presencia de una AC activada por calcio en el filamento paraflagelar (PFR) (D'Angelo et al., 2002), mientras que en *T. brucei* existe otro grupo de ACs que están involucradas en un proceso conocido como "motilidad social" (Lopez et al., 2015) y que responden a pH (Shaw et al., 2021). En el caso de las PDEs, los tripanosomátidos codifican cuatro isoformas (PDE-A a C), de las cuales tres han sido descritas en *T. cruzi*. TcPDEA1 es resistente a los inhibidores típicos de células de mamífero y se localiza en el citosol (Schoijet et al., 2019), mientras que TcPDEB2 contiene dos dominios GAF y se asocia fuertemente al flagelo (D'Angelo et al., 2004). Por otra parte, TcPDEC contiene dos alelos (TcPDEC1 y 2). TcPDEC1 puede hidrolizar AMPc y GMPc (Wang et al., 2012); mientras que TcPDEC2 es específica del AMPc y presenta un dominio FYVE que asocia a la fosfodiesterasa a membranas enriquecidas en fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P). Además, TcPDEC2 se localiza en el CVC y participa en la osmorregulación (Schoijet et al., 2011). Muchos estudios han demostrado que las PDEs son esenciales para la supervivencia de los tripanosomátidos por lo que han sido objeto de blanco de drogas en reiteradas ocasiones (Wang et al., 2012; Sebastián-Pérez et al., 2018; De Araujo et al., 2020). En relación a los efectores del AMPc, no existen secuencias para CICs o Epac (El-Sayed et al., 2005); y llamativamente, a diferencia de lo que ocurre en otros organismos eucariotas, se ha demostrado que la PKA de tripanosomátidos es incapaz de unir o activarse por AMPc, y que sería activada por GMPc (Shalaby et al., 2001) o por un mensajero secundario alternativo (Bachmaier et al., 2019).



**Figura 43.** Representación esquemática de la señalización dependiente de AMPc en tripanosomátidos. AC: adenililciclase, PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc, PDE: fosfodiesterasa, CARP: proteína de respuesta a AMPc.

El rol esencial del AMPc en el ciclo de vida del parásito (Makin and Gluenz, 2015; Tagoe et al., 2015; Salmon, 2018) junto con la ausencia de una PKA activada por este nucleótido cíclico y de secuencias para otros efectores canónicos (Epac y CICs), sugieren fuertemente la existencia de efectores no tradicionales del AMPc en estos organismos. En este sentido, utilizando un inhibidor de TcPDEB1 y 2 (CpdA) en *T. brucei*, se identificaron una serie de proteínas que se denominaron “proteínas de respuesta al AMPc” (CARP) como potenciales efectores del nucleótido. En este trabajo, por medio de una biblioteca de ARN de interferencia (ARNi) de genoma completo, se encontraron mutantes resistentes al inhibidor CpdA que eran capaces de sobrevivir al aumento de los niveles intracelulares del AMPc producidos por la inhibición de las PDEs. De esta forma, se identificó una familia de cuatro proteínas (CARP1 a 4), de las cuales solo CARP1 posee un dominio de unión al AMPc (CBD) (Gould et al., 2013). Es interesante notar que aun cuando solo CARP1 posee un CBD, la delección de cualquiera de estas cuatro proteínas afecta la vía de señalización de este nucleótido (Gould et al., 2013), confirmando que todas las CARP representarían componentes esenciales de una novedosa vía de señalización del AMPc en tripanosomátidos. De esta forma, CARP1 sería responsable del reconocimiento de la señal mientras que CARP2-4 podrían ser efectores río abajo de la vía AMPc/CARP1, o miembros esenciales de un complejo macromolecular que transduce la señal del nucleótido cíclico. En línea con estos resultados, se encontraron secuencias correspondientes a TcCARP1-4 en el genoma de *T. cruzi* y se comprobó que TcCARP1, ortólogo de CARP1 de *T. brucei*, era capaz de unir AMPc (Jäger et al., 2014). Además, es importante señalar que la evidencia experimental mostró que TcCARP1 y TcCARP3 presentan un aumento significativo durante la invasión de la célula hospedadora (Li et al., 2016), especialmente en cepas virulentas del parásito (Belew et al., 2017). El alto grado de divergencia entre la señalización del AMPc en tripanosomátidos y mamíferos, y el hecho de que las proteínas CARP solo se encuentran en los kinetoplastos, hace de esta vía una excelente fuente de nuevos blancos moleculares para el desarrollo de fármacos antiparasitarios.

## Hipótesis y Objetivos

Se ha demostrado que el AMPc juega un papel crucial en el ciclo de vida de *T. cruzi*, y que está involucrado en muchos procesos biológicos esenciales, como la proliferación (Rangel-Aldao et al., 1987, 1988), la diferenciación (Hamedi et al., 2015) y la osmorregulación (Rohloff et al., 2004). A pesar de los estudios detallados en ACs y PDEs del parásito, los componentes río abajo de esta vía y sus funciones biológicas son aún desconocidos. Asimismo, la evidencia experimental mostró que TcCARP1 y TcCARP3 serían importantes durante la invasión (Li et al., 2016). De esta forma, las proteínas CARP se muestran como potenciales blancos de drogas relevantes por ser esenciales y por pertenecer a proteínas únicas de kinetoplastidos.

**Hipótesis:** las proteínas CARP son proteínas efectoras del AMPc con un rol esencial durante el ciclo de vida de *T. cruzi*.

**Objetivo general:** Caracterización bioquímica y validación funcional de las proteínas CARP de *T. cruzi*.

### Objetivos específicos:

1. Obtener y caracterizar epimastigotes transgénicos para las proteínas TcCARP.
  - 1.1. Evaluar efectos de las TcCARP sobre el crecimiento del parásito.
  - 1.2. Determinar su localización subcelular.
  - 1.3. Determinar el rol de las TcCARP durante el estrés oxidativo.
2. Expresar y purificar las proteínas TcCARP en bacterias.
  - 2.1. Identificar interactores de las proteínas TcCARP.
  - 2.2. Determinar la estructura tridimensional de las proteínas CARP.

## Antecedentes

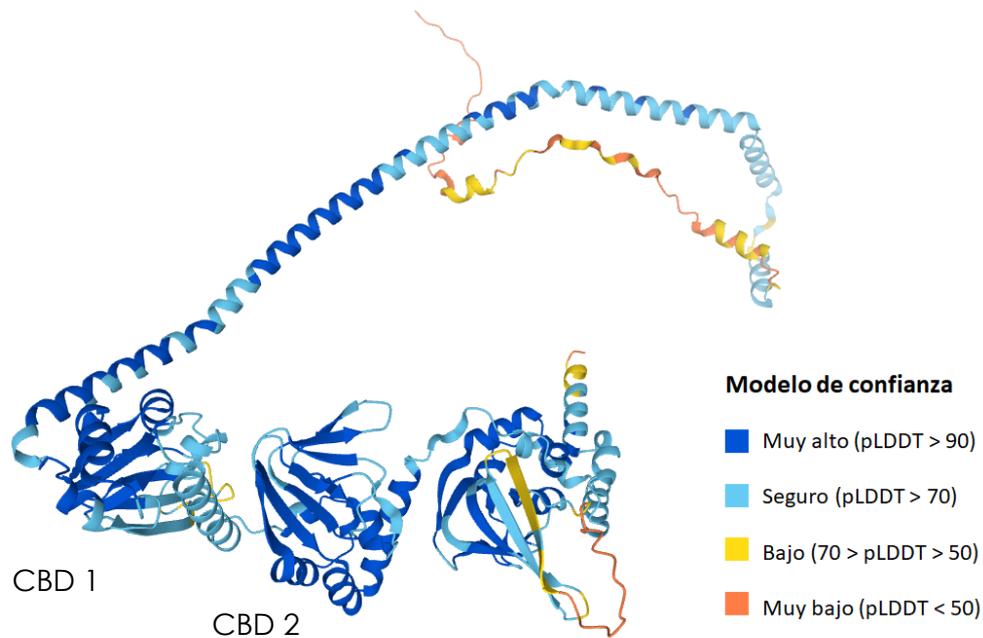
### TcCARP1

En el genoma de CL Brener, cepa de referencia, la proteína TcCARP1 posee dos isoformas (Figura 44), TcCLB.508523.80 (CL Brener Non-Esmeraldo-like) y TcCLB.507035.110 (CL Brener Esmeraldo-like) (base de datos: [TriTrypDB](#)), siendo TcCLB.507035.110 la isoforma más larga y dominante en otros genomas del parásito. A los fines prácticos, en este trabajo se las denominara  $\Delta$ Nt-CARP1 (TcCLB.508523.80) y CARP1-FL (TcCLB.507035.110), respectivamente.



**Figura 44.** Esquema de las secuencias anotadas para la proteína CARP1 en el genoma de CL Brener Non-Esmeraldo-like ( $\Delta$ Nt-CARP1) y en el genoma de CL Brener Esmeraldo-like (CARP1-FL). cNMP: dominio de unión a nucleótido cíclico (CBD) detectado por medio de la base de datos Pfam.

Utilizando la herramienta [ProtParam](#), que calcula computacionalmente el peso molecular, pI teórico, composición de aminoácidos, composición atómica, coeficiente de extinción y la vida media estimada, entre otros parámetros; se determinó que  $\Delta$ Nt-CARP1 tiene 480 aminoácidos y un peso molecular estimado de 54 kDa, con un pI teórico de 7.08; mientras que CARP1-FL tiene 708 aminoácidos y un peso molecular estimado de 80 kDa, con un pI teórico de 8.59. En su región idéntica, ambas contienen dos dominios de unión a nucleótidos cíclicos (CBDs), de los cuales el dominio más cercano a la región N-terminal une AMPc de manera específica (Jäger et al., 2014). En consecuencia, la evidencia de *T. brucei* y *T. cruzi* apoya la idea de que TcCARP1 podría tener un papel como sensor primario del AMPc en una vía independiente de PKA, confirmando la presencia de otros efectores de AMPc no canónicos biológicamente activos en *T. cruzi*. En la figura 45 se puede observar una representación de un modelo de TcCARP1 predicho por AlphaFold® (Jumper et al., 2021).



**Figura 45.** Representación de un modelo de la proteína CARP1 de *T. cruzi* predicho por el programa AlphaFold®. La confianza del modelo se ilustra utilizando la puntuación de la prueba de diferencia de distancia local prevista (pLDDT), indicada por el código de colores. CBD: dominio de unión a nucleótido cíclico.

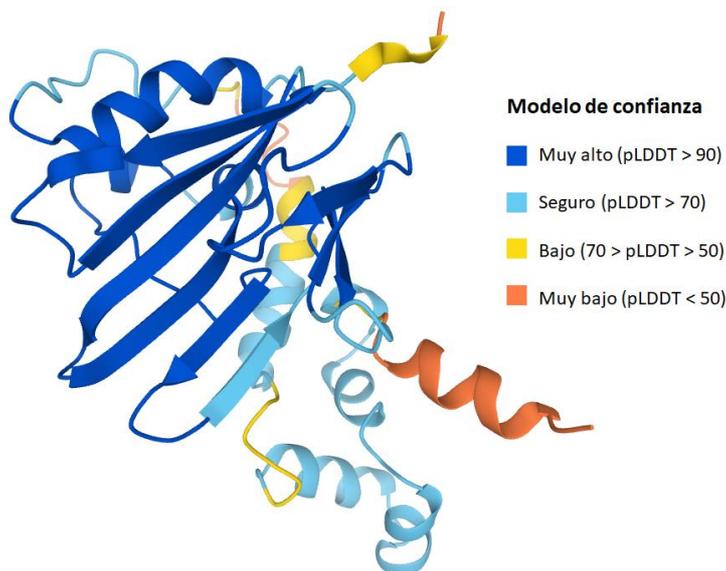
Estudios de transcriptómica por RNAseq mostraron un mayor nivel de ARNm en tripomastigotes de la cepa Y (TcII) de *T. cruzi* con respecto a los demás estadios del parásito, tanto para  $\Delta$ Nt-CARP1 como para CARP1-FL (Li et al., 2016). Sin embargo, en un ensayo de “ribosome profiling” realizado en parásitos de la cepa Dm28c (TcI), que estudia ribosomas asociados a ARNm (Smircich et al., 2015), se observó que solo en el caso del ARNm de CARP1-FL aparecen ribosomas asociados; lo que indicaría que posiblemente este sea el ARN que se está traduciendo.

Con respecto a la localización, en la base de datos TrypTAG se observa que el ortólogo de esta proteína en *T. brucei* se encuentra distribuido entre el citoplasma, el PFR y el sistema endocítico del parásito.

## TcCARP2

La proteína TcCARP2 (TcCLB.511557.20, cepa CL Brener Esmeraldo-like), no posee dominios de función conocida (Pfam). Está compuesta por 235 aminoácidos, un peso

molecular estimado de 27 kDa y un pI teórico de 6.14 ([ProtParam](#)). En la figura 46 se puede observar una representación de un modelo de TcCARP1 predicho por AlphaFold® (Jumper et al., 2021).



**Figura 46.** Representación de un modelo de la proteína CARP2 de *T. cruzi* predicho por el programa AlphaFold®. La confianza del modelo se ilustra utilizando la puntuación de la prueba de diferencia de distancia local prevista (pLDDT), indicada por el código de colores.

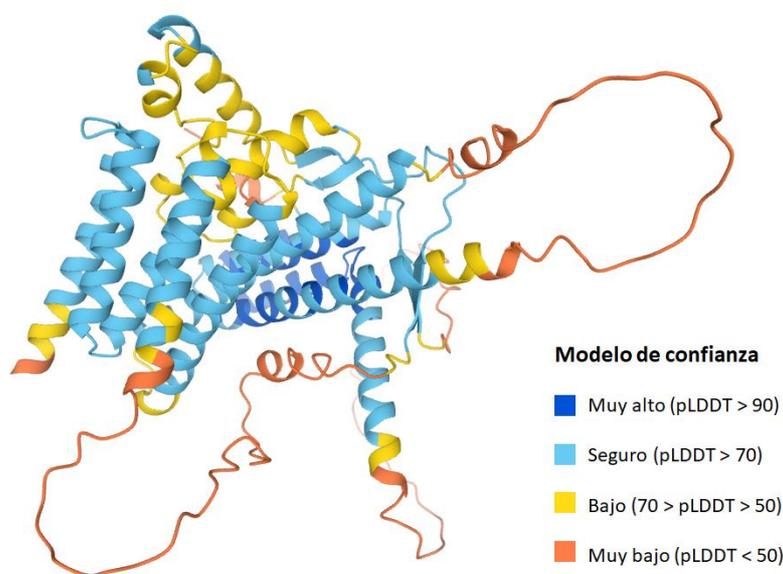
Por RNAseq se observó una mayor transcripción en tripomastigotes de la cepa Y (TcII) con respecto a los demás estadios del parásito (Li et al., 2016), y no se identificaron ribosomas asociados a este ARN (Smircich et al., 2015). En otro estudio, en el que se evaluaron parásitos de la cepa infectiva CL Brener (TcVI) contra parásitos de la cepa no infectiva CL-14 (TcVI) —ambas cepas pueden invadir la célula hospedadora, pero CL-14 no desarrolla ciclos de infección (en células invadidas por CL Brener los tripomastigotes se liberan el día 6 post-infección, mientras que en la cepa CL-14 se acumulan amastigotes pero no se liberan al medio extracelular)—, se observó que TcCARP2 se acumula en la forma tripomastigote, a diferencia de lo que sucede en la cepa infectiva, que se acumula en amastigotes (Belew et al., 2017).

Con respecto a la localización, CARP2 se encontró distribuido en estructuras puntuales dentro del citoplasma en parásitos de *T. brucei* transfectados con esta proteína fusionada a GFP en el extremo N-terminal (base de datos [TrypTAG](#)); aunque

otros experimentos ubican a TbCARP2 en el proteoma de la fracción de membrana plasmática y en el proteoma flagelar (Bridges et al., 2008).

### TcCARP3

Anotada como TcCLB.506825.40 en la cepa CL Brener Esmeraldo-like, TcCARP3 contiene 515 aminoácidos, un peso molecular estimado de 58 kDa y un pI teórico de 5.56. Utilizando la base de datos [Superfamily](#) se encontró en el extremo N-terminal un dominio de interacción proteína-proteína llamado “TPR-like” (motivo de repetición tetratricopeptídica, por su sigla en inglés). En la figura 47 se puede observar una representación de un modelo de TcCARP3 predicho por AlphaFold® (Jumper et al., 2021).



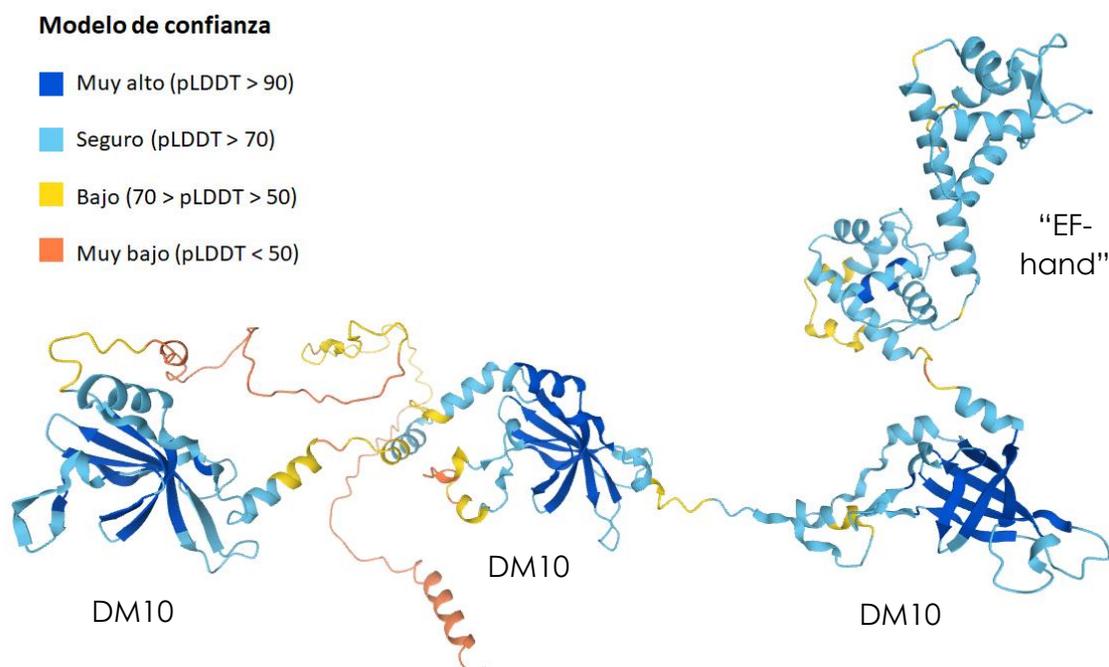
**Figura 47.** Representación de un modelo de la proteína CARP3 de *T. cruzi* predicho por el programa AlphaFold®. La confianza del modelo se ilustra utilizando la puntuación de la prueba de diferencia de distancia local prevista (pLDDT), indicada por el código de colores.

Se observó por RNAseq una alta transcripción de CARP3 en tripomastigotes de la cepa Y (TcII) con respecto a los demás estadios del parásito (Li et al., 2016) y estos ARNm expresados en el estadio tripomastigote tenían una mayor proporción de ribosomas asociados con respecto al epimastigote (Smircich et al., 2015), lo que sugiere una mayor expresión y traducción de esta proteína en el estadio infeccioso. En el

estudio del grupo de Belew y col., que evaluó parásitos de la cepa infectiva CL Brener (TcVI) contra parásitos de la cepa no infectiva CL-14 (TcVI), se observó que TcCARP3 se acumula en la forma tripomastigote de la cepa infectiva, a diferencia de lo que ocurre en la cepa no infectiva, lo que también podría indicar una participación en la invasión (Belew et al., 2017). Por otra parte, en un trabajo que investigó los cambios en la expresión global de genes bajo estrés hiperosmótico se determinó que TcCARP3 aumenta su expresión a partir de las 6 hs en hiperosmosis (Li et al., 2011), lo que señala un posible rol de esta proteína en la osmorregulación. Además, en el fosfoproteoma realizado durante la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes, evento relacionado al AMPc (Gonzales-Perdomo et al., 1988; Hamedi et al., 2015), se encontró que TcCARP3 se encuentra fosforilada en la serina en posición 305 del estadio metacíclico (MT) y no durante la diferenciación (Marchini et al., 2011). Por último, TcCARP3 aparece enriquecida en miristoilación en el extremo N-terminal en epimastigotes de la cepa Silvio (TcI) (Roberts and Fairlamb, 2016). La N-miristoilación es una modificación lipídica en la que un grupo miristoilo, derivado del ácido mirístico, se une covalentemente mediante un enlace amida al grupo alfa-amino de un residuo de glicina N-terminal, de secuencia consenso [GXXX(S/T/C)]. En el caso de TcCARP3 se trataría de la glicina en posición 2, que posee la secuencia [GNGAS] (ver [Anexo N° 1](#)). Esta modificación se puede añadir co-traduccionalmente o post-traduccionalmente, y permite interacciones débiles proteína-proteína y proteína-lípido; desempeñando un papel esencial en el direccionamiento de la proteína hacia la membrana plasmática. En línea con estos datos, en un trabajo donde caracterizan una herramienta genética (el vector pTcGW1.1) clonando la proteína CARP3, se observó que posee una localización en la parte posterior del epimastigote (Kugeratski et al., 2015), lo cual podría deberse a la N-miristoilación. Sin embargo, cuando el ortólogo de esta proteína en *T. brucei* se fusionó a una proteína GFP en su extremo N-terminal se observó una localización citoplasmática, lo que puede deberse al hecho de que la proteína GFP podría estar bloqueando la miristoilación (base de datos [TrypTAG](#)).

## TcCARP4

TcCARP4 (TcCLB.509455.130 en CL Brener Esmeraldo-like) está caracterizada como una proteína hipotética que contiene tres dominios de función desconocida, denominados DUF1126 (Pfam) o DM10 (Prositate), según la base de datos utilizada. Además, en la base de datos Superfamily se encontró que posee un dominio de unión a calcio “EF-hand” en el extremo C-terminal. La base de datos Prositate sugiere que los dominios DM10 podrían actuar como unidades específicamente involucradas en la localización o ensamblaje axonal en el flagelo. En concordancia, experimentos de proteómica ubican a TbCARP4 tanto en la fracción de membrana plasmática como en la fracción flagelar (Bridges et al., 2008). En la figura 48 se puede observar una representación de un modelo de TcCARP4 predicho por Alphafold® (Jumper et al., 2021).



**Figura 48.** Representación de un modelo de la proteína CARP4 de *T. cruzi* predicho por el programa Alphafold®. La confianza del modelo se ilustra utilizando la puntuación de la prueba de diferencia de distancia local prevista (pLDDT), indicada por el código de colores. DM10: dominio de función desconocida; EF-hand: dominio de unión a calcio.

