



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de
Biomedicina Molecular

Identificación del interactoma de TcVps26-*like*, durante el proceso de
invasión de *T. cruzi*

Tesis

Que presenta

QFB Anais Sulamita Romero Fabela

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Biomedicina Molecular

Directora de tesis

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

Ciudad de México

Agosto del 2017

Asesores:

Dr. Michael Schnoor

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Profesores del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN

Dr. Santiago Martínez Calvillo

Profesor de la Unidad de Biomedicina de la FES-Iztacala, UNAM

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Rebeca G. Manning Cela.

Durante el desarrollo de este trabajo, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada con todo mi amor y cariño a **mi mamá** por ser la persona que siempre me ha acompañado y apoyado incondicionalmente en mis proyectos de vida, por sus consejos y su por nunca dejarme sola en los momentos difíciles. A mis **hermanos Yael y Oswaldo** que amo mucho y están al pendiente de mí. A mi **sobrinito Luca** por ser la personita que alegra mi vida. A mi **Nino Alejandro, mi madrina Rosario y a mi tía Gladis** por siempre apoyarme y no dejarme sola en esta gran aventura. A mis **amigos de maestría y del laboratorio** por sus grandes enseñanzas y siempre ayudarnos mutuamente, por compartir momentos alegres, divertidos, tristes y hasta de estrés. A **Iván** por ser una persona muy especial en mi vida con la que he compartido momentos inolvidables.

Agradecimientos

A mi Tutora la Dra. Rebeca Manning por darme la oportunidad de estar en su laboratorio y guiarme durante este proyecto de maestría y a mis asesores el Dr. Michael Schnoor, el Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda y el Dr. Santiago Martínez Calvillo.

A mis compañeros y todas las personas del laboratorio que contribuyeron para lograr este gran proyecto, gracias por su paciencia, por sus enseñanzas y por siempre estar dispuestos a ayudarme.

Índice

Índice de figuras y tablas	vii
Lista de abreviaturas	vii
Resumen	1
1 Antecedentes generales	
1.1 Trypanosoma <i>cruzi</i>	4
1.2 Organización del Genoma de <i>T. cruzi</i>	4
1.3 Enfermedad de Chagas	6
1.4 Epidemiología	7
1.5 Mecanismo de transmisión de <i>T. cruzi</i>	8
1.6 Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	9
1.7 Proceso de invasión de <i>T. cruzi</i>	10
1.8 Proteínas de superficie	11
1.9 Tráfico de proteínas en tripanosomátidos	13
1.10 Complejo retrómero	14
1.11 Proteína de clasificación vacuolar 26 (Vps26)	16
2 Antecedentes directos	17
3 Justificación	20
4 Hipótesis	20
5 Objetivo general	20
5.1 Objetivos particulares	20
6 Materiales y métodos	21
7 Resultados	27
8 Discusión	35
9 Conclusiones	39
10 Bibliografía	40

Índice de figuras y tablas

Figura 1	Mapa que muestra las zonas endémicas y datos de cambios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas, entre 2002 y 2011	11
Figura 2	<i>Triatoma infestans</i> , el principal transmisor de <i>T. cruzi</i> en seres humanos en Sur América	13
Figura 3	<i>Triatoma dimidiata</i> y <i>Triatoma barberi</i> , principales especies de <i>triatominos</i> distribuidos en México	13
Figura 4	Análisis de la expresión de la proteína ectópica HA-TcVp26- <i>like</i>	32
Figura 5	Localización de la proteína HA-TcVps26- <i>like</i>	33
Figura 6	Análisis de los productos de co-inmunoprecipitación por ensayos de <i>Western blot</i>	35
Figura 7	Perfil de interacción de la proteína HA-TcVp26- <i>like</i>	36
Tabla 1	Proteínas cargo que son transportadas por el complejo retrómero	20
Tabla 2	Proteínas identificadas por espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	37