El RNAseq de parásitos de la cepa Y (TcII) mostró uniformidad en la expresión del ARNm de TcCARP4 para todos los estadios (Li et al., 2016), al igual que la proporción

de ribosomas asociados a estos transcritos (Smircich et al., 2015); mientras que no se observaron diferencias en el estudio que compara cepas infectivas con no infectivas (Belew et al., 2017). En cambio, en el ARNm de varios transcritos, incluido el de TcCARP4, se encontró un motivo de ARN de 43 nucleótidos rico en uracilos en la región 3'-UTR del ARNm de la forma amastigote, que es importante para estabilizar los ARNm y es determinante en la abundancia de los transcritos durante este estadio (cepa Y, TcII). Este motivo se encuentra asociado a la proteína de unión al ARN UBP1 ("Proteína de unión al ARN que une secuencias ricas en 'Us' 1", por su sigla en inglés) (Li et al., 2012).

En la tabla 2 pueden observarse el resumen del estudio exhaustivo en bibliografía de cada una de estas proteínas específicas de kinetoplastidos.

	CARP1	CARP2	CARP3	CARP4
<i>PM (n° aa)</i>	80,6 kDa (708)	27 kDa (235)	58 kDa (515)	90 kDa (782)
<i>pI teórico</i>	8.59	6.14	5.56	6.35
<i>Dominios</i>	CBD x2	-	-	DM10 x3 EF-hand
<i>Localización subcelular</i>	-	Proteoma flagelar	Parte posterior citoplasmática	Proteoma flagelar
<b>-omics</b>				
<i>RNAseq</i>	↑Tp	↑Tp	↑↑↑Tp	-
<i>Ribosome Profiling</i>	+	-	+++	+++
<i>CL-14 (no infectiva)</i>	-	Acumulación en Tp	↓Tp	-
<i>Otros</i>	-	-	N-miristoilación Fosfoserina 305 ↑↑hiperosmosis	43-Nt "U-rich element" en 3'-UTR, potencial unión de la proteína UBP1.

**Tabla 2.** Resumen de las características destacadas de las proteínas de respuesta al AMPc (CARP).

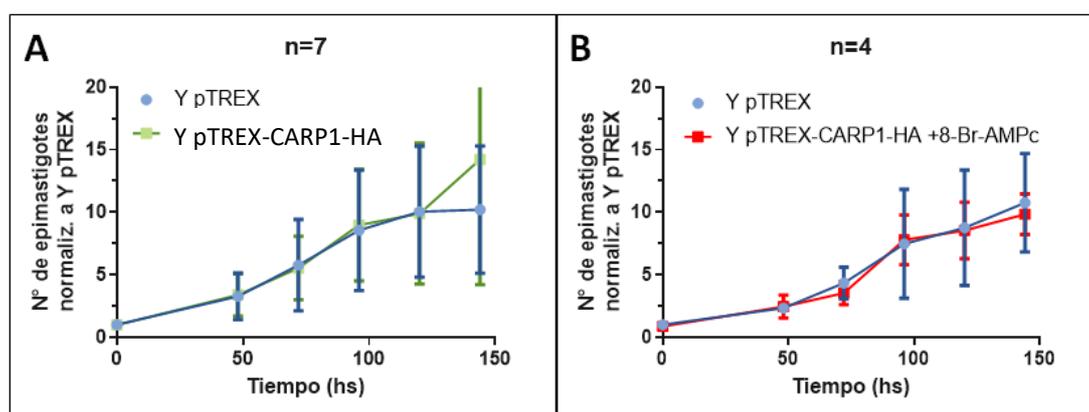
## Resultados

### 1. Sobreexpresión de las proteínas CARP en *T. cruzi*

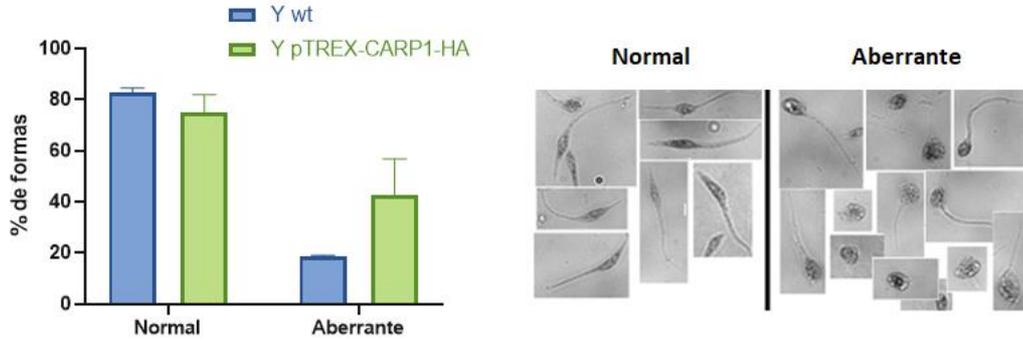
Con el fin de realizar una caracterización de las proteínas CARP, se llevó a cabo el clonado y la sobreexpresión de la secuencia codificante completa de cada una de estas proteínas en un vector de expresión de *T. cruzi* (pTREX-eGFP); excepto para la proteína CARP4 que se clonó en dos mitades, ya que se trata de una proteína de gran longitud (ver “Clonado de ORFs”). Una vez obtenidos y secuenciados los vectores, epimastigotes de la cepa Y (TcII) fueron transfectados con los plásmidos correspondientes a cada una de las CARP o con el plásmido vacío (control). La sobreexpresión se corroboró por WB (ver “WB”).

#### 1.1. Efectos de las TcCARP1 sobre el crecimiento del parásito

Con respecto a CARP1, se obtuvieron epimastigotes transgénicos que expresaban la proteína unida a GFP (pTREX-CARP1-GFP) o unida a un *tag* de hemaglutinina (pTREX-CARP1 -HA). Se observó que los mismos poseían un comportamiento similar a los provenientes de la cepa *salvaje* (wt), aún en presencia de AMPc (Figura 49). Sin embargo, cuando estos epimastigotes alcanzaban la fase estacionaria presentaron una mayor proporción de formas “aberrantes” (Figura 50).



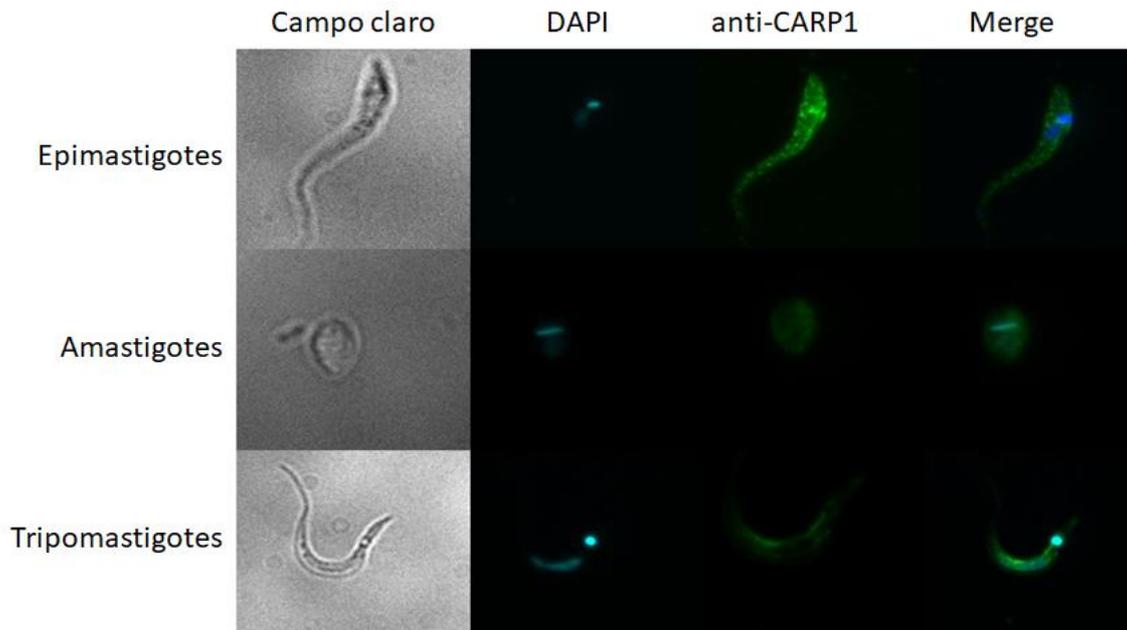
**Figura 49.** Curvas de crecimiento de epimastigotes transfectados con vector vacío (pTREX) o que sobreexpresan la proteína TcCARP1-HA (pTREX-CARP1-HA), en presencia (A) o ausencia (B) de 8-Br-AMPC.



**Figura 50.** Porcentaje de formas “normal” y “aberrante” en epimastigotes wt o transgénicos que sobreexpresan la proteína TcCARP1-HA a las 120 hs de comenzada la curva de crecimiento.

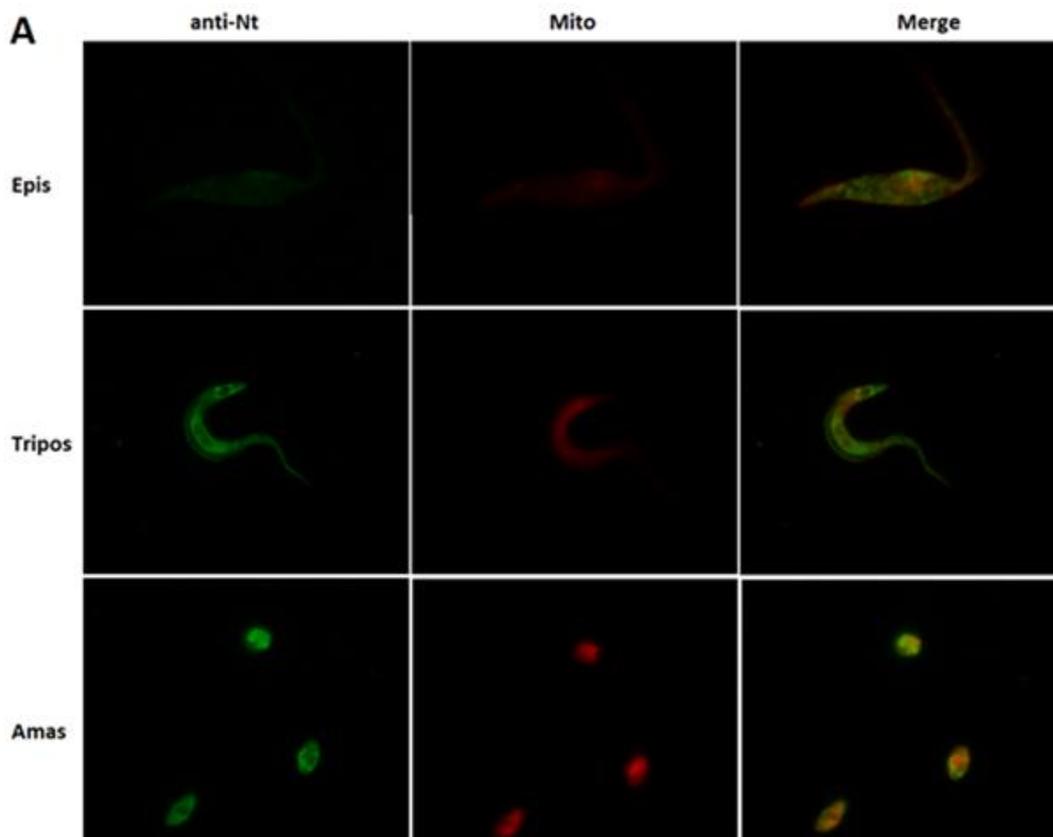
## 1.2. Localización subcelular

Para poder determinar la localización subcelular se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico contra la proteína CARP1. En la figura 51 se puede observar una localización mayoritariamente citoplasmática de esta proteína en los distintos estadios de parásitos de la cepa Y (TcII); aunque también se observa distribuida en el PFR, el sistema endocítico, y en el bolsillo flagelar.

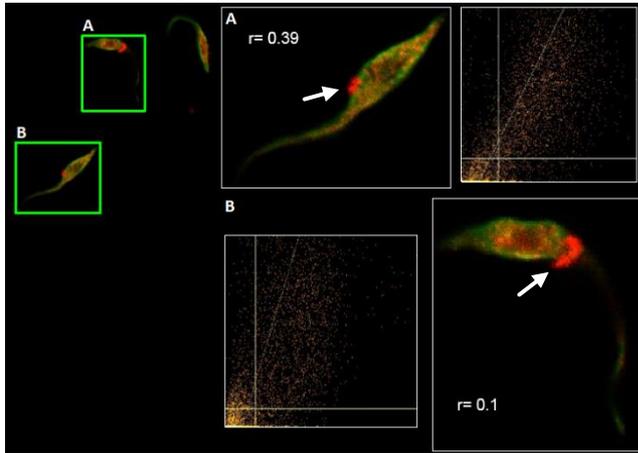


**Figura 51.** Inmunofluorescencia de epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* utilizando un anticuerpo primario contra la proteína TcCARP1 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa488. Las fotos fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus). Se muestra sólo una imagen representativa.

Además, para profundizar sobre esta ubicación, se realizó la co-localización de CARP1 con anticuerpos que reconocen estructuras particulares que se distribuyen en el citoplasma, como los microtúbulos subpeliculares (utilizando un anticuerpo que reconoce tubulina), el mitocondrion (utilizando MitoTracker®) y las vesículas ácidas, como los lisosomas y los acidocalcisomas (utilizando LysoTracker®). No se encontró significancia en la co-localización con el mitocondrion (Figura 52) o los microtúbulos subpeliculares (Figura 53), mientras que en los estadios epimastigote existe una co-localización de la proteína CARP1 con vesículas ácidas (Figura 54). Complementariamente, los epimastigotes transgénicos pTREX-CARP1-GFP mostraron una localización citoplasmática (Figura 55).



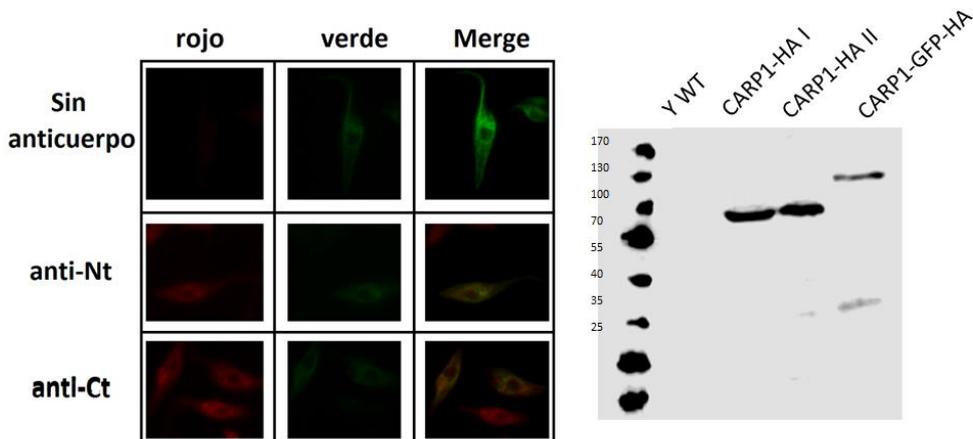
**Figura 52.** Co-localización TcCARP1 con el mitocondrion. Inmunofluorescencia de epimastigotes (Epis), tripomastigotes (Tripos) y amastigotes (Amas) de la cepa Y de *T. cruzi* utilizando un anticuerpo primario contra la proteína TcCARP1 (Alexa488, verde) que se une al extremo N-terminal (anti-Nt), y la sonda MitoTracker™ Red CMXRos (599 nm, rojo). Las fotos fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus). Se muestra sólo una imagen representativa de cada estadio (Epis: epimastigotes; Tripos: tripomastigotes; Amas: amastigotes).



**Figura 53.** Co-localización TcCARP1-tubulina. Inmunofluorescencia de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* utilizando un anticuerpo primario contra la proteína TcCARP1 (Alexa594, rojo), y otro anticuerpo contra la proteína tubulina (Alexa488, verde). Las fotos fueron tomadas con un microscopio confocal (Olympus). Se determinó el coeficiente de Pearson ( $r$ ) utilizando el programa ImageJ. Se muestra sólo una imagen representativa. Flechas blancas: potencial bolsillo flagelar.



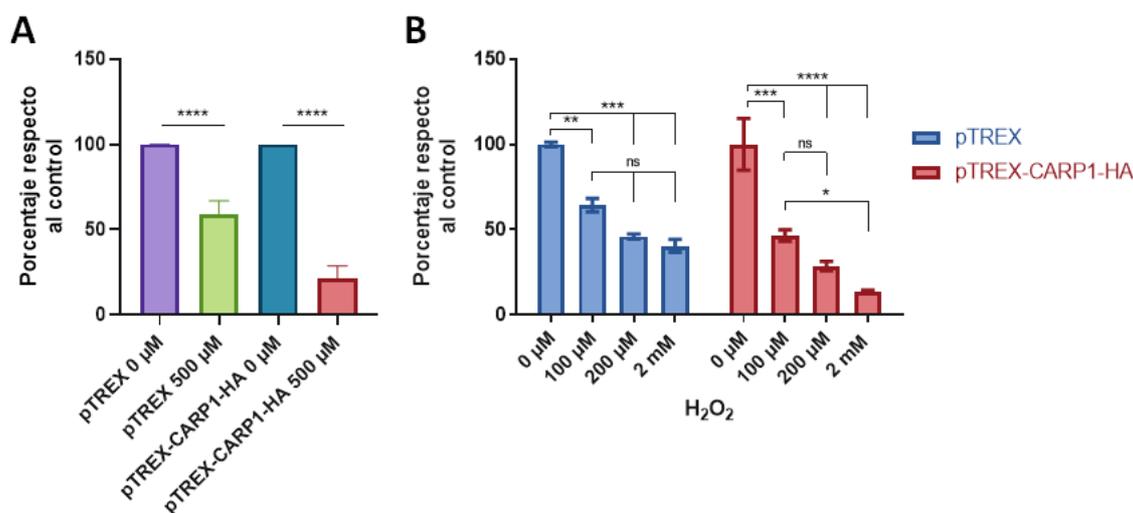
**Figura 54.** Co-localización TcCARP1 con vesículas ácidas. Inmunofluorescencia de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* utilizando un anticuerpo primario contra la proteína TcCARP1 (Alexa488, verde), y la sonda LysoTracker™ Red (590 nm, rojo). Las fotos fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus). Se muestra sólo una imagen representativa.



**Figura 55.** (IZQ) Inmunofluorescencia de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* que sobreexpresan la proteína TcCARP1 fusionada a GFP; utilizando o no un anticuerpo primario contra la proteína TcCARP1 que se une al extremo N-terminal (anti-Nt) o al extremo C-terminal (anti-Ct) y un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo (Alexa594, rojo). La columna "verde" corresponde excitando a 488 nm. Las fotos fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus). (DER) WB de lisados de epimastigotes en fase exponencial utilizando anticuerpo de rata anti-HA (Roche).

### 1.3. Estrés oxidativo

Con el objetivo de caracterizar los epimastigotes transgénicos frente a la presencia de estrés oxidativo, epimastigotes pTREX-CARP1 -HA y control en fase exponencial se sometieron a ensayos de resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ver “[Ensayo de daño con peróxido de hidrógeno](#)”). Se observa que aquellos parásitos que sobreexpresan la proteína CARP1 presentaron una resistencia alrededor de 2.6 veces menor respecto al control (Figura 56).



**Figura 56.** Ensayo de estrés oxidativo. Epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* transfectados con vector vacío (pTREX) o que sobreexpresan la proteína TcCARP1-HA (pTREX-CARP1-HA) se incubaron con PBS-glucosa al 2% en presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos. Luego, se lavaron con PBS, se resuspendieron en LIT con 10% SFB y se contaron en cámara de Neubauer (A), o se incubaron 24 hs y se determinó la concentración de parásitos usando el método de reducción de resazurina (ver “[Cuantificación de parásitos](#)”). El experimento se normalizó a parásitos no tratados. Los resultados se expresan como la media ± SD (n ≥ 3). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001, ANOVA y post-test de Dunnett.

## 2. Expresión y purificación de las proteínas TcCARP en bacterias

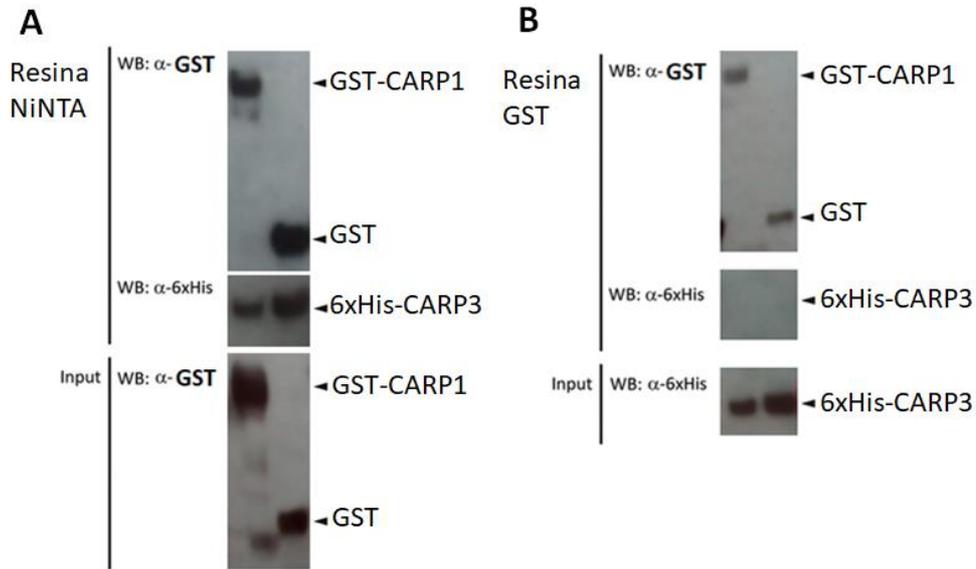
Con el fin de expresar y purificar las proteínas TcCARP para luego utilizarlas en ensayos de interacción y determinación de la estructura, se clonó la secuencia completa de cada una de ellas en vectores de expresión en bacterias (pDEST, pLEICS; ver “[Clonado de ORFs](#)”). Luego, bacterias de la cepa *E. coli* BL21 se transformaron con

dichos vectores y se indujeron con IPTG, para finalmente obtener extractos citoplasmáticos que contenían las distintas proteínas CARP fusionadas a GST o a un *tag* de histidina (ver “Preparación de extractos proteicos”).

## 2.1. Interacción entre TcCARP

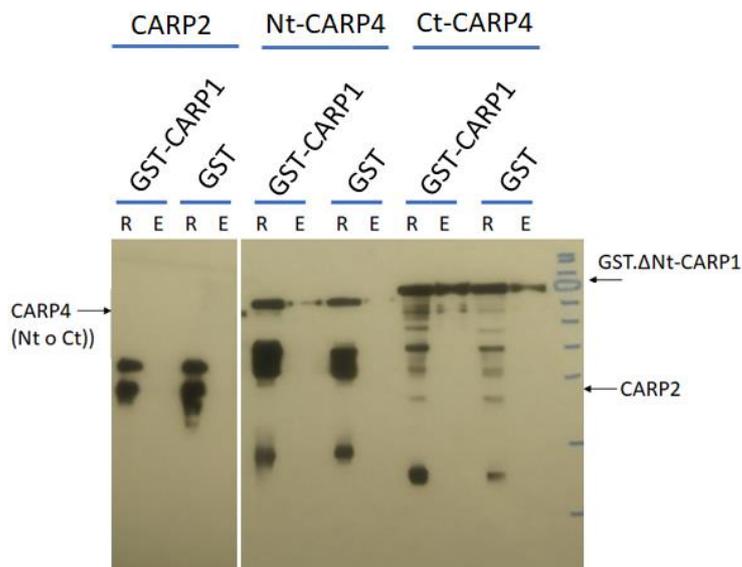
En primer lugar, se obtuvieron los extractos proteicos provenientes de bacterias que sobreexpresaban las proteínas CARP. CARP1 se purificó fusionada a GST en el extremo N-terminal (GST-CARP1), mientras que a las demás CARP se las purificó fusionadas a un *tag* de histidina en el extremo N-terminal (6xHis-CARP2-4). Para realizar el ensayo de precipitación diferencial, se preconjugó la proteína GST-CARP1 a una resina de agarosa-GSH que luego se incubó con un extracto proteico que contenía una de las otras proteínas CARP (6xHis.CARP2-4). Complementariamente, las proteínas 6xHis-CARP2-4 se preconjugaron a una resina de agarosa-NiNTA y se incubaron por separado con un extracto proteico que contenía GST-CARP1.

En la Figura 57 se puede observar que tanto la proteína GST-CARP1 como el dominio GST se unieron a la resina de agarosa-GSH (Figura 57B), pero también lo hicieron inespecíficamente a la resina NiNTA (Figura 57A). Por su parte, CARP3 solo se unió a la resina de NiNTA. Al eluir la resina NiNTA con 0.5 M imidazole se observó que, además de 6xHis-CARP3, eluyeron las proteínas con dominios GST (GST- $\Delta$ Nt-CARP1 y GST sola), lo que podría deberse a una unión entre CARP3 y el dominio GST, o bien a una interacción entre este dominio y la resina de Ni-NTA agarosa. Sumado a esto, no se observó interacción entre CARP3 y la resina conteniendo GST-CARP1-agarosa o GST-agarosa. A la vista de estos resultados, no se ha podido confirmar la existencia de una interacción entre CARP1 y CARP3.



**Figura 57.** Ensayo de precipitación diferencial. (A) La resina agarosa-GSH unida a GST-CARP1 o GST se incubó con 6xHis-CARP3, se eluyó con 50 mM de glutatión y las fracciones eluidas se analizaron por WB. (B) La resina agarosa-NiNTA unida a 6xHis-CARP3 se incubó con GST-ΔNt-CARP1 o GST, se eluyó con 0.5 M de imidazole y las fracciones eluidas se analizaron por WB.

De manera similar, no se encontraron interacciones entre CARP1 y CARP2-4 (Figura 58).



**Figura 58.** Ensayo de pull-down. Utilizando una resina de GSH-agarosa unida a GST-CARP1 o GST solo, se incubó con 6xHis-CARP2, 6xHis-Nt-CARP4 o 6xHis-Ct-CARP4. Luego, se eluyó con 50 mM de glutatión y las fracciones eluidas se analizaron por WB.

## 2.2. Determinar la estructura tridimensional de las proteínas CARP

La determinación de la estructura de una proteína mediante cristalografía de rayos X es un proceso mayormente empírico, que depende de cada proteína y que involucra una serie de pasos, entre los que se destacan (1) la selección de la proteína; (2) el clonado, expresión, purificación y cristalización; (3) la recopilación de los datos de difracción y (4) la determinación de las posiciones atómicas de la macromolécula en cuestión (Figura 59) (Chayen and Saridakis, 2008). Sin embargo, incluso una vez que se dispone de la proteína soluble pura, la producción de los cristales de alta calidad sigue siendo un obstáculo muy importante en la determinación de la estructura.

Con el fin de obtener cristales de las CARP, se realizó la optimización de las condiciones de purificación de cada una de las proteínas estudiadas. La sobreexpresión y purificación se realizaron en *E. coli*, obteniéndose proteína purificada para los dominios CBD1 y 2 de CARP1 y para la proteína CARP3 (Tabla 3 y Figura 60). Los agregados celulares se observaron a menudo tras la inducción de la proteína CARP1, lo que no se alivió con el uso de diferentes temperaturas y diferentes cepas de *E. coli* (ver "Anexo N° 3").

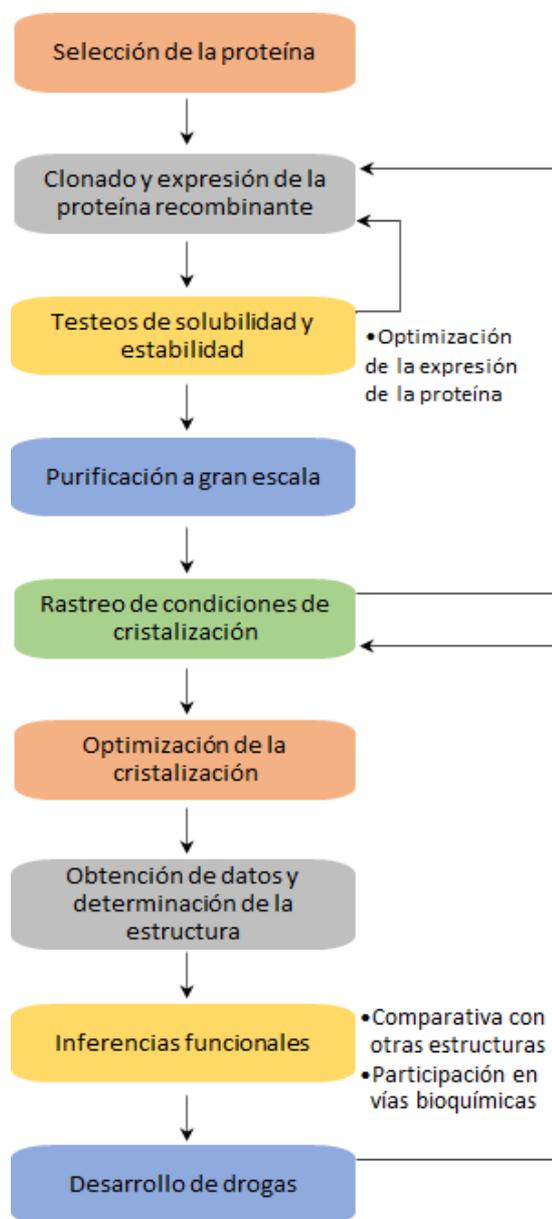
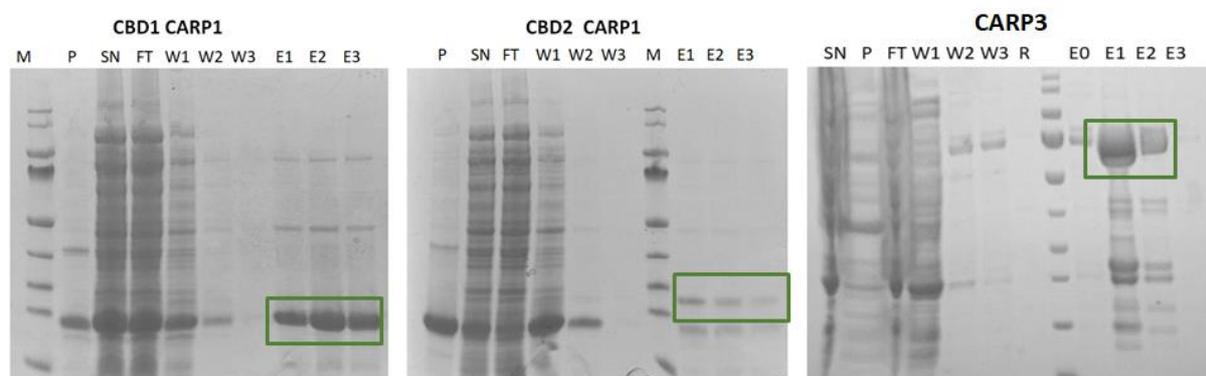


Figura 59. Pasos en la determinación de la estructura de una proteína mediante cristalografía de rayos X.

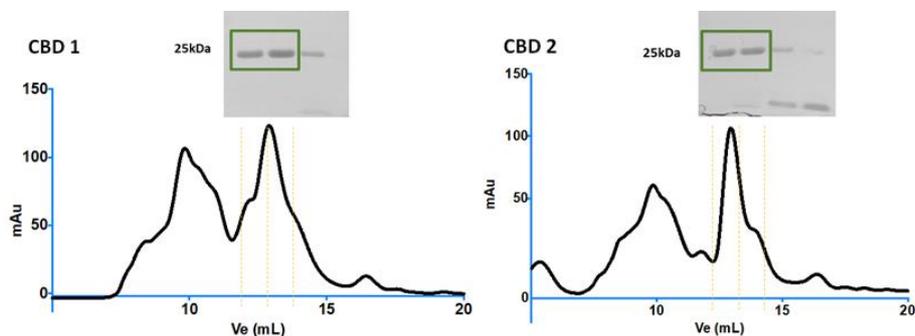
Construceto	Clonado	Expresión	Purificación	Rendimiento
His <sub>6</sub> -CARP1	Sí, pLEICs-93	✓	Agregados	-
His <sub>6</sub> -Dom1-CARP1	Sí, pLEICs-93	✓	✓ (Fig. 61)	0.10 mg/L
His <sub>6</sub> -Dom2-CARP1	Sí, pLEICs-93	✓	✓ (Fig. 61)	0.15 mg/L
His <sub>6</sub> -CARP2	Sí, pLEICs-93	✓	✓	Nc
His <sub>6</sub> -CARP3	Sí, pDEST-17	✓	✓ (Fig. 62)	0.06 mg/L
His <sub>6</sub> -CARP4-Nt	Sí, pLEICs-93	✓	✓	Nc
His <sub>6</sub> -CARP4-Ct	Sí, pLEICs-93	✓	✓	Nc

**Tabla 3.** Avances alcanzados en el intento de cristalización de las proteínas de respuesta al AMPc (CARP). Nc: No cuantificable.

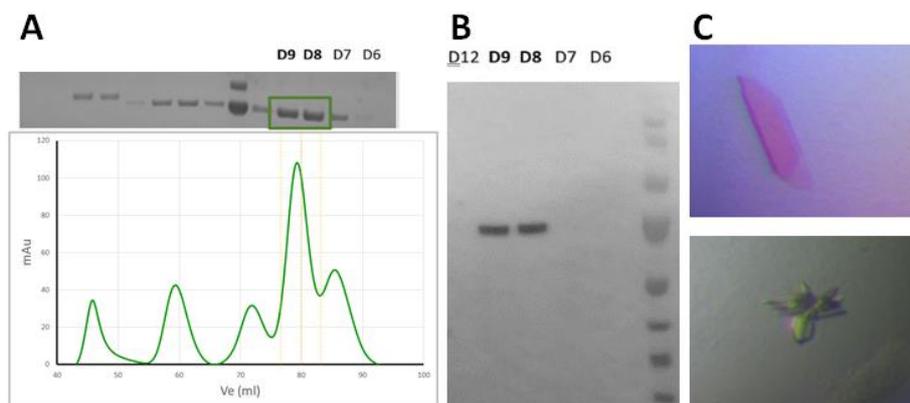


**Figura 60.** SDS-PAGE 10% de la expresión y purificación de los dominios 1 y 2 (CBDs) de CARP1 y de CARP3, utilizando una resina de NiNTA. P: fracción insoluble, SN: fracción soluble, FT: no unida a resina, Wx: lavados, R: resina luego de los lavados, Ex: eluciones desde la resina, M: estándares de peso molecular.

Tanto los dominios CBD de CARP1 como CARP3 se expresaron en forma correcta y se purificaron por cromatografía de exclusión, observándose un pico de absorbancia a 280 nm, coincidente con la aparición de una banda de tamaño esperado en el SDS-PAGE correspondiente a dicho pico (Figura 61 y 62-A).

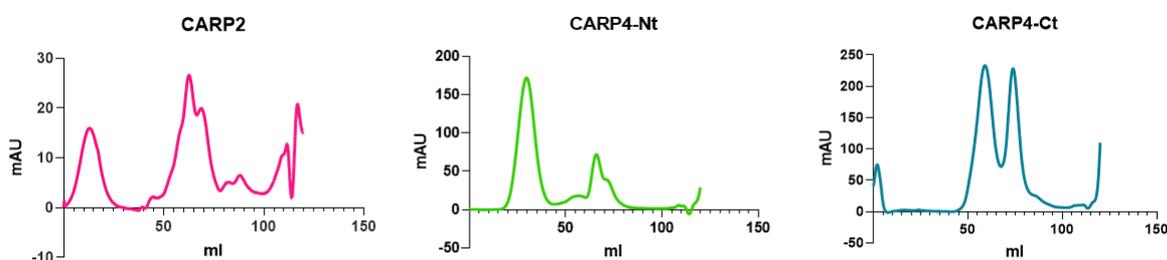


**Figura 61.** Cromatografía de exclusión utilizando una columna Superdex® S75 16/60 de las fracciones eluidas obtenidas para ambos dominios (ver Figura 60).



**Figura 62.** (A) Cromatografía de exclusión utilizando una columna Superdex® S200 16/600 de los eluidos obtenidos para CARP3 (Figura c2). (B) WB con anticuerpo anti-His conjugado a HRP donde se corrieron las fracciones provenientes de la cromatografía de exclusión. (C) Potenciales cristales de TcCARP3 (uno simple y otro múltiple).

En el rastreo extensivo de cristalización se utilizaron los kits ProPlex™, MemGold™ y Morpheus® (Molecular Dimensions Ltd.), y solo se obtuvieron cristales para CARP3 (Figura 62), los cuales no difrataron por lo que no pudo resolverse la estructura. Las proteínas CARP2 y CARP4 (Nt, Ct) pudieron ser purificadas (Figura 63) pero con un bajo rendimiento, lo cual impidió la obtención de cristales.



**Figura 63.** Cromatografía de exclusión utilizando una columna Superdex® S200 16/60 de los eluidos obtenidos para CARP2 y CARP4 (Nt y Ct) (ver Anexo N° 3).

## Discusión

El AMPc es una de las moléculas de señalización más estudiadas y ha sido implicado en un gran número de funciones biológicas. Durante muchos años, PKA era el único efector conocido de este nucleótido, por lo que se creía que todos los estímulos del AMPc estaban mediados por esta quinasa. No fue hasta la identificación de Epac como un nuevo efector del AMPc (Kawasaki et al., 1998), que las vías mediadas por este nucleótido se clasificaron en dos categorías: dependientes e independientes de PKA. De manera análoga, el único efector del AMPc que había sido caracterizado en *T. cruzi* era PKA (Ochatt et al., 1993; Bao et al., 2008), aunque más tarde se demostró en *T. brucei* que esta quinasa sería estimulada por GMPc, y no por AMPc (Shalaby et al., 2001). Además, en los últimos años han sido descritos ligandos endógenos relacionados con el nucleósido de purina (Bachmaier et al., 2019). Sumado a esto, la ausencia de secuencias de Epac y CICs en el genoma de *T. cruzi* contribuyó en gran medida a la idea de una vía exclusiva y poco convencional para la señalización del AMPc en estos parásitos. Recientemente, se describió una familia de proteínas esenciales en tripanosomátidos, las proteínas CARP, como potenciales sensores del AMPc, abriendo un nuevo horizonte en la señalización mediada por este nucleótido (Gould et al., 2013). Dentro de esta familia se destaca CARP1, proteína exclusiva de los kinetoplástidos, con capacidad de unir AMPc (Jäger et al., 2014). Siendo las proteínas CARP esenciales y exclusivas de estos parásitos, podrían representar blancos interesantes para el desarrollo de fármacos contra la tripanosomiasis africana/americana y la leishmaniasis. Este capítulo se enfocó en el estudio y la caracterización de las proteínas CARP.

En primer lugar, se llevó a cabo el clonado y la sobreexpresión de CARP1 en un vector de expresión de *T. cruzi* (pTREX-eGFP). Se analizó entonces el efecto de CARP1 sobre el crecimiento de los parásitos, y se observó que los epimastigotes que sobreexpresaban CARP1, aún en presencia de AMPc, tenían un crecimiento similar a los *wt* hasta llegar a la fase exponencial (Figura 49). Alcanzada la fase estacionaria, se

desarrollaban formas “aberrantes” por una a dos semanas, para luego perder viabilidad (Figura 50). Estas formas resultaron ser similares a las observadas en el recto de insectos hambreados por meses (Kollien and Schaub, 2000) y en parásitos que no pueden realizar citoquinesis (Fernandes et al., 2012; Tavernelli et al., 2019). Es sabido que en el intestino del vector se encuentran péptidos activadores de la AC y estimuladores de la metacicloogénesis (Fraidenaich et al., 1993), y que la metacicloogénesis provocada por el estrés nutricional también provoca un aumento en la producción del AMPc en dos fases (Hamedi et al., 2015), con un primer pico rápidamente después del inicio de la diferenciación y una segunda fase de aumento de AMPc asociado con la adhesión de los epimastigotes, un prerrequisito para su diferenciación a MTs (Böker and Schaub, 1984). Entonces, la sobreexpresión de CARP1 podría mimetizar los efectos de la activación de la AC debido el estrés nutricional durante el primer pico y, al mantenerse los altos niveles de expresión, evitar los efectos del segundo pico, interrumpiendo la metacicloogénesis y dejando parásitos con formas “aberrantes”. Sin embargo, más experimentos deben realizarse para sustentar dicha hipótesis.

Alternativamente, la aparición de estas formas podría deberse a una desregulación de la función osmorregulatoria. Durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, el parásito debe adecuarse a cambios de osmolaridad ocasionados en la transición entre el insecto vector (600-1000 mOsm en la parte final del intestino medio) y el mamífero hospedador (300 mOsm en la sangre) (Schoijet et al., 2019). En este sentido, los acidocalcisomas y el CVC cumplen un rol importante (De Souza et al., 2000; Rohloff et al., 2004) ya que dentro de los mismos se hidrolizan o sintetizan polifosfatos (polyP) en presencia de estrés hipo- e hiperosmótico, respectivamente (Li et al., 2011). Por otra parte, los niveles de AMPc aumentan cuando los epimastigotes son sometidos a estrés hipoosmótico, regulando el tráfico y fusión de los acidocalcisomas con el CVC y permitiendo la traslocación de la acuaporina TcAQP1 (Rohloff et al., 2004). El incremento en los niveles del AMPc luego del aumento de tamaño producto de la

entrada de agua podría sugerir la activación de una AC mecanosensible como ocurre en células musculares lisas (Mills et al., 1990) o de un canal mecanosensible, como el descrito por Dave y col. (Dave et al., 2021), aunque se desconoce cómo el AMPc ejerce su función. En ensayos de inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo específico contra TcCARP1, se observó que esta proteína posee una localización citoplasmática y flagelar (Figura 51), pero, además, nuestros resultados evidenciaron una co-localización de la proteína TcCARP1 con vesículas ácidas (Figura 54) y se observó una mayor intensidad de esta proteína en el bolsillo flagelar de *T. cruzi* (Figura 53, flechas blancas). La localización en el bolsillo flagelar podría ser coincidente con una función osmorregulatoria de CARP1, ya que proteínas involucradas con el CVC suelen encontrarse en este bolsillo, donde regulan el tráfico de proteínas hacia membrana, la disminución del volumen regulador (RVD) ante estrés hipoosmótico y el encogimiento de las células cuando se someten a estrés hiperosmótico (Rohloff et al., 2004; Li et al., 2011; Niyogi et al., 2014). Esto, sumado a que los datos obtenidos que sugieren que la sobreexpresión de CARP1 es perjudicial para los epimastigotes, podría indicar una exacerbada función osmorregulatoria, que produce formas “aberrantes” como las observadas (Figura 50). Es interesante señalar además una potencial participación en el proceso de osmorregulación por parte de TcCARP3, que aumenta su expresión bajo estrés hiperosmótico (Li et al., 2011) y que, por espectrometría de masas, se reveló que interaccionaría con las adenilil ciclasas ACP3 y ACP5, posiblemente a través de una N-miristoilación (Shaw et al., 2021).

Aún se desconoce cómo los tripanosomátidos regulan la señalización del AMPc, así como el rol de las proteínas CARP en esta vía. Considerando que solo CARP1 posee dominio de unión al AMPc, la hipótesis es que CARP2-4 serían efectores río abajo de CARP1 o parte esencial de un complejo que se forma como respuesta a los niveles intracelulares de AMPc. Nuestros resultados, al igual que los obtenidos por Bachmaier y col. (Bachmaier, 2015), no muestran interacción entre CARP1 y CARP3 (Figura 57),

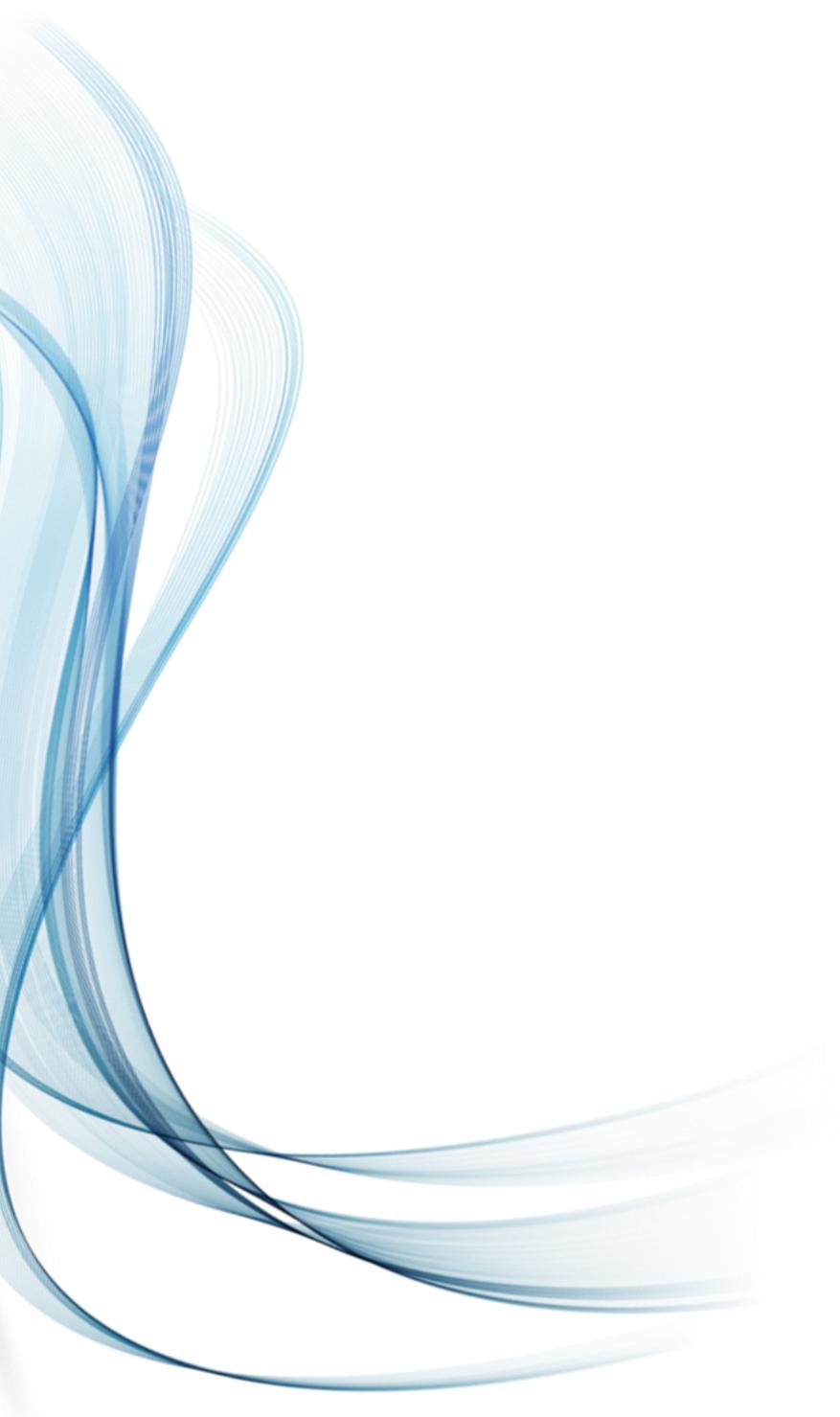
y más estudios deben realizarse para determinar la participación de ambas proteínas frente al estrés hipo- e hiperosmótico.