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
DTU	Unidades discretas de tipificación
DGCs	Grupos de genes direccionales
SSRs	Regiones de cambio de hebra
ARNg	Ácido ribonucleico guías
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
OMS	Organización mundial de la salud
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
VSG	Proteínas variantes de superficie
TLR	Receptores tipo Toll
PI3	Fosfatidilinositol
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
Ca²⁺	Calcio
MT	Tripomastigotes metacíclicos
BT	Tripomastigotes sanguíneos
TCT	Tripomastigotes derivados de tejidos
Nm	Nanómetros
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LROs	orgánulo relacionado con lisosomas
CPY	Carboxipeptidasa Y
Vps	Proteína de clasificación vacuolar
SNX	Nexinas
BAR	Bis/amphiphysin/Rvs
Lys	Lisina
Arg	Arginina
Phe	Fenilalanina
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
Fis	Formas intermedias

KD	<i>Knock-down</i>
ARNmAS	Ácido ribonucleico mensajero antisentido
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MS/MS	Espectrometría de masas en Tándem
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
HA	Hemaglutinina
LIT	<i>Liver infusion-Triptosa</i>
SFB	Suero fetal bovino
NaCl	Cloruro de sodio
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
PBS	Buffer de fosfatos
BSA	Albúmina de suero bovino
HCl	Ácido clorhídrico
NP-40	Nonidet 40
SDS	Dodecilsulfato sódico
DTT	Ditiotreitol
NaCNBH3	Cianoborohidruro de sodio
IAA	Iodoacetamida
ESI	Ionización por electrospray
Q	Cuadrupolo
HSP	Proteína de choque térmico

Resumen

T. cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Este parásito tiene un ciclo de vida complejo que se alterna entre un insecto vector y un hospedero mamífero. En éste último, el parásito lleva a cabo su ciclo intracelular, el cual inicia con la invasión a la célula blanco, seguido de su diferenciación y multiplicación, antes de salir al torrente sanguíneo para propagar la infección. Por lo tanto, el proceso de invasión es fundamental para dar inicio al ciclo infeccioso intracelular, responsable de la patogenia de la enfermedad de Chagas. Durante este proceso participan diversas moléculas tanto del parásito como de la célula hospedera, las cuales son poco conocidas hasta el momento al igual que los mecanismos moleculares involucrados.

En trabajos previos nuestro grupo de investigación encontró una molécula denominada TcVps26-*like* que se expresa diferencialmente en una biblioteca de substracción obtenida entre la forma de tripomastigote y una forma intermedia en la diferenciación de tripomastigote a amastigote. El análisis funcional de parásitos *Knock-down* (KD) de TcVps26-*like*, indicó que esta proteína participa en el proceso de invasión a la célula blanco. Además, el análisis *in silico* de TcVps26-*like* determinó que esta molécula esta anotada en la base de datos de tripanosomatidos (tritypdb) como una proteína hipotética, la cual contiene 2 dominios, uno que corresponde a la superfamilia de las N-arrestinas (SSF81296) y un dominio PFAM (PF03643) característico de la proteína de clasificación vacuolar 26 (Vps26).

Con la finalidad de entender cómo podría estar participando TcVps26-*like* en el proceso de invasión de *T. cruzi* a la célula blanco, determinamos el interactoma de esta proteína en parásitos *Knock in* (KI) de HA-TcVps26-*like*, a través de ensayos de co-inmunoprecipitación. Los resultados mostraron que HA-TcVps26-*like* se une a las proteínas de choque térmico 85 y 83, así como a la triparedoxin peroxidasa. De acuerdo con las funciones reportadas para estas proteínas y a las características de secuencia y estructura obtenidas en los análisis *in silico*, pudiéramos sugerir que TcVps26-*like* actúa como proteína andamio que pudiera participar en el tráfico de transialidasas hacia la membrana plasmática del parásito y en el proceso de

oxidación-reducción al que se enfrenta el parásito durante las diferentes etapas del proceso de infección.