Entre los cambios a los que debe adecuarse el parásito en su paso por el hospedador humano se encuentran las condiciones de fuerte estrés oxidativo generadas por la respuesta inmune del hospedador. Una de las primeras respuestas inmunes innatas a la infección por *T. cruzi* es la activación de los mecanismos de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) por parte de los macrófagos, que provoca daño oxidativo en los tejidos del hospedador (Paiva et al., 2018). El AMPc ha sido involucrado en estos eventos de estrés oxidativo (Bhattacharya et al., 2008, 2009; Sternlieb et al., 2020). Se ha demostrado que la incubación con análogos del AMPc o la depleción de la PDE-A produjo que promastigotes de *L. donovani* fueran más resistentes a las ROS y, por el contrario, bajos niveles de AMPc intracelular (producto de la sobreexpresión de la PDE-A) provocaron una reducida resistencia al daño oxidativo (Bhattacharya et al., 2009; Sternlieb et al., 2020). Sumado a esto, se ha observado que tripomastigotes de *T. cruzi* tratados con AMPc tienen mayor capacidad de infección que el control, pero que esta capacidad se reduce a niveles del control a medida que aumenta el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta forma, se podría plantear la hipótesis donde el AMPc produce que los tripomastigotes sean menos resistentes a la oxidación (Sternlieb et al., 2020). Es interesante notar que estudios de transcriptómica por RNAseq mostraron un mayor nivel de ARNm de CARP1 en tripomastigotes, con respecto a los demás estadios del parásito (Li et al., 2016); y en experimentos de “ribosome profiling” se observó que este ARNm aparece asociado a ribosomas, lo que indicaría que este ARN se estaría traduciendo (Smircich et al., 2015). En este sentido, resultados previos obtenidos en el laboratorio en ensayos de invasión con epimastigotes transgénicos sobreexpresando CARP1 demostraron un aumento significativo en el porcentaje de invasión cuando los parásitos fueron incubados en presencia de 8-Br-AMPc (Mild, 2016). Coincidentemente con esta hipótesis, los epimastigotes que sobreexpresan CARP1 mostraron una resistencia menor frente al estrés oxidativo (Figura 56).

Con el objeto de aumentar el conocimiento disponible de la vía de señalización dependiente de AMPc en el parásito, en paralelo a la validación funcional, se comenzó el proceso de caracterización estructural de las proteínas CARP por cristalografía. La cristalografía juega un papel importante en el diseño de fármacos basado en estructuras, pudiendo además colaborar en la determinación de la función de la proteína. Con tal fin y en primera instancia, se ha logrado expresar de manera soluble y purificar cada uno de los miembros de la familia CARP, como también obtener cristales de CARP3 (Figura 62), aunque los mismos no fueron de una calidad suficiente para poder resolver la estructura. En tal sentido, el grado de avance de los resultados son promisorios. Por otra parte, la reciente publicación de las estructuras proteicas determinadas por medio de un modelo basado en redes neuronales llamado [AlphaFold](#) (Google Deepmind®), que a la fecha de la finalización de este escrito se encuentra primera en el ranking CASP (“Evaluación crítica de la predicción de la estructura de proteínas”, por su sigla en inglés), puede otorgar una nueva aproximación al diseño de fármaco basado en estructuras (Jumper et al., 2021).

Confiamos en que futuros experimentos, diseñados para caracterizar las proteínas CARP, permitan descubrir nuevos aspectos de la biología del AMPc en *T. cruzi* y proporcionen nuevos conocimientos sobre los mecanismos de patogénesis implicados en la enfermedad de Chagas.

# Anexos



## Anexos

### 1. Secuencias utilizadas

#### $\Delta$ Nt-CARP1

CL Brener genoma: TcCLB.508523.80

#### Secuencia proteica:

MYGTFFKGWPSPLLEMLARKAKPLFFQSGKFLMHEGDLDRCMYMITTGSVSVILN  
DRSKGKKRTKECSKACFALTPPCYVGEFALVCKEPRSASIQCETDVGAWTVSPED  
YEEVAQHLSPEVASQQREATDVRRRANLQKFFPLRVELLSQFPYFEKFSVEALNKII  
SAVEPIVLHDGDPLFSKSDMDSSAYFIQDGVAILLEEDGTRRTIPRGSCVGFECACS  
VNERKRYSIISKNYCDIWRMRREVLIDVGMSEPAAFLYCRSAAKSQRANEVVKPT  
NPSIFVRKDPYLTCFTRQLIGRLWEAALPVIYLNDEKLVAQGQLFKQFIILHNGVF  
ETTIAGNGEHHTVRITVNGEVTAMEVISGSNDNSLYKGREPMTKAFFSLVLGAYE  
YASSMPQYSSTVTSYGLSEAFVVDRANFDALVPPELREIMEEDKDARKLVYSSHKE  
NDPGVIMSNMHLGFASTYRKSrkCHVKGDAI

#### Referencias:

[Dominio de unión al nucleótido AMPc 1](#)

[Dominio de unión al nucleótido AMPc 2](#)

#### CARP1-FL

CL Brener genome: TcCLB.507035.110

#### Secuencia proteica:

MVLAYGGEGVDDHDWLITRTVLPSFESVLDELEPISEFVCPFFVPPCRSSRHYSMT  
DALTIGGVISEWEKKMILARLRQTPPLVEEEFQRRRLSTVHTRNTREYIREIQIRASTQ  
VEAEQEGRRLEYEGGISRREAVFARHKNLATILRGEVKTVRARRWCTIIFSHVFLT  
ALMKERRIHGAYEKITWMLLPIIRRAAVSVKRKEAEKLTRMNLENIPFPSPSIIRS  
MYGTFFKGWPSPLLEMLARKAKPLFFQSGKFLMHEGDLDRCMYMITTGSVSVILN  
DRSKGKKRTKECSKACFALTPPCYVGEFALVCKEPRSASIQCETDVGAWTVSPED  
YEEVAQHLSPEVASQQREATDVRRRANLQKFFPLRVELLSQFPYFEKFSVEALNKII  
SAVEPIVLHDGDPLFSKSDMDSSAYFIQDGVAILLEEDGTRRTIPRGSCVGFECACS  
VNERKKYSIISKNYCDIWRMRREVLIDVGMSEPAAFLYCRSAAKSQRANEVVKPT  
NPSISVRKDPYLTCFTRQLISRLWEAALPVIYLNDEKLVAQGQLFKQFIILHNGVF  
ETTIAGNGEHHTVRITVNGEVTAMEVISGSNDNSLYKGREPMTKAFFSLVLGAYE  
YASSMPQYSSTVTSYGLSEAFVVDRACFDALVPPELREIMEEDKDARKLVYSSHKE  
NDPGVIMSNMHLGFASTYRKSrkCHVKGDAI

## Referencias:

[Dominio de unión al nucleótido AMPc 1](#)

[Dominio de unión al nucleótido AMPc 2](#)

### **CARP2**

CL Brener genoma: TcCLB.503995.40

#### Secuencia proteica:

MSLAAQADNDLFRNRNVLDGFSYEEYLDQQVTPEDLFYLGNDAAARQIVELGYK  
GKDFLSREEFEAACQLALEGPSRREETVDVICSAGKKLDDAPLLSALAKREELVRN  
GKLSTIIFLRDIVRGQEVSAAYIDYGHRLKTEDFTEYFTKRKKTLPKRTDLSYYNWKT  
HTLFYNNSTTFQVLADNEMGLLMKHKRDRKTINVDPKAPTPGDNSNRTVIQTS  
YVQVTIYDHSVTRRKN

### **CARP3**

CL Brener genoma: TcCLB.506681.40

#### Secuencia proteica:

[MGNGAS](#)VGENRHSQLFQQGYKSLQEGRYTYAEIYYDQAIERHEGHSFWTRLDDL  
IEWERRDKAGQKGTDAKQKTAYRDGGQEEAAFPEVRKDSLKEENEVNVEMGEA  
[AGVGGSGKIEIPLDSRLADVVDYLVLRA](#)IAESYMAEGRYEEATPHMDFLSSHTR  
VMLKFLQIARMTKAEESANSSNPLEGSTADAGADNAGGGNRRAHQGFMMVSD  
VERDSILDCFEQFLRMHWVSAMANSVFIVSERFKKGGKSEKKHKKELDTAVVACA  
KIQEELYNVAKRRARSLSNSVVLFLLEGIMEEELDAE**SS**TTTSITNERMGTANGKTRT  
NTLFEEQNNRSTGNRSANEIDMLTDRDECPKIVHLQMVYDRRSLCREVPAPQQA  
PTLRYITWIDDEIRRVPVGTNYNLEIQCGMVDEKRKKQLQKRSLKFAAQRNCNY  
NDRVLLGKSFDEENALLFPVFLIQADVQFELGAATKGINALDIVDKLSTQLYGV  
GSLERQSIMRSVMESRKRGGSLFMMFED

## Referencias:

[N-miristoilación \(consenso: GXXX\[S/T/C\]\): \[GNGAS\]\(#\)](#)

[Dominio de interacción proteína-proteína \(TPR-like\)](#)

[Fosfoserina: EELDAE\*\*SS\*\*TTTSIT](#)

### **CARP4**

CL Brener genoma: TcCLB.506711.10

#### Secuencia proteica:

MKNSVVRTQPTRRYENFTLENNLPLCIGANFHDDPICFNTLRKSHNLLLPPKVDY  
APHTEYIYNGGGLTRDGKKRTQTAVDGESDDEDVFNWTVANFDVPNGG**KDY**  
**VVRFLAYFIENIPESSTETAIVRKVCIRYHLQD**NSISII**EAKQD**NSGILQSKILSRRQVP

KRMDEINELITLDDFKIGGSIEIFKRKYIILDMDMRSRMYYKKIRGEEVPDSLWPA  
ELDKFGTGMEAQRSKSTHRLATSDDMDRKRAIEQQLTGIYTKHATEDILAAQKFL  
KHNINEHLTFFALWDDRENKGDRLFCAIRIYLENDTFEIVERRPENSGRDGGTTI  
LGRQVRPRPGVDLQKTRFQEHTFGVVMKRDFLVADDMQIDETYIIHGRPYIYDA  
DSFTREYMKNKLGIELAPKVDIDPFVQVDLKTVPKFYPPPPNGFGSEREKRWIT  
LTARPQRPDFAKIEKEEGRVLRFLAILSKPLVPGDEKRKFLVSFHRASDEIEIFEIPER  
NSGFIAGRFLAKGVHEKRMPDGSSVPYSPEDFEVGKEVIVLERPFKLIAMTDETERI  
LEDKESATETRVRDLLLLFKQQIQLKFLRVHEAYCTLAPNGVLGYRQVREFLRSC  
SCTITDEEAVLLVKNIAPDSTGVISFDQFLKVVNVTFSGDMDEASLTVRSVKSVNM  
SKDESLKLVASNAERTKRRQKLAVELRQKLIQRRGNTQEQRLLGGYSTTSKMNR  
DVFRQSLNKIMHFNMSKDDMLVSILFDDRADENGDITYKQFQEFQDQDNTL

Referencias:

Dominio DM10 (*Prosite*)

Dominio de unión a calcio "EF-hand" (*Superfamily*)

## 2. Listado de primers

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tm (°C)	ER
CARP1.FWD	AGTTCTAGAACCATGGTGCTCGCG	59.1	XbaI
ΔNt-CARP1.FWD	GAGTCTAGAACCATGTACGGGACC	59.1	XbaI
CARP1.REV-GFP	AGAGTCGACTGCATCGCCCTTTACA	59.3	Sall
CARP1.REV-HA	GACAAGCTTGCATCGCCCTTTACATG	59.5	HindIII
CARP2.FWD	AGTTCTAGAACCATGAGTCTTGCGGCGCAG	64.4	XbaI
CARP2.REV	GGCAAGCTTGTCTTACGACGTGTCACATGATC	64.4	HindIII
CARP3.FWD	AGTTCTAGAACCATGGGAAACGGCGCCTCAG	65.7	XbaI
CARP3.REV	GGCAAGCTTGTCAACAATGTGCGAGGGC	62.8	HindIII
CARP4.FWD	GGCTCTAGAACCATGAAAAACAGTGTGGTGCGCAC	66.8	XbaI
CARP4(1-414).REV	GGCAAGCTTCGGCGTCATAAATGTAATACGGTC	64.4	HindIII
CARP4(420-782).FWD	GGCTCTAGAACCATGGGCAGACCGTATTACATTTATG	65.6	XbaI
CARP4.REV	AAAGTCGACCTGATCTGTGAACTCCTGAAACTGC	64.4	Sall

**Tabla 4.** Primers diseñados para el clonado tradicional de *pTREX-eGFP* por enzimas de restricción.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tm (°C)
CARP2-Fwd	GATCTTTTCAACCGCAACGTGTTAGA	56.4
CARP2-Rev	GGGTTAATCTTACGACGTGTTACATG	56.7
CARP3-Fwd	AACCGCCACTCACAGCTGTTC	56.3
CARP3-Rev	CTAGCGGGACTCCATCACAGA	56.3
CARP4-Fwd	ACTCGCCGCTATGAGAATTTTACAC	56.0
CARP4-Rev	TTAGCCTCCAAAAGACGAAACTGC	57.7

**Tabla 5.** Primers diseñados para el clonado de las proteínas CARPs en el vector *pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO* (Gateway®).

Nombre	Secuencia (5' a 3')
ΔNt-CARP1.FWD	GTATTTTCAGGGCGCCATGATGTACGGCACCT
ΔNt-CARP1.REV	GACGGAGCTCGAATTTTATTAGGCTTCGGGCTCAAT
Dom1.REV	GACGGAGCTCGAATTTTATTACACTTCGGGACTCAGATG
Dom2.FWD	GTATTTTCAGGGCGCCCGCGTGGAACTGCTGTCCG
Dom2.REV	GACGGAGCTCGAATTTTATTAGCTCTTAGCGGCACTACG
CARP2.FWD	GTATTTTCAGGGCGCCCGCGCAGGCCGATAATGATCTTTTC
CARP2.REV	GACGGAGCTCGAATTTTATTAGTCTTACGACGTGTCACATGA
CARP3.FWD	GTATTTTCAGGGCGCCATGGGAAACGGCGCCTCAGT
CARP3.REV	GACGGAGCTCGAATTTTCAAACATCATAAAGAGGGAGCCGCC
CARP4.FWD	GTATTTTCAGGGCGCCATGAAAAACAGTGTGGTGCGC
CARP4(1-396).REV	GACGGAGCTCGAATTTTATTATTCCCGTGTAAGAATCGG
CARP4(381-782).FWD	GTATTTTCAGGGCGCCCGCAGACCGTATTACATTTATGACCGCC
CARP4.REV	GACGGAGCTCGAATTTTACAAGGTGTTATCCTGATCTGTG

**Tabla 6.** Primers utilizados en el clonado de las proteínas CARPs mediante la técnica de “in fusion cloning” (Universidad de Leicester).

### 3. Optimización de las condiciones de purificación

Se optimizaron las condiciones de purificación de las proteínas CARPs en cada uno de los pasos mencionados en la sección “Preparación de extractos proteicos”.

En el caso de la expresión de las proteínas recombinantes, las variables analizadas fueron:

- Las bacterias *E. coli*: cepa BL21(DE3), Rosetta™(DE3)pLysS (Cam<sup>R</sup>) y Rosetta-gami(DE3)pLysS (Cam<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup> y Tet<sup>R</sup>).
- Las condiciones de expresión: concentración de IPTG (0.2, 0.5 y 1 mM), tiempo de inducción después del agregado de IPTG (3 y 16 hs) y temperatura durante la inducción (18, 28 y 37°C).

Luego de la inducción de las proteínas de expresión se realiza la lisis bacteriana. En este caso, las variables analizadas fueron:

- Buffer de resuspensión:

R1	50 mM NaPi; 500 mM NaCl; 0.2% CHAPS; 1 mM DTT; inh.proteasas.
R2	Master Mix BugBuster® (1% Triton x-100).
R3	50 mM NaPi; 140 mM NaCl (pH 8).
R4	50 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl (pH 7.8).

- Método de lisis:

- o Mecánico: se utilizó un sonicador o un equipo de disrupción celular (*Cell disruptor*).
- o Químico: se utilizaron los siguientes buffers de lisis.

Lisis 1	50 mM NaPi; 140 mM NaCl; 0.7% Sarkosyl.
Lisis 2	50 mM NaPi; 140 mM NaCl; 0.2 mg/ml Lisozima; 1% Sarkosyl.
Lisis 3	50 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 10 mM B-ME; 0.7% Sarkosyl.
Lisis 4	50 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 10 mM B-ME; 1% Tween20.
Lisis 5	50 mM NaPi; 500 mM NaCl; 0.2 mg/ml Lisozima; 1% Sarkosyl.
Lisis 6	BugBuster® Master Mix
Lisis 7	50 mM HEPES; 150 mM NaCl; 25% Sucrosa; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1% Triton-x100; 5 mM BME; inh. proteasas, DNAsaI, Lisozima.

Finalmente, los sobrenadantes se purificaron mediante resina de agarosa, utilizando los siguientes buffers de lavado y elución.

- Buffer de lavado:

L1	50 mM TrisHCL (pH 7.8), 200 mM NaCl; 1 mM DTT.
L2	50 mM TrisHCL (pH 7.8), 150 mM NaCl; 30 mM imidazole.
L3	50 mM NaPi; 140 mM NaCl; 30 mM imidazole (NiNTA).
L4	50 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 30 mM imidazole.

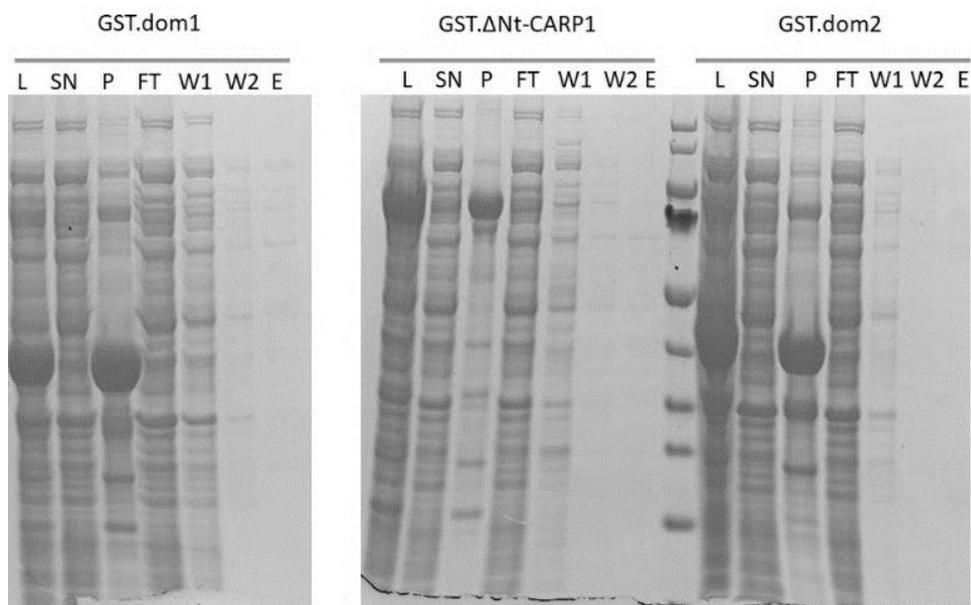
- Buffer de elución:

E1	50 mM TrisHCL (pH7.8), 200 mM NaCl, 20 mM GSH.
E2	50 mM TrisHCL (pH7.8), 150 mM NaCl, 0.5 M imidazole.
E3a	50 mM NaPi; 140 mM NaCl; 20 mM GSH.
E3b	50 mM NaPi; 140 mM NaCl; 0.5 M imidazole.
E4	50 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 0.5 M imidazole.
E5	50 mM NaPi; 140 mM NaCl; 50 mM GSH.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos durante el proceso de optimización.

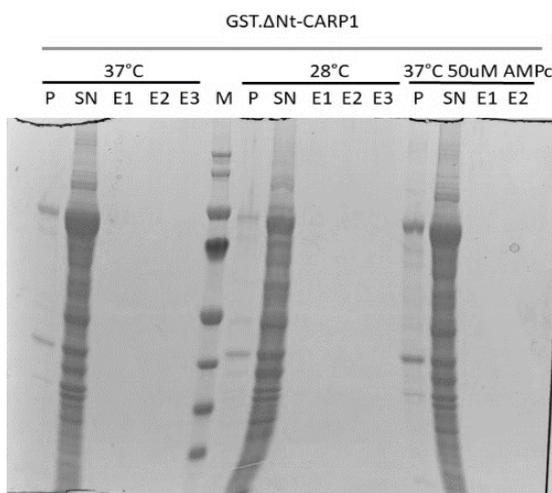
### **Resina agarosa-GSH:**

- Bacterias Rosetta™ se transformaron con los vectores pLEICs14-ΔNt-CARP1, pLEICs14-CARP1-dom1 y pLEICs14-CARP1-dom2. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R1 y se lisaron mediante el uso de un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-GSH, se lavaron con buffer L1 y se eluyeron con buffer E1. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 64).



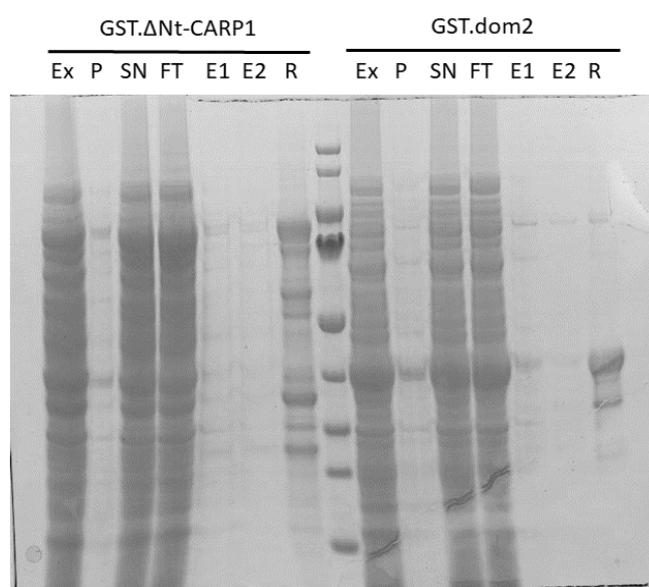
**Figura 64.** SDS-PAGE 10% de la purificación con resina GST de GST.ΔNt-CARP1 y dominios CBDs de CARP1. L: Lisado pre-centrifugado, SN: sobrenadante, P: pellet, FT: Flow-through, Wx: lavados, E: eluído. Detergente usado: 0.2% CHAPS.

- b) Bacterias BL21(DE3) se transformaron con el vector pLEICs14-ΔNt-CARP1. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 28 y 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 1 y pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-GSH, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E3a. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 65).



**Figura 65.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina GST de los lisados que sobreexpresaban GST.ΔNt-CARP1. SN: sobrenadante, P: pellet, Ex: eluídos. Detergente usado: 1% Sarkosyl.

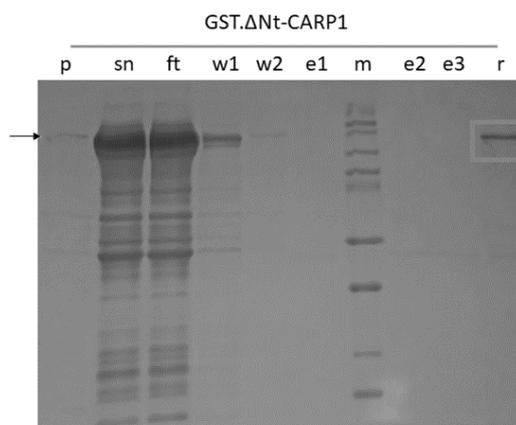
c) Bacterias Rosetta™-gami se transformaron con los vectores pLEICs14-ΔNt-CARP1 y pLEICs14-CARP1-dom2. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.2 mM de IPTG durante 16 hs a 18°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 1 y pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-GSH, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E3a. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 66).



**Figura 66.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina GST de los lisados que sobreexpresaban GST.ΔNt-CARP1 y GST.dom2. Ex: Extracto celular, SN: sobrenadante, P: pellet, Ex: eluidos, FT: Flow-through, R: resina post-elución. Detergente usado: 1% Sarkosyl.

d) Bacterias BL21(DE3) se transformaron con el vector pLEICs14-ΔNt-CARP1. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 16 hs a 18°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 2, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi) y luego sonicando 4 veces a una amplitud de 50% durante 20 seg., intercalando 30 seg. de incubación en hielo. Luego, se incubaron con una resina de agarosa-GSH, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E5.

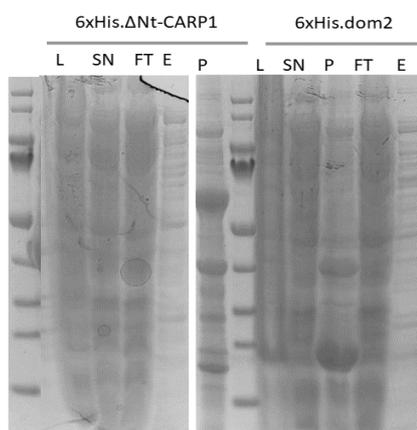
Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 67).



**Figura 67.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina GST de los lisados que sobreexpresaban GST.ΔNt-CARP1, utilizando 0.7% sarkosyl. M: marker, SN: sobrenadante, P: pellet, FT: Flow-through, Wx: lavados, Ex: eluidos, R: resina post-elución.

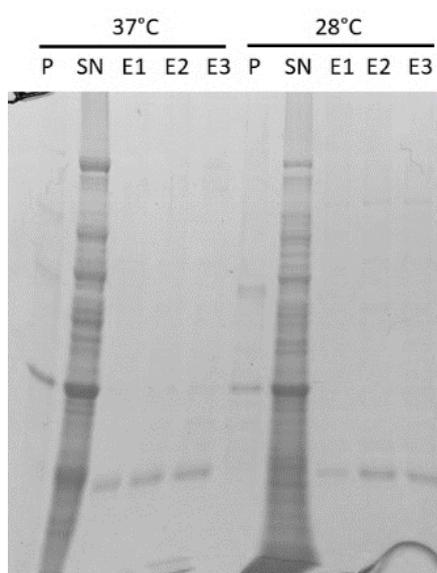
### Resina agarosa-NiNTA:

- a) Bacterias Rosetta™-gami se transformaron con los vectores pLEICs93-CARP1-dom1 y pLEICs93-CARP1-dom2. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer de lisis 6 y se pasaron por un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L2 y se eluyeron con buffer E2. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 68).



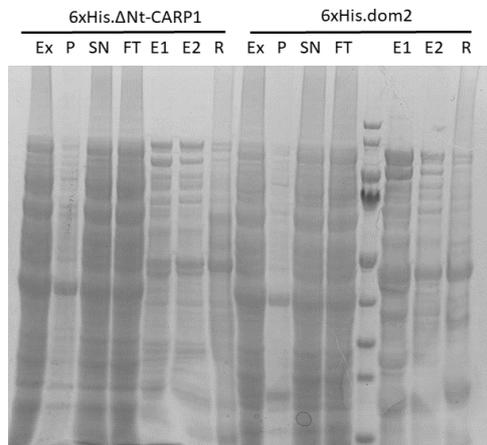
**Figura 68.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina NiNTA de los lisados que sobreexpresaban ΔNt-CARP1 y el dominio CBD 2 de CARP1 (6xHis.dom2). L: Lisado pre-centrifugado, SN: sobrenadante, P: pellet, FT: Flow-through, E: eluido. Detergente usado: Master Mix BugBuster (1% Triton x100).

b) Bacterias BL21(DE3) se transformaron con el vector pLEICs93- $\Delta$ Nt-CARP1. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 28 y 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 1 y pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E3b. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 69).



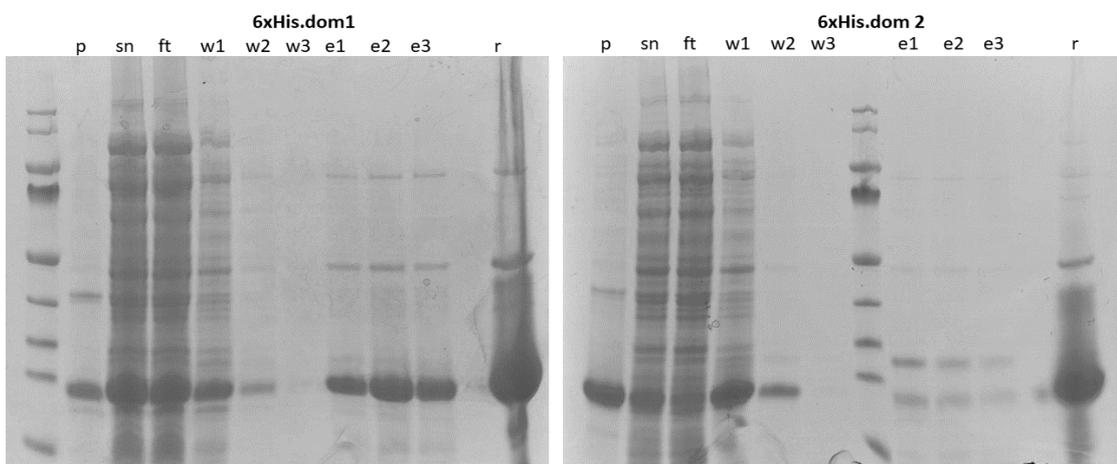
**Figura 69.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina NiNTA de los lisados que sobreexpresaban GST. $\Delta$ Nt-CARP1 y 6xHis. $\Delta$ Nt-CARP1. SN: sobrenadante, P: pellet, Ex: eluidos. Detergente usado: 1% Sarkosyl.

c) Bacterias Rosetta<sup>TM</sup>-gami se transformaron con los vectores pLEICs93- $\Delta$ Nt-CARP1 y pLEICs93-CARP1-dom2. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.2 mM de IPTG durante 16 hs a 18°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 1 y pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E3b. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 70).



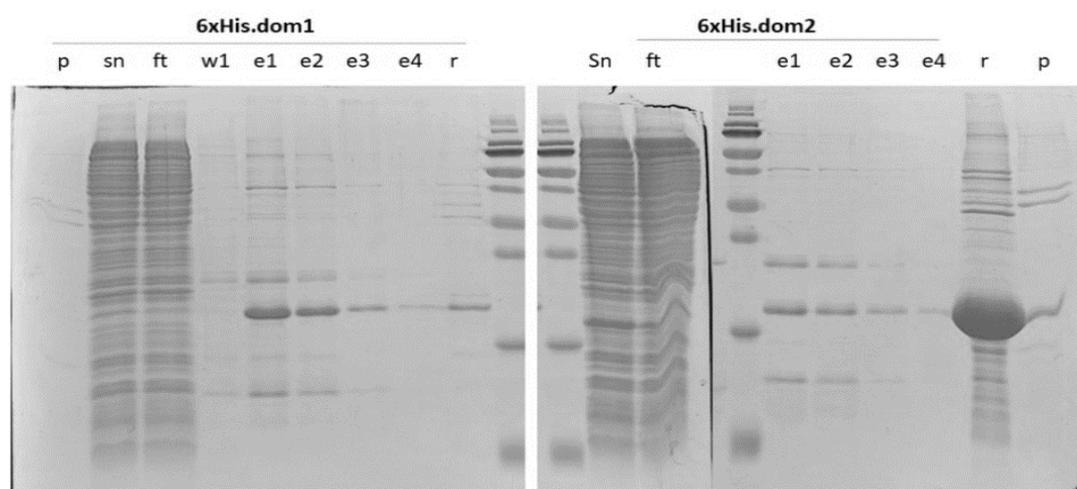
**Figura 70.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina NiNTA de los lisados que sobreexpresaban 6xHis.ΔNt-CARP1 y 6xHis.dom2. Ex: Extracto celular, SN: sobrenadante, P: pellet, Ex: eluidos, FT: Flow-through, R: resina post-elución. Detergente usado: 1% Sarkosyl.

d) Bacterias Rosetta™-gami se transformaron con los vectores pLEICs93-CARP1-dom1 y pLEICs93-CARP1-dom2. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 2, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi) y luego sonicando 4 veces a una amplitud de 50% durante 20 seg., intercalando 30 seg. de incubación en hielo. Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E3b. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 71).



**Figura 71.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina NiNTA de los lisados (Rosetta™-gami) que sobreexpresaban 6xHis.dom1 y 6xHis.dom2. SN: sobrenadante, P: pellet, FT: Flow-through, Wx: lavados, Ex: eluidos, R: resina post-elución. Detergente usado: 1% Sarkosyl.

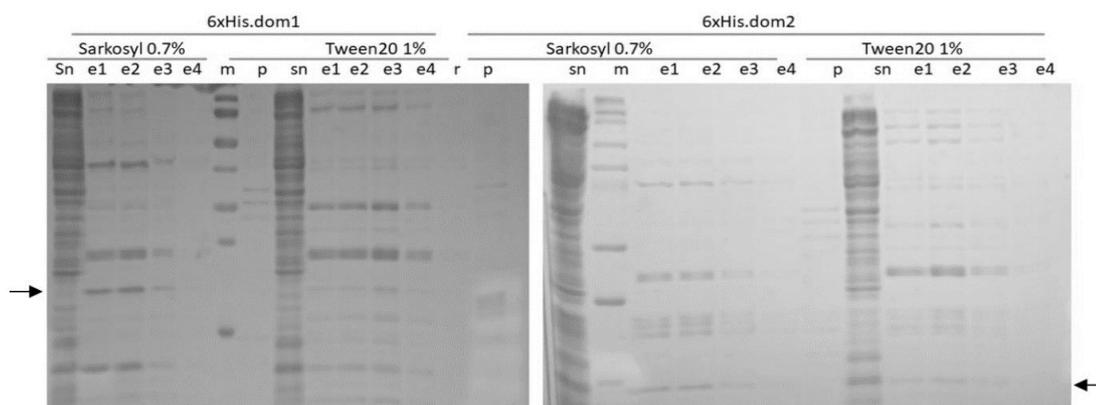
- e) Bacterias BL21(DE3) se transformaron con los vectores pLEICs93-CARP1-dom1 y pLEICs93-CARP1-dom2. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.2 mM de IPTG durante 16 hs a 18°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R4 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 3, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi) y luego sonicando 4 veces a una amplitud de 50% durante 20 seg., intercalando 30 seg. de incubación en hielo. Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L4 y se eluyeron con buffer E4. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 72).



**Figura 72.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina NiNTA de los lisados (BL21) que sobreexpresaban 6xHis.dom1 y 6xHis.dom2. SN: sobrenadante, P: pellet, FT: Flow-through, Wx: lavados, Ex: eluidos, R: resina post-elución. Detergente usado: 0.7% Sarkosyl.

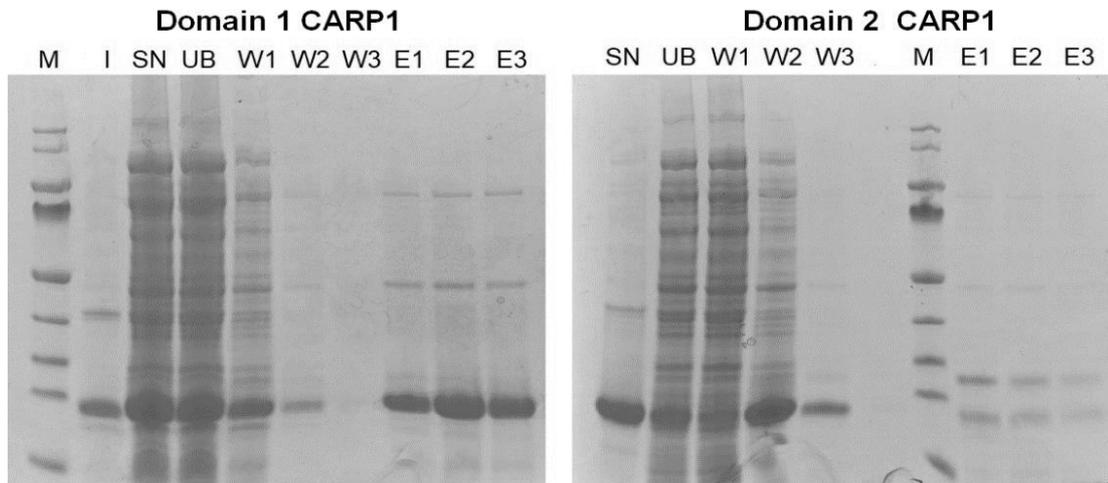
- f) Bacterias BL21(DE3) se transformaron con los vectores pLEICs93-CARP1-dom1 y pLEICs93-CARP1-dom2. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.2 mM de IPTG durante 16 hs a 18°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R4 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 4, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi) y luego sonicando 4 veces a una amplitud de 50% durante 20 seg., intercalando 30 seg. de

incubación en hielo. Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L4 y se eluyeron con buffer E4. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 73).



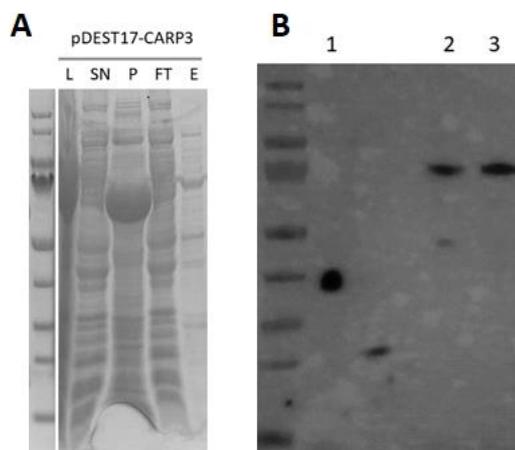
**Figura 73.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina NiNTA de los lisados que sobreexpresaban 6xHis.dom1 y 6xHis.dom2 utilizando 0.7% sarkosyl o 1% Tween20 como detergentes. M: marker, SN: sobrenadante, P: pellet, FT: Flow-through, Wx: lavados, Ex: eluidos, R: resina post-elución. La distancia esperada de los dominios según su peso molecular se marca con una flecha.

- g) Bacterias BL21(DE3) se transformaron con los vectores pLEICs93-CARP1-dom1 y pLEICs93-CARP1-dom2. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 5, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi) y luego sonicando 4 veces a una amplitud de 50% durante 20 seg., intercalando 30 seg. de incubación en hielo. Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E3b. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 74).



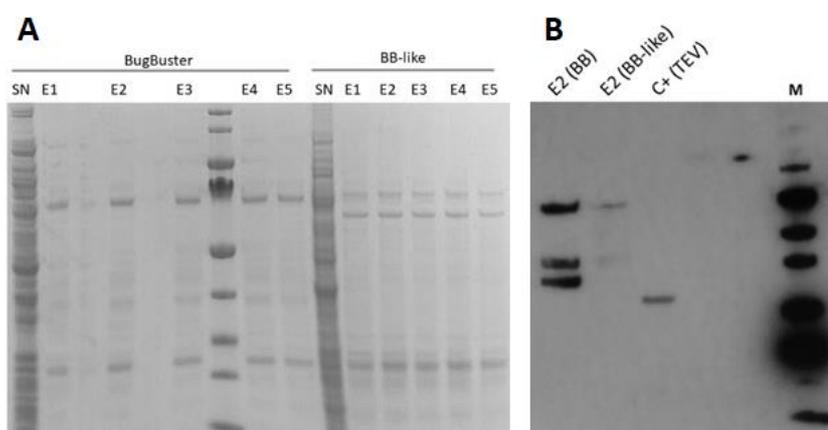
**Figura 74.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina NiNTA de los lisados (BL21) que sobreexpresaban los dominios 1 y 2 de CARP1 utilizando 0.7% sarkosyl. M: marker, I: input, SN: sobrenadante, UB: Flow-through, Wx: lavados, Ex: eluidos.

- h) Bacterias Rosetta™-gami se transformaron con el vector pDEST™-17-CARP3. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R2 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 6, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L2 y se eluyeron con buffer E2. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 75).



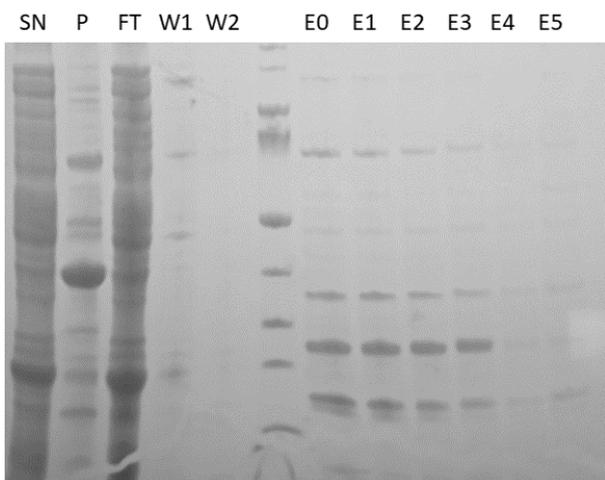
**Figura 75.** (A) SDS-PAGE 10% de la purificación con resina NiNTA de pDEST17-CARP3. L: Lisado pre-centrifugado, SN: sobrenadante, P: pellet, FT: Flow-through, E: eluido. Detergente usado: Master Mix BugBuster (1% Tritón x100). (B) WB de pDEST17-CARP3 SN (2) y eluido (3). 1: Control positivo (TEV).

- i) Bacterias Rosetta™-gami se transformaron con el vector pDEST™-17-CARP3. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R5 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 7, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L2 y se eluyeron con buffer E2. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 76).



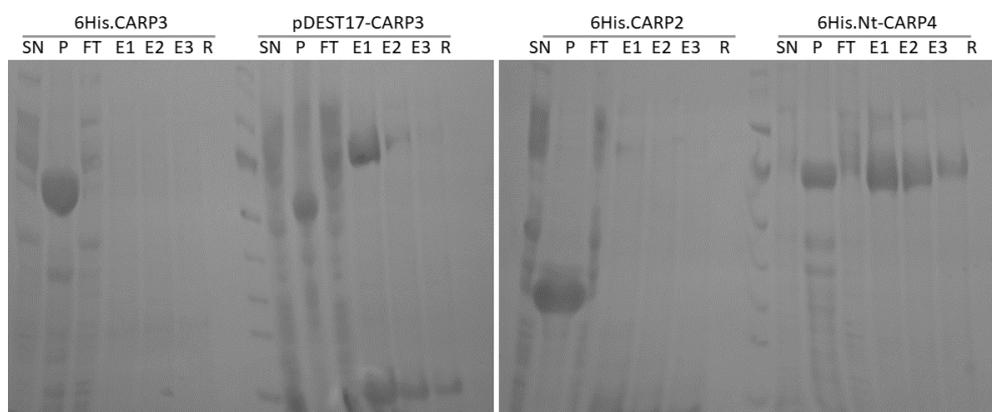
**Figura 76.** (A) SDS-PAGE 10% de la purificación con resina NiNTA de pDEST17-CARP3. SN: sobrenadante, E: eluido. (B) WB de los eluidos E2 (BB) y E2 (BB-like).

- j) Bacterias Rosetta™-gami se transformaron con el vector pDEST™-17-CARP3. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 2, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi) y luego sonicando 4 veces a una amplitud de 50% durante 20 seg., intercalando 30 seg. de incubación en hielo. Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E3b. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 77).