Abstract

T. cruzi is the etiological agent of Chagas disease or American Trypanosomiasis. This parasite has a complex life cycle that alternates between an insect vector and a mammalian host. In this last one, the parasite carries out its intracellular cycle, which begins with the invasion to the target cell, followed by its differentiation and multiplication, before leaving the cell and reaching the bloodstream to spread the infection. Therefore, the invasion process is fundamental to initiate the intracellular infectious cycle, responsible for the pathogenesis of Chagas disease. During this process participate molecules of the parasite and host cell from which few of them have been identified so far and are unknown the molecular mechanisms involved.

In previous works, our group identified a molecule named TcVps26-*like* that is expressed differentially in a subtraction library obtained between trypomastigote and an intermediate form obtained during the transformation from trypomastigote into amastigote. Functional analysis of Knock-down (KD) parasites of TcVps26-*like*, indicated that this protein participates in the invasion process of the parasite to the target cell. In addition, *in silico* analysis of TcVps26-*like* determined that this molecule is annotated in the trypanosomatids database (tritrypdb) as a hypothetical protein, but contains 2 domains, one corresponding to the N-arrestin superfamily (SSF81296) and a PFAM domain (PF03643) characteristic of the vacuolar classification protein 26 (Vps26).

In order to understand how TcVps26-*like* could be participating in the invasion process of *T. cruzi* to the target cell, we determined the interactome of this protein in Knock-in parasites of HA-TcVps26-*like* (KI) using co-immunoprecipitation assays. The results showed that HA-TcVps26-*like* binds to heat shock proteins 85 and 83, as well as to triparedoxin peroxidase. These results suggest TcVps26-*like* could be a scaffold protein, that participate in the traffic of Transialidases towards the plasma membrane of the parasite that are involved in the parasite invasion process, and in the oxidation-reduction process that the parasite faces during its stage differentiation process.

Antecedentes

1. Antecedentes generales

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Actualmente 13 filos de protozoarios son reconocidos, entre los cuales se encuentra el subreino *Excavata* (*Euglenozoa*). De éstos, hay protozoos que usan sus pseudópodos y flagelos para locomoción, los cuales se encuentran en la clase *Zoomastigophorea*, subclase *Mastigóforos*. Entre estos últimos, hay protozoos flagelados que contienen una gran cantidad de ADN mitocondrial, que comprenden el orden *Kinetoplastida* y que forman un grupo de parásitos que contienen comensales de vida libre y parásitos flagelados. Todos los miembros de esta orden tienen cantidad variable de ADN del kinetoplasto (ADNk), localizado en un subcompartimento mitocondrial. De acuerdo con su morfología los eucariontes del orden *Kinetoplastida* se dividen en dos subórdenes principales: los uniflagelados *Tripanosomatidos* y los biflagelados *Bodinina*. La familia de *Tripanosomatidos* se compone de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, y a su vez el género *Trypanosoma* puede ser dividido en subgrupos de acuerdo al hospedero que infecta en un clado roedor, un clado aviar, y clado acuático, además de los tripanosomas africanos (*Trypanosoma brucei* y parientes) y los grupos stercoraria americana de *Trypanosoma cruzi* y especies relacionadas (Teixeira, Hecht et al. 2011).

T. cruzi, que es el parásito en estudio en este trabajo de investigación, es un protozoo flagelado intracelular, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, el cual fue descubierto en 1909 por el medico brasileño Carlos Chagas (Burleigh and Woolsey 2002) (Navarro, De Lima et al. 2003) (Lima, Oliveira et al. 2010).

1.2 Organización del Genoma de *T. cruzi*

El tamaño del genoma haploide de *T. cruzi*, clona CL Brener perteneciente al DTU VI, se estima que es entre 106.4 y 110.7 Mb, organizado dentro de 41 pares de cromosomas con un rango de tamaño de 78 kb a 2.4 Mb. El genoma de *T. cruzi* codifica para aproximadamente 22,570 proteínas, incluyendo 12,570 pares alélicos. Al menos el 50% del genoma de *T. cruzi* son secuencias repetidas, que consisten

principalmente en una gran familia de proteínas de superficie, retrotransposones y repetidos subteloméricos (El-Sayed, Myler et al. 2005). Los genes que codifican proteínas están organizados en grupos de genes direccionales (DGCs, por sus siglas en inglés de *directional gene clusters*), similar a la organización de operones bacterianos. Los DGCs adyacentes se encuentran generalmente en cadenas opuestas del ADN, ya sea en una orientación divergente o en una orientación convergente. El orden de los genes en un cromosoma particular se conserva en grandes bloques, y las regiones entre los DGCs, que se denominan regiones de cambio de hebra (SSRs, por sus siglas en inglés *strand switch regions*), pueden representar islas de iniciación de la transcripción y terminación (Teixeira, Hecht et al. 2011).