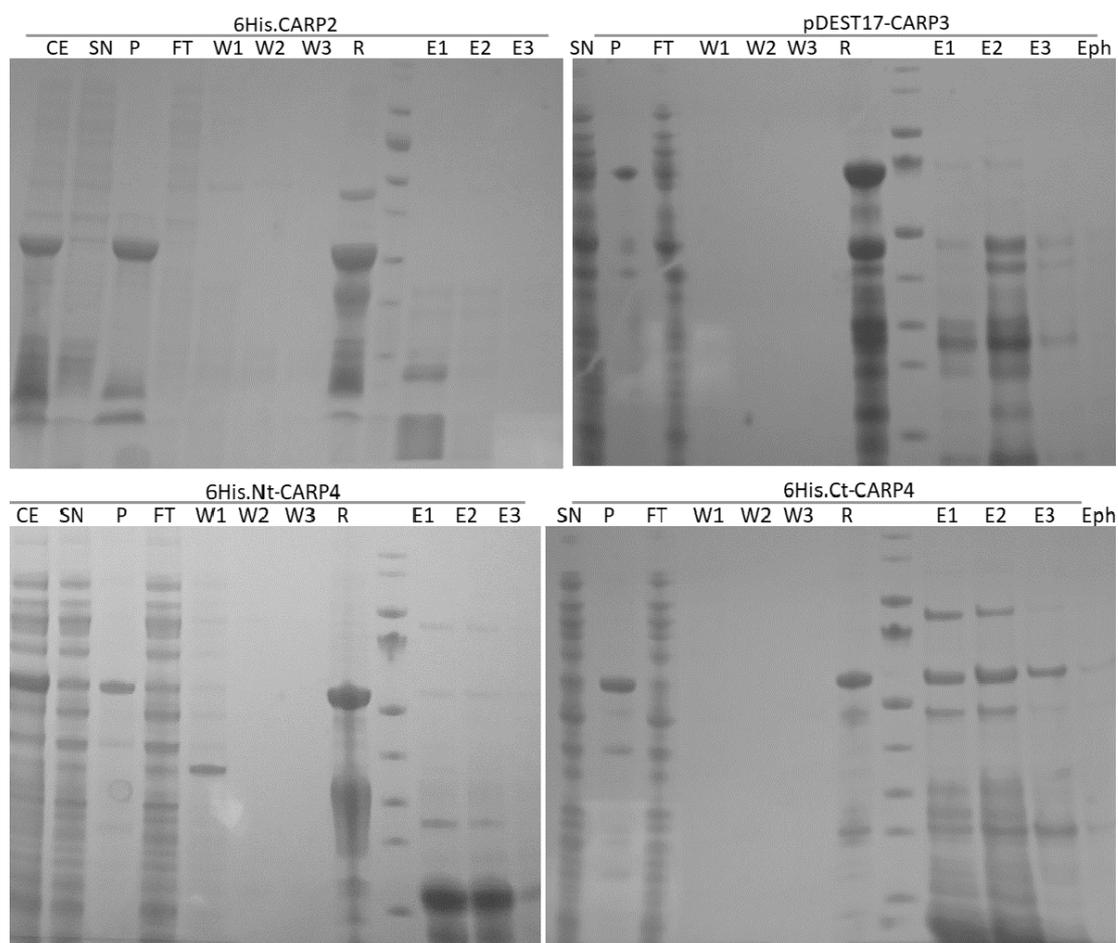
**Figura 77.** SDS-PAGE 10% de las muestras obtenidas de la purificación con resina NiNTA de los lisados (BL21) que sobreexpresaban pDEST17-CARP3. SN: sobrenadante, P: pellet, Wx: lavados, Ex: eluidos, FT: Flow-through.

k) Bacterias Rosetta™-gami se transformaron con los vectores pLEICS-93-CARP2, pLEICS-93-CARP3, pDEST™-17-CARP3 y pLEICS-93-CARP4(1-396). Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R2 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 6, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L2 y se eluyeron con buffer E2. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 78).



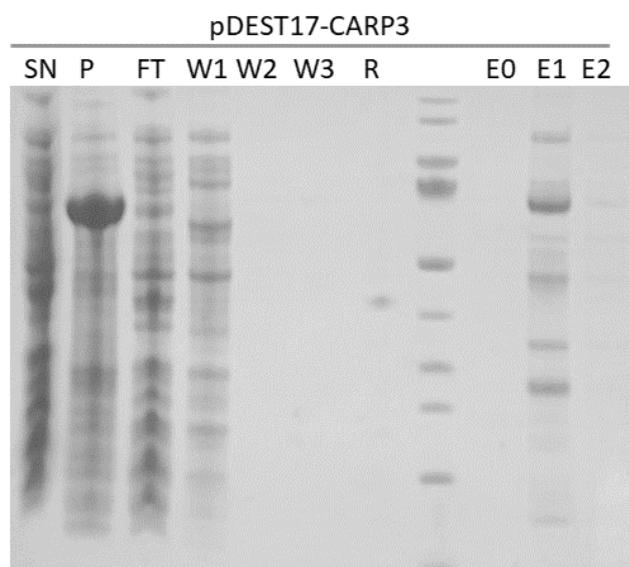
**Figura 78.** SDS-PAGE 10% las muestras obtenidas de la purificación con resina NiNTA de los lisados (BL21) que sobreexpresaban las proteínas CARPs (2-4). L: Lisado pre-centrifugado, SN: sobrenadante, P: pellet, FT: Flow-through, E: eluido. Detergente usado: Master Mix BugBuster (1% Tritón x100).

- 1) Bacterias Rosetta™-gami se transformaron con los vectores pLEICS-93-CARP2, pDEST™-17-CARP3, pLEICS-93-CARP4(1-396) y pLEICS-93-CARP4(381-782). Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un buffer de lisis 2, pasando el lisado por un *Cell disruptor* (28 kpsi) y luego sonicando 4 veces a una amplitud de 50% durante 20 seg., intercalando 30 seg. de incubación en hielo. Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E3b. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 79).



**Figura 79.** SDS-PAGE 10% de la purificación con resina NiNTA de 6His.CARP2, 3 y 4 (Nt, Ct). Ex: Extracto celular, SN: sobrenadante, P: pellet, Ex: eluidos, FT: Flow-through, R: resina post-elución, Eph: eluido a pH 6.2. Detergente usado: 0.7% Sarkosyl.

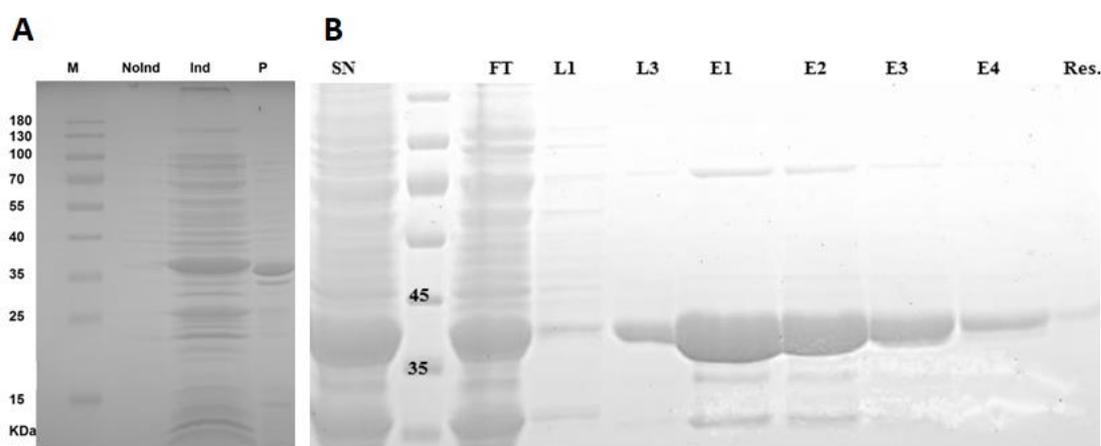
m) Bacterias BL21(DE3) se transformaron con el vector pDEST<sup>TM</sup>-17-CARP3. Se crecieron a 37°C hasta una DO=0.5 y se indujeron con 0.5 mM de IPTG durante 3 hs a 37°C. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en buffer R3 y se lisaron mediante el uso de un *Cell disruptor* (28 kpsi). Luego, se incubaron con una resina de agarosa-NiNTA, se lavaron con buffer L3 y se eluyeron con buffer E3b. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie (Figura 80).



**Figura 80.** SDS-PAGE 10% de la purificación con resina NiNTA de pDEST17-CARP3. SN: sobrenadante, Wx: lavados, P: pellet, Ex: eluidos, FT: Flow-through, R: resina post-elución. Detergente usado: Master Mix BugBuster.

#### 4. Puesta a punto del ensayo de precipitación diferencial

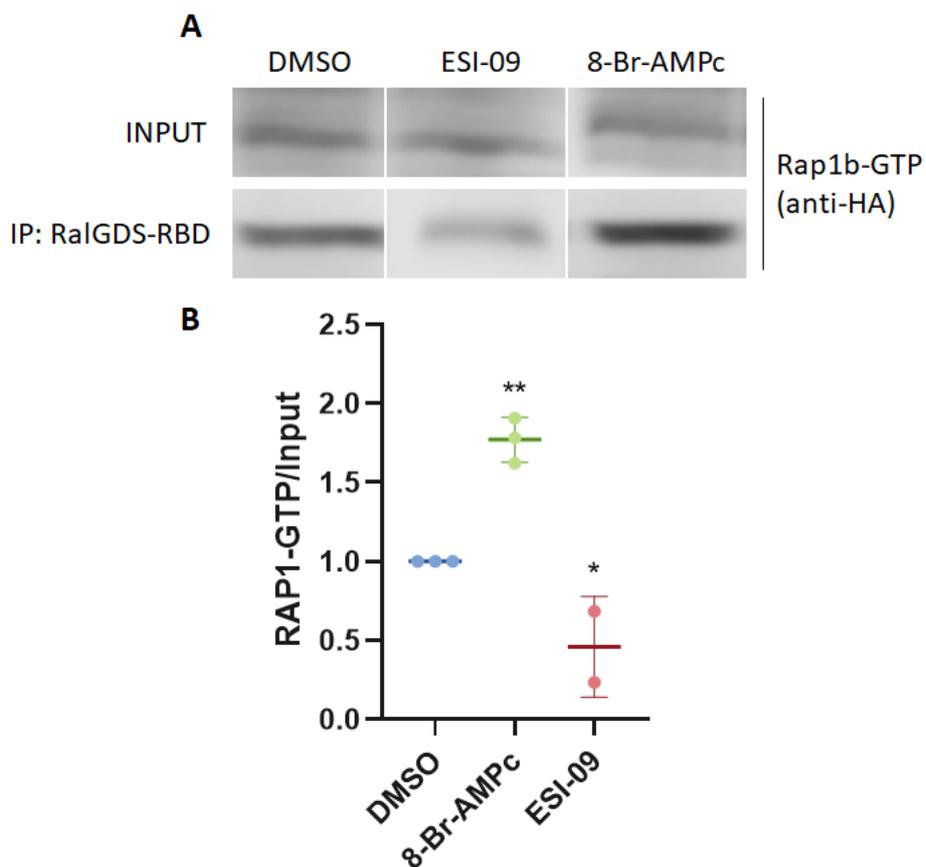
Bacterias *E. coli* BL21 transformadas con el vector pGEX(3X)-RalGDS-RBD se crecieron a 37°C hasta OD=0.5 y se indujeron con 0.5 mM IPTG a 37°C durante 3 hs. Luego, se lisaron con el fin de obtener un extracto de proteínas citoplasmáticas. Tanto los extractos como el cultivo antes de lisar se sembraron en un gel SDS-PAGE 12% (Figura 81-A). La inducción con IPTG resultó satisfactoria observándose una banda de mayor intensidad en la calle que corresponde a la inducción; de tamaño correspondiente a la proteína de fusión RBD-GST, luego de realizado el lisado (Calle “Ind”). Una vez obtenida la proteína de fusión se procedió a realizar la unión de la misma mediante la proteína GST a una resina de agarosa-GSH, como se explica en “Purificación de proteínas con resina glutatión-agarosa”. La figura 81-B corresponde al ensayo de precipitación diferencial con resina agarosa-GSH. Se observa una buena elución con GSH libre (Calle “E”).



**Figura 81.** (A) SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie Brilliant Blue G-250. M: Marker; NoInd: BL21-RBD no inducido con IPTG; Ind: Sobrenadante resultante del lisado de bacterias BL21-RBD inducidas con IPTG 0.5 mM; P: Pellet resultante del lisado de BL21-RBD inducido. (B) Ensayo de precipitación diferencial con resina agarosa-GSH. SN: Extracto resultado de la lisis de bacterias BL21-RBD sobreexpresando la proteína de fusión Ral-GDS-RBD-GST; FT: flow-through; L(1,3): Lavados; E(1-4): eluidos; Res: resina post-elución.

Una vez obtenido el dominio RalGDS-RBD-GST unido a la resina de agarosa se procedió a verificar que efectivamente la “precipitación diferencial” de Rap1b-HA funcione correctamente. Para lograrlo, se realizó el procedimiento descrito en

“Ensayo de precipitación diferencial” utilizando lisados de células HELA transfectadas con el vector pCGN-3 (HA-Rap1b) y pretratadas con un análogo permeable del AMPc (8-Br-AMPc; control positivo) o con el inhibidor específico de Epac (ESI-09; control negativo). Como puede observarse en la figura 82, hay una mayor cantidad relativa de Rap1b al aumentar los niveles de AMPc intracelular y, al inhibir la proteína Epac, que promueve la activación de Rap1b, se observa una menor cantidad relativa de esta GTPasa activa. Con estos resultados se finalizó la puesta a punto del ensayo.

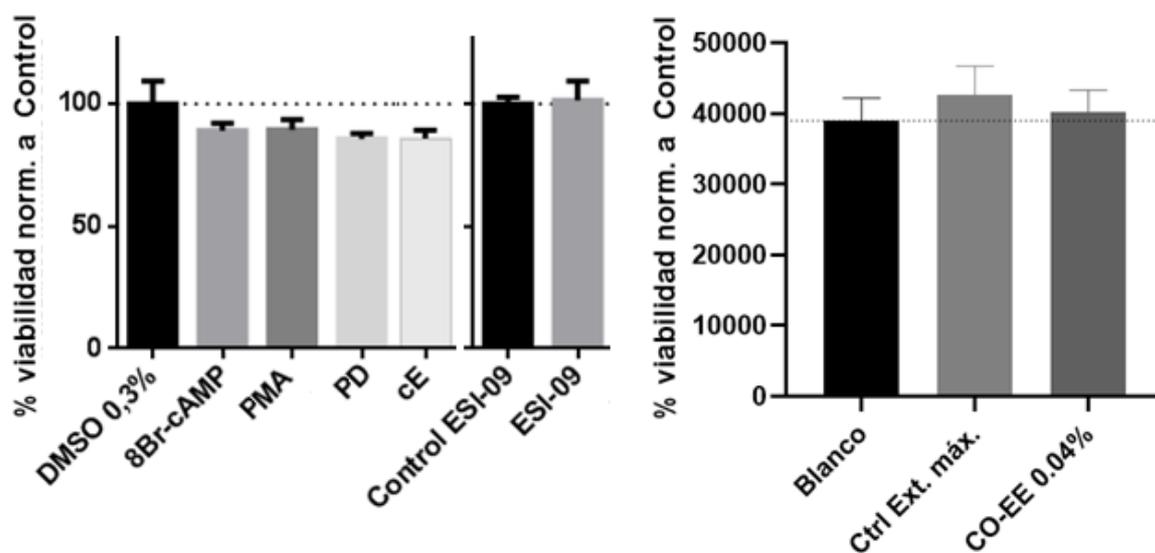


**Figura 82.** (A) Células HELA transfectadas con el vector pCGN-S179 (HA-Rap1b wild type) se pretrataron con DMSO, ESI-09 (37.5  $\mu$ M) o 8-Br-AMPc (300  $\mu$ M) durante 30 minutos. Luego, se lisaron y los lisados se sometieron a ensayo de precipitación diferencial utilizando una resina de agarosa-GST-Ral-GDS-RBD. Los niveles de Rap1b activo (unido a GTP) se determinaron mediante WB usando un anticuerpo anti-HA (Roche) y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a HRP (Santa Cruz Biotechnology). (B) Las intensidades de las bandas se cuantificaron con el programa ImageJ. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ; ANOVA y post test de Dunnett.

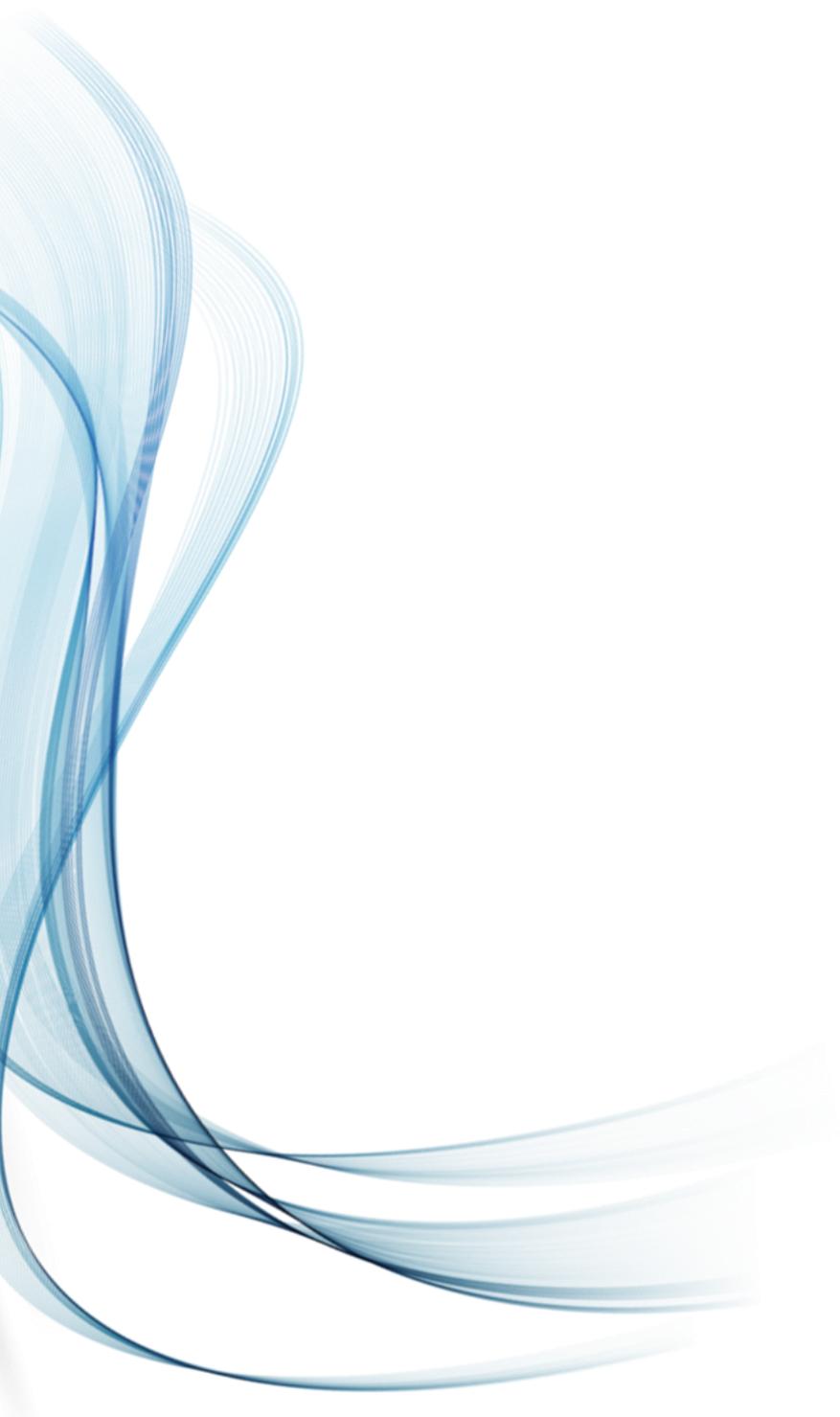
## 5. Control de citotoxicidad de las drogas/extractos utilizados

Con el fin de analizar la citotoxicidad de los reactivos utilizados en los pretratamientos de las células utilizadas en los ensayos de invasión se realizó un ensayo de citotoxicidad y se comparó la diferencia con el control (blanco o DMSO). Células NRK, HELA o HL-1 se crecieron por 24 hs. Luego, se incubaron con los fármacos correspondientes por 30 minutos o 1 hora (dependiendo el tratamiento utilizado). Se lavaron e incubaron en DMEM nuevamente. Las células se tiñeron con cristal violeta para analizar la citotoxicidad de los compuestos (ver “Ensayo de citotoxicidad con cristal violeta”).

Como se observa en la Figura 83, los fármacos a las concentraciones ensayadas no tuvieron efecto citotóxico significativo en las células analizadas.



**Figura 83.** Ensayo de citotoxicidad. Células NRK, HELA o HL-1 se incubaron con los tratamientos indicados por 30 min (PMA 100 nM o PD98059 50  $\mu$ M) o 1 hora (8Br-AMPc 300  $\mu$ M, cE, ESI-09 37.5  $\mu$ M, CO-EE 0.04%). Pasados los tiempos de incubación se realizó una tinción con cristal violeta y se midió la absorbancia a 600 nm.



# Bibliografía

## Bibliografía

- Adesse, D., Garzoni, L. R., Huang, H., Tanowitz, H. B., de Nazareth Meirelles, M., and Spray, D. C. (2008). Trypanosoma cruzi induces changes in cardiac connexin43 expression. *Microbes Infect.* 10, 21–28. doi:10.1016/j.micinf.2007.09.017.
- Ahmed, A., Boulton, S., Shao, H., Akimoto, M., Natarajan, A., Cheng, X., et al. (2019). Recent Advances in EPAC-Targeted Therapies: A Biophysical Perspective. *Cells* 8. doi:10.3390/cells8111462.
- Alasbahi, R. H., and Melzig, M. F. (2010). Plectranthus barbatus: A review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology part 1. *Planta Med.* 76, 653–661. doi:10.1055/s-0029-1240898.
- Alba Soto, C. D., and González Cappa, S. M. (2019). “Trypanosoma cruzi Journey from the Insect Vector to the Host Cell,” in *Chagas Disease: A Clinical Approach*, eds. J. M. Altcheh and H. Freilij (Springer International Publishing: Cham, Switerland), 25–59. doi:10.1007/978-3-030-00054-7\_2.
- Altschuler, D., and Lapetina, E. G. (1993). Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b. *J. Biol. Chem.* 268, 7527–7531. doi:10.1016/S0021-9258(18)53207-5.
- Amunjela, J. N., Swan, A. H., and Brand, T. (2019). The Role of the Popeye Domain Containing Gene Family in Organ Homeostasis. *Cells* 8, 1–23. doi:10.3390/cells8121594.
- Andrews, N. W. (1995). Lysosome recruitment during host cell invasion by Trypanosoma cruzi. *Trends Cell Biol* 5, 133–137. doi:S0962892400889655 [pii].
- Andrews, N. W., Abrams, C. K., Slatin, S. L., and Griffiths, G. (1990). A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: Evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61, 1277–87. doi:10.1016/0092-8674(90)90692-8.
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., et al. (2004). A 9,000-year record of Chagas’ disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2034–2039. doi:10.1073/pnas.0307312101.
- B Zingales, S. A., , MRS Briones, D. C., , E Chiari, O. F., Guhl, F., , E Lages-Silva, A. M., Machado, C., et al. (2009). A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054.
- Bachmaier, S. (2015). Evolutionary repurposing of cAMP and PKA signaling pathways in kinetoplastids.
- Bachmaier, S., Volpato Santos, Y., Kramer, S., Githure, G. B., Klöckner, T., Pepperl, J.,

- et al. (2019). Nucleoside analogue activators of cyclic AMP-independent protein kinase A of *Trypanosoma*. *Nat. Commun.* 10, 1–14. doi:10.1038/s41467-019-09338-z.
- Bao, Y., Weiss, L. M., Braunstein, V. L., and Huang, H. (2008). Role of Protein Kinase A in *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 76, 4757–4763. doi:10.1128/IAI.00527-08.
- Barnabé, C., Mobarec, H. I., Jurado, M. R., Cortez, J. A., and Brenière, S. F. (2016). Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. *Infect. Genet. Evol.* 39, 176–186. doi:10.1016/j.meegid.2016.01.029.
- Barros-Alvarez, X., Gualdrón-López, M., Acosta, H., Cáceres, A. J., Graminha, M. A. S., Michels, P. A. M., et al. (2014). Glycosomal targets for anti-trypanosomatid drug discovery. *Curr. Med. Chem.* 21, 1679–1706. doi:10.2174/09298673113209990139.
- Batista, M. F., Nájera, C. A., Meneghelli, I., and Bahia, D. (2020). The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 396. doi:10.3389/fcell.2020.00396.
- Belew, A. T., Junqueira, C., Rodrigues-Luiz, G. F., Valente, B. M., Oliveira, A. E. R., Polidoro, R. B., et al. (2017). Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. *PLoS Pathog.* 13, 1–23. doi:10.1371/journal.ppat.1006767.
- Benassi, M., and Giunta, G. (2019). Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza. *Rev. Argent. Cardiol.* 79, 544–564.
- Benatar, A. F., García, G. A., Bua, J., Cerliani, J. P., Postan, M., Tasso, L. M., et al. (2015). Galectin-1 Prevents Infection and Damage Induced by *Trypanosoma cruzi* on Cardiac Cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–23. doi:10.1371/journal.pntd.0004148.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., and Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819–826. doi:10.1016/0092-8674(86)90063-2.
- Berná, L., Rodríguez, M., Chiribao, M. L., Parodi-Talice, A., Pita, S., Rijo, G., et al. (2018). Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microb. genomics* 4, e000177. doi:10.1099/mgen.0.000177.
- Bhattacharya, A., Biswas, A., and Das, P. K. (2008). Role of intracellular cAMP in differentiation-coupled induction of resistance against oxidative damage in *Leishmaniadonovani*. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 779–794. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.059.
- Bhattacharya, A., Biswas, A., and Das, P. K. (2009). Role of a differentially expressed

- cAMP phosphodiesterase in regulating the induction of resistance against oxidative damage in *Leishmania donovani*. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1494–1506. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.025.
- Bodemann, B. O., Orvedahl, A., Cheng, T., Ram, R. R., Ou, Y. H., Formstecher, E., et al. (2011). RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2010.12.018.
- Böker, C. A., and Schaub, G. A. (1984). Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. *Zeitschrift für Parasitenkd. Parasitol. Res.* 70, 459–469. doi:10.1007/BF00926686.
- Bonfim-Melo, A., Ferreira, E. R., Florentino, P. T. V., and Mortara, R. A. (2018a). Amastigote synapse: The tricks of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. *Front. Microbiol.* 9, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2018.01341.
- Bonfim-Melo, A., Ferreira, É. R., and Mortara, R. A. (2018b). Rac1/WAVE2 and Cdc42/N-WASP participation in actin-dependent host cell invasion by extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Front. Microbiol.* 9, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2018.00360.
- Bonney, K. M. (2014). Chagas disease in the 21st Century: A public health success or an emerging threat? *Parasite* 21. doi:10.1051/parasite/2014012.
- Borges, B. C., Uehara, I. A., Dias, L. O. S., Brígido, P. C., da Silva, C. V., and Silva, M. J. B. (2016). Mechanisms of infectivity and evasion derived from microvesicles cargo produced by *Trypanosoma cruzi*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 161. doi:10.3389/fcimb.2016.00161.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117–127. doi:10.1038/349117a0.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Briceño-León, R., and Galván, J. M. (2007). The social determinants of Chagas disease and the transformations of Latin America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 109–112. doi:10.1590/S0074-02762007005000095.
- Bridges, D. J., Pitt, A. R., Hanrahan, O., Brennan, K., Voorheis, H. P., Herzyk, P., et al. (2008). Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* 8, 83–99. doi:10.1002/pmic.200700607.
- Bueno, O. F., and Molkenin, J. D. (2002). Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 in Cardiac Hypertrophy and Cell Death. *Circ. Res.* 91, 776–781. doi:10.1161/01.RES.0000038488.38975.1A.
- Calvet, C. M., Melo, T. G., Garzoni, L. R., Oliveira, F. O. R., Silva Neto, D. T., Meirelles,

- M. N. S. L., et al. (2012). Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction. *Front. Immunol.* 3, 1–8. doi:10.3389/fimmu.2012.00327.
- Cánepa, G. E., Degese, M. S., Budu, A., Garcia, C. R. S., and Buscaglia, C. A. (2012). Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells 1. *Biochem. J.* 444, 211–218. doi:10.1042/BJ20120074.
- Carrier, Y., and Truyens, C. (2017). *Maternal-fetal transmission of Trypanosoma cruzi*. Second Edi. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-801029-7.00024-1.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159–218. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761909000200008&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&nrm=iso).
- Chayen, N. E., and Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: From purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat. Methods* 5, 147–153. doi:10.1038/nmeth.f.203.
- Che, X., Wang, X., Zhang, J., Peng, C., Zhen, Y., Shao, X., et al. (2016). Vitexin exerts cardioprotective effect on chronic myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibiting myocardial apoptosis and lipid peroxidation. *Am. J. Transl. Res.* 8, 3319–3328.
- Chiricozzi, A., Caposiena, D., Garofalo, V., Cannizzaro, M. V., Chimenti, S., and Saraceno, R. (2016). A new therapeutic for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: Apremilast. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 12, 237–249. doi:10.1586/1744666X.2016.1134319.
- Chuenkova, M. V., and Pereira, M. A. (2001). The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. *Neuroreport* 12, 3715–3718. doi:10.1097/00001756-200112040-00022.
- Claycomb, W. C., Lanson, N. A. J., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., et al. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2979–2984. doi:10.1073/pnas.95.6.2979.
- Clayton, C. (2019). Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription. *Open Biol.* 9. doi:10.1098/rsob.190072.
- Clemente, T. M., Cortez, C., Novaes, A. da S., and Yoshida, N. (2016). Surface Molecules Released by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms Downregulate Host Cell Invasion. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–18. doi:10.1371/journal.pntd.0004883.
- Combs, T. P., Nagajyothi, Mukherjee, S., De Almeida, C. J. G., Jelicks, L. A., Schubert, W., et al. (2005). The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Biol. Chem.* 280, 24085–24094. doi:10.1074/jbc.M412802200.

- Conteh, L., Engels, T., and Molyneux, D. H. (2010). Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *Lancet* 375, 239–247. doi:10.1016/S0140-6736(09)61422-7.
- Cuevas-Durán, R. E., Medrano-Rodríguez, J. C., Sánchez-Aguilar, M., Soria-Castro, E., Rubio-Ruiz, M. E., Del Valle-Mondragón, L., et al. (2017). Extracts of *Crataegus oxyacantha* and *Rosmarinus officinalis* attenuate ischemic myocardial damage by decreasing oxidative stress and regulating the production of cardiac vasoactive agents. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18112412.
- Cunha-e-Silva, N., Sant'Anna, C., Pereira, M. G., Porto-Carreiro, I., Jeovanio, A. L., and De Souza, W. (2006). Reserosomes: Multipurpose organelles? *Parasitol. Res.* 99, 325–327. doi:10.1007/s00436-006-0190-3.
- D'Angelo, M. A., Montagna, A. E., Sanguineti, S., Torres, H. N., and Flawiá, M. M. (2002). A Novel Calcium-stimulated Adenylyl Cyclase from *Trypanosoma cruzi*, Which Interacts with the Structural Flagellar Protein Paraflagellar Rod. *J. Biol. Chem.* 277, 35025–35034. doi:10.1074/jbc.M204696200.
- D'Angelo, M. A., Sanguineti, S., Reece, J. M., Birnbaumer, L., Torres, H. N., and Flawiá, M. M. (2004). Identification, characterization and subcellular localization of TcPDE1, a novel cAMP-specific phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 378, 63–72. doi:10.1042/BJ20031147.
- Dave, N., Cetiner, U., Arroyo, D., Fonbuena, J., Tiwari, M., Barrera, P., et al. (2021). A novel mechanosensitive channel controls osmoregulation, differentiation, and infectivity in *trypanosoma cruzi*. *Elife* 10, 1–32. doi:10.7554/ELIFE.67449.
- De Araújo, J. S., Da Silva, P. B., Batista, M. M., Peres, R. B., Cardoso-Santos, C., Kalejaiye, T. D., et al. (2020). Evaluation of phthalazinone phosphodiesterase inhibitors with improved activity and selectivity against *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 958–967. doi:10.1093/jac/dkz516.
- De Pablos, L. M., and Osuna, A. (2012). Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infect. Immun.* 80, 2258–2264. doi:10.1128/IAI.06225-11.
- De Rooij, J., Zwartkruis, F. J. T., Verheijen, M. H. G., Cool, R. H., Nijman, S. M. B., Wittinghofer, A., et al. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474–477. doi:10.1038/24884.
- De Souza, W. (1984). "Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*," in, 197–283. doi:10.1016/S0074-7696(08)60180-1.
- De Souza, W., Porto Carreiro, I., Miranda, K., and Cunha E Silva, N. L. (2000). Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 72, 420–432. doi:10.1590/s0001-37652000000300016.
- Diamant, Z., and Spina, D. (2011). PDE4-inhibitors: A novel, targeted therapy for obstructive airways disease. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24, 353–360. doi:10.1016/j.pupt.2010.12.011.

- DNDi (2019). The BENDITA study. 2. Available at: <https://dndi.org/publications/2019/bendita-study/>.
- Docampo, R., and Huang, G. (2016). Acidocalcisomes of eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 41, 66–72. doi:10.1016/j.ceb.2016.04.007.
- Docampo, R., Jimenez, V., Lander, N., Li, Z. H., and Niyogi, S. (2013). *New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists.* doi:10.1016/B978-0-12-407695-2.00002-0.
- Docampo, R., Scott, D. A., Vercesi, A. E., and Moreno, S. N. (1995). Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 310 ( Pt 3, 1005–1012. doi:10.1042/bj3101005.
- Dodge-Kafka, K. L., Soughayer, J., Pare, G. C., Carlisle Michel, J. J., Langeberg, L. K., Kapiloff, M. S., et al. (2005). The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* 437, 574–578. doi:10.1038/nature03966.
- Echeverría, L. E., Marcus, R., Novick, G., Sosa, S., Ralston, K., Zaidel, E. J., et al. (2020). WHF IASC Roadmap on Chagas Disease. *Glob. Heart* 15, 26. doi:<https://doi.org/10.5334/gh.484>.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* (80-. ). 309, 409–415. doi:10.1126/science.1112631.
- Elsadig Karar, M. G., and Kuhnert, N. (2016). UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (Crataegutt Tropfen). *J. Chem. Biol. Ther.* 01. doi:10.4172/2572-0406.1000102.
- Fazal, L., Laudette, M., Paula-Gomes, S., Pons, S., Conte, C., Tortosa, F., et al. (2017). Multifunctional Mitochondrial Epa1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ. Res.* 120, 645–657. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309859.
- Fernandes, A. B., Neira, I., Ferreira, A. T., and Mortara, R. A. (2006). Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitol Res* 100, 59–68. doi:10.1007/s00436-006-0236-6.
- Fernandes, M. C., and Andrews, N. W. (2012). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: A unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 734–747. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.
- Fernandes, M. C., Da Silva, E. N., Pinto, A. V., De Castro, S. L., and Menna-Barreto, R. F. S. (2012). A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 139, 26–36. doi:10.1017/S0031182011001612.
- Fernandes, M., Cortez, M., Flannery, A., Tam, C., Mortara, R., and Andrews, N. (2011).

- Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J. Exp. Med.* 208, 909–921. doi:10.1084/jem.20102518.
- Ferreira, B. L., Ferreira, É. R., Bonfim-Melo, A., Mortara, R. A., and Bahia, D. (2019). Trypanosoma cruzi extracellular amastigotes selectively trigger the PI3K/Akt and Erk pathways during HeLa cell invasion. *Microbes Infect.* 21, 485–489. doi:10.1016/j.micinf.2019.06.003.
- Ferreira, É. R., Bonfim-Melo, A., Cordero, E. M., and Mortara, R. A. (2017). ERM proteins play distinct roles in cell invasion by extracellular amastigotes of Trypanosoma cruzi. *Front. Microbiol.* 8, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2017.02230.
- Ferreira, L. F., Jansen, A. M., and Araújo, A. (2011). Chagas disease in prehistory. *An. Acad. Bras. Cienc.* 83, 1041–1044. doi:10.1590/S0001-37652011005000013.
- Ferri, G., and Edreira, M. M. (2021). All Roads Lead to Cytosol: Trypanosoma cruzi Multi-Strategic Approach to Invasion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 89. doi:10.3389/fcimb.2021.634793.
- Fraidenraich, D., Peña, C., Isola, E. L., Lammel, E. M., Coso, O., Añel, A. D., et al. (1993). Stimulation of Trypanosoma cruzi adenylyl cyclase by an  $\alpha$ D-globin fragment from Triatoma hindgut: Effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10140–10144. doi:10.1073/pnas.90.21.10140.
- Francisco, A. F., Jayawardhana, S., Olmo, F., Lewis, M. D., Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., et al. (2020). Challenges in Chagas Disease Drug Development. *Molecules* 25, 2799. doi:10.3390/molecules25122799.
- Gancedo, J. M. (2013). Biological roles of cAMP: Variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol. Rev.* 88, 645–668. doi:10.1111/brv.12020.
- Gibson, W. (2017). “Kinetoplastea,” in *Handbook of the Protists* (Cham: Springer International Publishing), 1089–1138. doi:10.1007/978-3-319-28149-0\_7.
- Gilinger, G., and Bellofatto, V. (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* 29, 1556–1564. doi:10.1093/nar/29.7.1556.
- Gloerich, M., Ponsioen, B., Vliem, M. J., Zhang, Z., Zhao, J., Kooistra, M. R., et al. (2010). Spatial Regulation of Cyclic AMP-Epac1 Signaling in Cell Adhesion by ERM Proteins. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5421–5431. doi:10.1128/mcb.00463-10.
- Gonzales-Perdomo, M., Romero, P., and Goldenberg, S. (1988). Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate Trypanosoma cruzi differentiation. *Exp. Parasitol.* 66, 205–212. doi:10.1016/0014-4894(88)90092-6.
- Gould, M. K., Bachmaier, S., Ali, J. A. M., Alsford, S., Tagoe, D. N. A., Munday, J. C., et al. (2013). Cyclic AMP effectors in African trypanosomes revealed by genome-

- scale RNA interference library screening for resistance to the phosphodiesterase inhibitor Cpda. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4882–4893. doi:10.1128/AAC.00508-13.
- Gould, M. K., and de Koning, H. P. (2011). Cyclic-nucleotide signalling in protozoa. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 515–541. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00262.x.
- Günzl, A. (2010). The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: Complex or simplified? *Eukaryot. Cell* 9, 1159–1170. doi:10.1128/EC.00113-10.
- Hall, B. F., Webster, P., Ma, A. K., Joiner, K. A., and Andrews, N. W. (1992). Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by trypanosoma cruzi: A role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J. Exp. Med.* 176, 313–325. doi:10.1084/jem.176.2.313.
- Halliday, C., de Castro-Neto, A., Alcantara, C. L., Cunha-e-Silva, N. L., Vaughan, S., and Sunter, J. D. (2020). Trypanosomatid Flagellar Pocket from Structure to Function. *Trends Parasitol.* 37, 317–329. doi:10.1016/j.pt.2020.11.005.
- Hamedi, A., Botelho, L., Britto, C., Fragoso, S. P., Umaki, A. C. S., Goldenberg, S., et al. (2015). In vitro metacyclogenesis of Trypanosoma cruzi induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression. *Mol. Biochem. Parasitol.* 200. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.04.002.
- Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., and Fresno, M. (2020). Trypanosoma cruzi genome: Organization, multi-gene families, transcription, and biological implications. *Genes (Basel)*. 11, 1196. doi:10.3390/genes11101196.
- Hochbaum, D., Barila, G., Ribeiro-Neto, F., and Altschuler, D. L. (2011). Radixin Assembles cAMP Effectors Epac and PKA into a Functional cAMP Compartment. *J. Biol. Chem.* 286, 859–866. doi:10.1074/jbc.M110.163816.
- Hochbaum, D., Hong, K., Barila, G., Ribeiro-Neto, F., and Altschuler, D. L. (2008). Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis. *J. Biol. Chem.* 283, 4464–4468. doi:10.1074/jbc.C700171200.
- Jackson, Y., Alirol, E., Getaz, L., Wolff, H., Combescure, C., and Chappuis, F. (2010). Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 51, e69-75. doi:10.1086/656917.
- Jäger, A. V., De Gaudenzi, J. G., Mild, J. G., Cormack, B. M., Pantano, S., Altschuler, D. L., et al. (2014). Identification of novel cyclic nucleotide binding proteins in Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 198, 104–112. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.02.002.
- Jaśkiewicz, A., Pajka, B., and Orzechowski, A. (2018). The many faces of rap1 GTPase. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–20. doi:10.3390/ijms19102848.

- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kaupp, U. B., and Seifert, R. (2002). Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. *Physiol. Rev.* 82, 769–824. doi:10.1152/physrev.00008.2002.
- Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., et al. (1998). A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science* (80-. ). 282, 2275–2279. doi:10.1126/science.282.5397.2275.
- Kawashita, S. Y., da Silva, C. V., Mortara, R. A., Burleigh, B. A., and Briones, M. R. S. (2009). Homology, paralogy and function of DGF-1, a highly dispersed *Trypanosoma cruzi* specific gene family and its implications for information entropy of its encoded proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 165, 19–31. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.12.010.
- Kehat, I., and Molkentin, J. D. (2010). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1188, 96–102. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05088.x.
- Kollien, A., and Schaub, G. (2000). The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol. Today* 16, 381–387. doi:10.1016/S0169-4758(00)01724-5.
- Kosuru, R., and Chrzanowska, M. (2020). Integration of rap1 and calcium signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–21. doi:10.3390/ijms21051616.
- Kugeratski, F. G., Batista, M., Inoue, A. H., Ramos, B. D., Krieger, M. A., and Marchini, F. K. (2015). pTcGW plasmid vectors 1.1 version: A versatile tool for *Trypanosoma cruzi* gene characterisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 687–690. doi:10.1590/0074-02760150074.
- Lakshmikanthan, S., Zieba, B. J., Ge, Z.-D., Momotani, K., Zheng, X., Lund, H., et al. (2014). Rap1b in Smooth Muscle and Endothelium Is Required for Maintenance of Vascular Tone and Normal Blood Pressure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1486–1494. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303678.
- Lander, N., Chiurillo, M., Vercesi, A., and Docampo, R. (2017). Endogenous C-terminal Tagging by CRISPR/Cas9 in *Trypanosoma cruzi*. *Bio-Protocol* 7, 1–16. doi:10.21769/bioprotoc.2299.
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., and Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect. Dis.* 13, 342–348. doi:10.1016/S1473-3099(13)70002-1.
- Lerner, A., Kim, D. H., and Lee, R. (2000). The cAMP signaling pathway as a therapeutic target in lymphoid malignancies. *Leuk. Lymphoma* 37, 39–51. doi:10.3109/10428190009057627.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., et al.

- (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa\*. *J. Protozool.* 27, 37–58. doi:10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x.
- Lezoualc'H, F., Fazal, L., Laudette, M., and Conte, C. (2016). Cyclic AMP sensor EPAC proteins and their role in cardiovascular function and disease. *Circ. Res.* 118, 881–897. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306529.
- Li, F. J., and He, C. Y. (2014). Acidocalcisome is required for autophagy in *Trypanosoma brucei*. *Autophagy* 10, 1978–1988. doi:10.4161/auto.36183.
- Li, Q., Teng, Y., Wang, J., Yu, M., Li, Y., and Zheng, H. (2018). Rap1 promotes proliferation and migration of vascular smooth muscle cell via the ERK pathway. *Pathol. - Res. Pract.* 214, 1045–1050. doi:10.1016/j.prp.2018.04.007.
- Li, Y., Shah-Simpson, S., Okrah, K., Belew, A. T., Choi, J., Caradonna, K. L., et al. (2016). Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. *PLoS Pathog.* 12, e1005511. doi:10.1371/journal.ppat.1005511.
- Li, Z. H., Alvarez, V. E., De Gaudenzi, J. G., Sant'Anna, C., Frasch, A. C. C., Cazzulo, J. J., et al. (2011). Hyperosmotic stress induces aquaporin-dependent cell shrinkage, polyphosphate synthesis, amino acid accumulation, and global gene expression changes in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 286, 43959–43971. doi:10.1074/jbc.M111.311530.
- Li, Z. H., De Gaudenzi, J. G., Alvarez, V. E., Mendiondo, N., Wang, H., Kissinger, J. C., et al. (2012). A 43-nucleotide U-rich element in 3'-untranslated region of large number of *Trypanosoma cruzi* transcripts is important for mRNA Abundance in intracellular amastigotes. *J. Biol. Chem.* 287, 19058–19069. doi:10.1074/jbc.M111.338699.
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., et al. (2019). Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *J. Phys. Oceanogr.* 49, 1–13. doi:10.3389/fpubh.2019.00166.
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P. A., Trejo-Varón, J. A., Carranza, J. C., Pinto, C. M., et al. (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 151, 166–177. doi:10.1016/j.actatropica.2015.07.015.
- Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S., and Leahy, D. J. (2013). "Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI)," in *Methods in Enzymology* (Academic Press Inc.), 227–240. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5.
- Lopez, M. A., Saada, E. A., and Hill, K. L. (2015). Insect stage-specific adenylate cyclases regulate social motility in African trypanosomes. *Eukaryot. Cell* 14, 104–112. doi:10.1128/EC.00217-14.

- Losinno, A. D., Martínez, S. J., Labriola, C. A., Carrillo, C., and Romano, P. S. (2020). Induction of autophagy increases the proteolytic activity of reservosomes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Autophagy* 0, 1. doi:10.1080/15548627.2020.1720428.
- Maeda, F. Y., Cortez, C., and Yoshida, N. (2012). Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Front Immunol* 3, 361. doi:10.3389/fimmu.2012.00361.
- Magdesian, M. H., Tonelli, R. R., Fessel, M. R., Silveira, M. S., Schumacher, R. I., Linden, R., et al. (2007). A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Cell Res.* 313, 210–218. doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.008.
- Makin, L., and Gluenz, E. (2015). cAMP signalling in trypanosomatids: Role in pathogenesis and as a drug target. *Trends Parasitol.* 31, 373–379. doi:10.1016/j.pt.2015.04.014.
- Manning-Cela, R., Cortés, A., González-Rey, E., Van Voorhis, W. C., Swindle, J., and González, A. (2001). LYT1 Protein Is Required for Efficient In Vitro Infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 69, 3916–3923. doi:10.1128/IAI.69.6.3916.
- Mansoldo, F. R. P., Carta, F., Angeli, A., Cardoso, V. da S., Supuran, C. T., and Vermelho, A. B. (2020). Chagas Disease: Perspectives on the Past and Present and Challenges in Drug Discovery. *Molecules* 25, 1–14. doi:10.3390/molecules25225483.
- Marchini, F. K., de Godoy, L. M. F., Rampazzo, R. C. P., Pavoni, D. P., Probst, C. M., Gnad, F., et al. (2011). Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0025381.
- Martins, R. M., Alves, R. M., Macedo, S., and Yoshida, N. (2011). Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Cell. Microbiol.* 13, 943–954. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01590.x.
- Maslov, D. A., Opperdoes, F. R., Kostygov, A. Y., Hashimi, H., Lukeš, J., and Yurchenko, V. (2019). Recent advances in trypanosomatid research: Genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology* 146, 1–27. doi:10.1017/S0031182018000951.
- McClatchey, A. I. (2014). ERM proteins at a glance. *J. Cell Sci.* 127, 3199–3204. doi:10.1242/jcs.098343.
- McDonough, K. A., and Rodriguez, A. (2012). The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: From signal to sword. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 27–38. doi:10.1038/nrmicro2688.
- Mild, J. G. (2016). Búsqueda de extractos naturales con propiedades antiparasitarias y

nuevos blancos moleculares para la terapia contra la enfermedad de Chagas.

- Millar, J. K., Pickard, B. S., Mackie, S., James, R., Christie, S., Buchanan, S. R., et al. (2005). Genetics: DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science* (80- ). 310, 1187–1191. doi:10.1126/science.1112915.
- Mills, I., Letsou, G., Rabban, J., Sumpio, B., and Gewirtz, H. (1990). Mechanosensitive adenylate cyclase activity in coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 143–147. doi:10.1016/0006-291X(90)91368-3.
- Ministerio de Salud (2010). Curso sobre enfermedades vectoriales para Agentes Comunitarios y Salud. Módulo V:Chagas. *Minist. Salud. Pres. la Nación.* 1, 62.
- Miro-Moran, A., Jardin, I., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., Tapia, J. A., et al. (2012). Identification and function of exchange proteins activated directly by cyclic AMP (Epac) in mammalian spermatozoa. *PLoS One* 7, e37713. doi:10.1371/journal.pone.0037713.
- Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Rosas, F., et al. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1295–1306. doi:10.1056/nejmoa1507574.
- Mott, A., Lenormand, G., Costales, J., Fredberg, J. J., and Burleigh, B. A. (2009). Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell. Physiol.* 218, 315–322. doi:10.1002/jcp.21606.
- Musikant, D., Ferri, G., Durante, I. M., Buscaglia, C. A., Altschuler, D. L., and Edreira, M. M. (2017). Host Epac1 is required for cAMP-mediated invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 211, 67–70. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.10.003.
- Naula, C., Schaub, R., Leech, V., Melville, S., and Seebeck, T. (2001). Spontaneous dimerization and leucine-zipper induced activation of the recombinant catalytic domain of a new adenylyl cyclase of *Trypanosoma brucei*, GRESAG4.4B. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112, 19–28. doi:10.1016/S0166-6851(00)00338-8.
- Niyogi, S., Mucci, J., Campetella, O., and Docampo, R. (2014). Rab11 Regulates Trafficking of Trans-sialidase to the Plasma Membrane through the Contractile Vacuole Complex of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 10. doi:10.1371/journal.ppat.1004224.
- Ntantie, E., Gonyo, P., Lorimer, E. L., Hauser, A. D., Schuld, N., McAllister, D., et al. (2013). An Adenosine-Mediated Signaling Pathway Suppresses Prenylation of the GTPase Rap1B and Promotes Cell Scattering. *Sci. Signal.* 6. doi:10.1126/scisignal.2003374.
- Nunes, M. C. P., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., et al. (2018). *Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and*

- Management: A Scientific Statement From the American Heart Association.*  
doi:10.1161/CIR.0000000000000599.
- Ochatt, C. M., Ulloa, R. M., Torres, H. N., and Téllez-Iñón, M. T. (1993). Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 73–81. doi:10.1016/0166-6851(93)90245-S.
- Oestreich, E. A., Wang, H., Malik, S., Kaproth-Joslin, K. A., Blaxall, B. C., Kelley, G. G., et al. (2007). Epac-mediated activation of phospholipase C $\epsilon$  plays a critical role in  $\beta$ -adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca<sup>2+</sup> mobilization in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 5488–5495. doi:10.1074/jbc.M608495200.
- Onofre, T. S., Rodrigues, J. P. F., Shio, M. T., Macedo, S., Juliano, M. A., and Yoshida, N. (2021). Interaction of *Trypanosoma cruzi* Gp82 With Host Cell LAMP2 Induces Protein Kinase C Activation and Promotes Invasion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 1–16. doi:10.3389/fcimb.2021.627888.
- Onofre, T. S., Rodrigues, J. P. F., and Yoshida, N. (2019). Depletion of host cell focal adhesion kinase increases the susceptibility to invasion by *trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 1–10. doi:10.3389/fcimb.2019.00231.
- Page, C. P., and Spina, D. (2011). “Phosphodiesterase Inhibitors in the Treatment of Inflammatory Diseases,” in, 391–414. doi:10.1007/978-3-642-17969-3\_17.
- PAHO (2006). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Washington, DC, USA.
- Paiva, C. N., Medei, E., and Bozza, M. T. (2018). ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. *PLoS Pathog.* 14, 1–19. doi:10.1371/journal.ppat.1006928.
- Parnell, E., Palmer, T. M., and Yarwood, S. J. (2015). The future of EPAC-targeted therapies: agonism versus antagonism. *Trends Pharmacol Sci* 36, 203–214. doi:10.1016/j.tips.2015.02.003.
- Pavan, B., Biondi, C., and Dalpiaz, A. (2009). Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discov. Today* 14, 982–991. doi:10.1016/j.drudis.2009.07.007.
- Pérez-Molina, J. A., and Molina, I. (2018). Chagas disease. *Lancet* 391, 82–94. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- Pierre, S., Eschenhagen, T., Geisslinger, G., and Scholich, K. (2009). Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 321–335. doi:10.1038/nrd2827.
- Pinheiro, E., Brum-Soares, L., Reis, R., and Cubides, J. C. (2017). Chagas disease: Review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. *Rev.*

- Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 296–300. doi:10.1590/0037-8682-0433-2016.
- Pinto, J. P., Machado, R. S. R., Xavier, J. M., and Futschik, M. E. (2014). Targeting molecular networks for drug research. *Front. Genet.* 5. doi:10.3389/fgene.2014.00160.
- Pizon, V., Desjardins, M., Bucci, C., Parton, R. G., and Zerial, M. (1994). Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J Cell Sci* 107, 1661–1670.
- Popovic-Milenkovic, M. T., Tomovic, M. T., Brankovic, S. R., Ljubic, B. T., and Jankovic, S. M. (2014). Antioxidant and anxiolytic activities of *Crataegus nigra* Wald. et Kit. berries. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 71, 279–285.
- Puechberty, J., Blaineau, C., Meghamla, S., Crobu, L., Pagès, M., and Bastien, P. (2007). Compared genomics of the strand switch region of *Leishmania* chromosome 1 reveal a novel genus-specific gene and conserved structural features and sequence motifs. *BMC Genomics* 8, 57. doi:10.1186/1471-2164-8-57.
- Quiñones, W., Acosta, H., Gonçalves, C. S., Motta, M. C. M., Gualdrón-López, M., and Michels, P. A. M. (2020). Structure, Properties, and Function of Glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1–11. doi:10.3389/fcimb.2020.00025.
- Ralston, K. S., and Hill, K. L. (2008). The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. *Int. J. Parasitol.* 38, 869–884. doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.003.
- Rangel-Aldao, R., Allende, O., Triana, F., Piras, R., Henriquez, D., and Piras, M. (1987). Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 22, 39–43. doi:10.1016/0166-6851(87)90067-3 [pii].
- Rangel-Aldao, R., Triana, F., Fernandez, V., Comach, G., Abate, T., and Montoreano, R. (1988). Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Int* 17, 337–344.
- Rassi, A., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–1402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- Rastogi, S., Pandey, M. M., and Rawat, A. K. S. (2016). Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders. *Phytomedicine* 23, 1082–1089. doi:10.1016/j.phymed.2015.10.012.
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A., and Aslund, L. (2008). Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 283, 15884–15892. doi:10.1074/jbc.M802081200.
- Reyes López, P. A. (2009). La vida y obra de Carlos Chagas a cien años de la descripción de la enfermedad de Chagas-Mazza. *Arch. Cardiol. Mex.* 79, 237–239.
- Richter, W. (2002). 3',5'-Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: Members, structure, and catalytic mechanism. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 46, 278–286.

doi:10.1002/prot.10049.

- Rifki, O. F., Bodemann, B. O., Battiprolu, P. K., White, M. A., and Hill, J. A. (2013). RalGDS-dependent cardiomyocyte autophagy is required for load-induced ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 59, 128–138. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.02.015.
- Roberts, A. J., and Fairlamb, A. H. (2016). The N-myristoylome of *Trypanosoma cruzi*. *Sci. Rep.* 6, 1–11. doi:10.1038/srep31078.
- Rodrigues, J. P. F., Souza Onofre, T., Barbosa, B. C., Ferreira, É. R., Bonfim-Melo, A., and Yoshida, N. (2019). Host cell protein LAMP-2 is the receptor for *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 that mediates invasion. *Cell. Microbiol.* 21, 1–11. doi:10.1111/cmi.13003.
- Rodríguez-Angulo, H., Toro-Mendoza, J., Marques, J., Bonfante-Cabarcas, R., and Mijares, A. (2013). Induction of chagasic-like arrhythmias in the isolated beating hearts of healthy rats perfused with *Trypanosoma cruzi*-conditioned medium. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 46, 58–64. doi:10.1590/1414-431X20122409.
- Rodriguez, A., Martinez, I., Chung, A., Berlot, C. H., and Andrews, N. W. (1999). cAMP regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J Biol Chem* 274, 16754–16759.
- Rodriguez, A., Rioult, M. G., Ora, A., and Andrews, N. W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP<sub>3</sub> formation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell Biol.* 129, 1263–1273. doi:10.1083/jcb.129.5.1263.
- Rodrigues Coura, J., and de Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 3–24. doi:10.1590/s0074-02762002000100001.
- Rodríguez, A., Martinez, I., Chung, A., Berlot, C. H., and Andrews, N. W. (1999). cAMP Regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent Exocytosis of Lysosomes and Lysosome-mediated Cell Invasion by Trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 16754–16759. doi:10.1074/jbc.274.24.16754.
- Rohloff, P., Montalvetti, A., and Docampo, R. (2004). Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 279, 52270–52281. doi:10.1074/jbc.M410372200.
- Rolón, M., Vega, C., Escario, J. A., and Gómez-Barrio, A. (2006). Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.* 99, 103–107. doi:10.1007/s00436-006-0126-y.
- Roscioni, S. S., Elzinga, C. R. S., and Schmidt, M. (2008). Epac: Effectors and biological functions. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 377, 345–357. doi:10.1007/s00210-007-0246-7.

- Ruiz-Hurtado, G., Morel, E., Domínguez-Rodríguez, A., Llach, A., Lezoualc'h, F., Benitah, J.-P., et al. (2013). Epac in cardiac calcium signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 58, 162–171. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.11.021.
- Sabbatini, M. E., Chen, X., Ernst, S. A., and Williams, J. A. (2008). Rap1 activation plays a regulatory role in pancreatic amylase secretion. *J. Biol. Chem.* 283, 23884–94. doi:10.1074/jbc.M800754200.
- Salassa, B. N., and Romano, P. S. (2019). Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence* 10, 460–469. doi:10.1080/21505594.2018.1543517.
- Salmon, D. (2018). Adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei*, environmental sensors and controllers of host innate immune response. *Pathogens* 7. doi:10.3390/pathogens7020048.
- Salvatella, R., Irabedra, P., and Castellanos, L. G. (2014). Interruption of vector transmission by native vectors and “the art of the possible.” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 122–130. doi:10.1590/0074-0276140338.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harb. New York., Cold Spring Harb. Lab.*
- Sangenito, L. S., Branquinha, M. H., and Santos, A. L. S. (2020). Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009-2018) Survey. *Trop. Med. Infect. Dis.* 5. doi:10.3390/tropicalmed5020088.
- Sanmartino, M., Amieva Nefa, S. C., Balsalobre, A., Carrillo, C., Marti, G., Medone, P., et al. (2015). *Hablamos de Chagas: aportes para re-pensar la problemática con una mirada integral*. 1st ed. , eds. D. García and A. Menegaz CONICET.
- Sant’Anna, C., Nakayasu, E. S., Pereira, M. G., Lourenço, D., de Souza, W., Almeida, I. C., et al. (2009). Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics* 9, 1782–1794. doi:10.1002/pmic.200800730.
- Santi-Rocca, J., Fernandez-Cortes, F., Chillón-Marinas, C., González-Rubio, M. L., Martín, D., Gironès, N., et al. (2017). A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: Common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. *Sci. Rep.* 7, 1–12. doi:10.1038/s41598-017-08086-8.
- Saoudi, M., Slama-Ben Salem, R. Ben, Salem, M. Ben, Brahmi, N., Badraoui, R., Nasri, M., et al. (2019). Beneficial effects of *Crataegus oxyacantha* extract on neurobehavioral deficits and brain tissue damages induced by an insecticide mixture of deltamethrin and chlorpyrifos in adult wistar rats. *Biomed. Pharmacother.* 114, 108795. doi:10.1016/j.biopha.2019.108795.
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hottot, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., et al. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* 2020, 1–21. doi:10.1093/database/baaa062.

- Schoijet, A. C., Miranda, K., Medeiros, L. C. S., De Souza, W., Flawiá, M. M., Torres, H. N., et al. (2011). Defining the role of a FYVE domain in the localization and activity of a cAMP phosphodiesterase implicated in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Microbiol.* 79, 50–62. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07429.x.
- Schoijet, A. C., Sternlieb, T., and Alonso, G. D. (2019). Signal Transduction Pathways as Therapeutic Target for Chagas Disease. *Curr. Med. Chem.* 26, 6572–6589. doi:10.2174/0929867326666190620093029.
- Sebastián-Pérez, V., Hendrickx, S., Munday, J. C., Kalejaiye, T., Martínez, A., Campillo, N. E., et al. (2018). Cyclic nucleotide-specific phosphodiesterases as potential drug targets for anti-leishmania therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, 1–12. doi:10.1128/AAC.00603-18.
- Seino, S., and Shibasaki, T. (2005). PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* 85, 1303–1342. doi:85/4/1303 [pii] 10.1152/physrev.00001.2005.
- Shalaby, T., Liniger, M., and Seebeck, T. (2001). The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 268, 6197–6206. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02564.x.
- Shao, S., Sun, X., Chen, Y., Zhan, B., and Zhu, X. (2019). Complement evasion: An effective strategy that parasites utilize to survive in the host. *Front. Microbiol.* 10, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2019.00532.
- Shaw, S., Knüsel, S., Abbühl, D., Naguleswaran, A., and Roditi, I. (2021). Cyclic AMP signalling and glucose metabolism mediate pH taxis by African trypanosomes. *bioRxiv*, 1–32. doi:10.1101/2021.01.01.424252.
- Shikanai-Yasuda, M. A., and Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* 54, 845–852. doi:10.1093/cid/cir956.
- Siegel, T. N., Hekstra, D. R., Kemp, L. E., Figueiredo, L. M., Lowell, J. E., Fenyo, D., et al. (2009). Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.* 23, 1063–1076. doi:10.1101/gad.1790409.
- Sinclair, A. N., and de Graffenried, C. L. (2019). More than Microtubules: The Structure and Function of the Subpellicular Array in Trypanosomatids. *Trends Parasitol.* 35, 760–777. doi:10.1016/j.pt.2019.07.008.
- Smircich, P., Eastman, G., Bispo, S., Duhagon, M. A., Guerra-Slompo, E. P., Garat, B., et al. (2015). Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 16, 1–14. doi:10.1186/s12864-015-1563-8.
- Stahl, P., Schwarz, R. T., Debierre-Grockiego, F., and Meyer, T. (2014). *Trypanosoma*

- cruzi parasites fight for control of the JAK-STAT pathway by disarming their host . *Jak-Stat* 3, e1012964. doi:10.1080/21623996.2015.1012964.
- Steegborn, C. (2014). Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases - similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842, 2535–2547. doi:10.1016/j.bbadis.2014.08.012.
- Sternlieb, T., Schoijet, A. C., and Alonso, G. D. (2020). Intracellular cyclic AMP levels modulate differential adaptive responses on epimastigotes and cell culture trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 202, 105273. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105273.
- Stork, P. J. ., and Schmitt, J. M. (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12, 258–266. doi:10.1016/S0962-8924(02)02294-8.
- Stuart, K. D., Schnauffer, A., Ernst, N. L., and Panigrahi, A. K. (2005). Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem. Sci.* 30, 97–105. doi:10.1016/j.tibs.2004.12.006.
- Sutherland, E. W., and Rall, T. W. (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.* 232, 1077–1091.
- Sutton, R. E., and Boothroyd, J. C. (1986). Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell* 47, 527–535. doi:10.1016/0092-8674(86)90617-3.
- Tagoe, D. N. A., Kalejaiye, T. D., and de Koning, H. P. (2015). The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: Vive la difference! *Front. Pharmacol.* 6, 1–13. doi:10.3389/fphar.2015.00185.
- Takahashi, M., Dillon, T. J., Liu, C., Kariya, Y., Wang, Z., and Stork, P. J. S. (2013). Protein kinase a-dependent phosphorylation of Rap1 regulates its membrane localization and cell migration. *J. Biol. Chem.* 288, 27712–27723. doi:10.1074/jbc.M113.466904.
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J. A., Heuser, J. E., et al. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 71, 1117–1130. doi:10.1016/S0092-8674(05)80061-3.
- Tavernelli, L. E., Motta, M. C. M., Gonçalves, C. S., da Silva, M. S., Elias, M. C., Alonso, V. L., et al. (2019). Overexpression of *Trypanosoma cruzi* High Mobility Group B protein (TcHMGB) alters the nuclear structure, impairs cytokinesis and reduces the parasite infectivity. *Sci. Rep.* 9, 1–16. doi:10.1038/s41598-018-36718-0.
- Taylor, S. S., Kim, C., Vigil, D., Haste, N. M., Yang, J., Wu, J., et al. (2005). Dynamics of signaling by PKA. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1754, 25–37. doi:10.1016/j.bbapap.2005.08.024.

- Tengholm, A., and Gylfe, E. (2017). cAMP signalling in insulin and glucagon secretion. *Diabetes, Obes. Metab.* 19, 42–53. doi:10.1111/dom.12993.
- Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: The need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28, 85–104. doi:10.1016/S0020-7519(97)00180-X.
- Toya, Y., Schwencke, C., and Ishikawa, Y. (1998). Forskolin derivatives with increased selectivity for cardiac adenylyl cyclase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 97–108. doi:10.1006/jmcc.1997.0575.
- Vercesi, A. E., Moreno, S. N., and Docampo, R. (1994). Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 304 ( Pt 1, 227–233. doi:10.1042/bj3040227.
- Viotti, R., Vigliano, C. A., Álvarez, M. G., Lococo, B. E., Petti, M. A., Bertocchi, G. L., et al. (2009). The Impact of Socioeconomic Conditions on Chronic Chagas Disease Progression. *Rev. Española Cardiol. (English Ed.* 62, 1224–1232. doi:10.1016/s1885-5857(09)73349-3.
- Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., Mcgwire, B. S., Drew, M. E., and Satoskar, A. R. (2014). Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites Mechanisms of host cell invasion in *Leishmania*. *Cell Mol Life Sci* 71, 1245–1263. doi:10.1007/s00018-013-1491-1.
- Wang, H., Kunz, S., Chen, G., Seebeck, T., Wan, Y., Robinson, H., et al. (2012). Biological and structural characterization of *Trypanosoma cruzi* phosphodiesterase C and implications for design of parasite selective inhibitors. *J. Biol. Chem.* 287, 11788–11797. doi:10.1074/jbc.M111.326777.
- Wang, J., Xiong, X., and Feng, B. (2013). Effect of crataegus usage in cardiovascular disease prevention: An evidence-based approach. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2013. doi:10.1155/2013/149363.
- Watanabe Costa, R., da Silveira, J. F., and Bahia, D. (2016). Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. *Front. Microbiol.* 7, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2016.00388.
- WHO (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relev. Epidemiol. Hebd.* 90, 33–43.
- WHO (2020). *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030*. Control of. , ed. Dr Malecela Mwelecele Ntuli World Health Organization - Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Wong, W., and Scott, J. D. (2004). AKAP signalling complexes: Focal points in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 959–970. doi:10.1038/nrm1527.
- Woolsey, A. M., and Burleigh, B. A. (2004). Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with

- endosomal/lysosomal compartments. *Cell. Microbiol.* 6, 829–838. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00405.x.
- Woolsey, A. M., Sunwoo, L., Petersen, C. A., Brachmann, S. M., Cantley, L. C., and Burleigh, B. A. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J. Cell Sci.* 116, 3611–3622. doi:10.1242/jcs.00666.
- Wu, Y., Zhang, F., Yang, K., Fang, S., Bu, D., Li, H., et al. (2019). SymMap: an integrative database of traditional Chinese medicine enhanced by symptom mapping. *Nucleic Acids Res.* 47, D1110–D1117. doi:10.1093/nar/gky1021.
- Yan, K., Gao, L., Cui, Y., Zhang, Y., and Zhou, X. (2016). The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). *Mol. Med. Rep.* 13, 3715–3723. doi:10.3892/mmr.2016.5005.
- Yang, H., Xue, W., Ding, C., Wang, C., Xu, B., Chen, S., et al. (2021). Vitexin Mitigates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats by Regulating Mitochondrial Dysfunction via Epac1-Rap1 Signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021. doi:10.1155/2021/9921982.
- Zabala, J. P. (2009). Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* 16, 57–74. doi:10.1590/s0104-59702009000500004.
- Zingales, B. (2018). Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 184, 38–52. doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.017.
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., et al. (2012). The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12, 240–253. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009.