El ADN del cinetoplasto (ADNk) se encuentra dentro de la matriz mitocondrial, y la posición del cinetoplasto en relación con el núcleo cambia durante el ciclo de vida de la célula permitiendo distinguir las diferentes formas de desarrollo del parásito. Sin embargo, el cinetoplasto siempre se encuentra cerca del cuerpo basal, al que está ligado físicamente por un conjunto de filamentos. Esta conexión es crucial durante la segregación del genoma mitocondrial en el tripanosoma. El ADNk comprende del 15-30% del total de ADN celular y difiere del ADN nuclear en su densidad de flotación, en la relación de bases y el grado de desnaturalización. Además, se compone de moléculas circulares que se entrelazan para formar una red única, y se encuentran en dos tipos de anillos: minicírculos y maxicírculos. Hay aproximadamente 15,000 minicírculos de *T. cruzi*, con un tamaño promedio de 1.4 kb, y unas cuantas docenas de maxicírculos, que varían de 20 a 40 kb de longitud (Teixeira, Hecht et al. 2011). Los minicírculos codifican ARN guías (ARNg) pequeños que participan en la transcripción de los maxicírculos por inserción o eliminación de uridinas, un proceso conocido como edición del ARN. Los maxicírculos son estructural y funcionalmente análogos al ADN mitocondrial de los eucariontes superiores y codifica para ARNs ribosomales y subunidades de complejos respiratorios del parásito (Teixeira, Hecht et al. 2011).

1.3 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las 13 enfermedades tropicales más olvidadas. Esta enfermedad ha afectado a la humanidad desde la antigüedad, y sigue siendo un problema social y económico relevante en muchos países de América Latina. La enfermedad de Chagas tiene dos fases: aguda y crónica. La fase aguda es usualmente asintomática en el 90% de los casos o suele presentarse como una enfermedad febril. Cuando hay síntomas (aproximadamente en el 10% de los casos), estos aparecen de 1 a 2 semanas después de la exposición al *triatomino* infectado y entre los síntomas se encuentran: la inflamación en el sitio de inoculación (chagoma), edema palpebral unilateral (signo de Romaña), fiebre, dolor de cabeza, dolor articular y muscular, anorexia, vómitos, diarrea, somnolencia, apatía, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, edema y convulsiones. Esta fase suele desaparecer espontáneamente en 2-4 meses. Sin embargo, algunos casos agudos (2-6%) pueden conducir a la muerte, lo cual se debe principalmente a la miocarditis y meningoencefalitis. Durante la fase crónica se pueden presentar dos formas, una indeterminada o latente y una forma sintomática. Un alto porcentaje de pacientes con enfermedad de Chagas permanecen en la forma indeterminada durante 10 o 30 años o incluso de por vida. Estos pacientes suelen permanecer asintomáticos, sin signos clínicos o físicos de la enfermedad, pero con serología positiva. Entre los pacientes chagásicos con manifestaciones clínicas, el 94,5% de los casos se ven afectados por problemas del corazón: el 38,5% de estos pacientes chagásicos mueren repentinamente, y el 56% va a sucumbir a la insuficiencia cardíaca después de un tiempo. El 5,5% restante desarrolla síndromes del aparato digestivo, ya sea megaesófago o megacolon. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas incluyen trastornos del sistema nervioso central y periférico, así como disfunciones endócrinas (Carabarin-Lima, González-Vázquez et al. 2013) (Rassi, Rassi et al. 2010) (Teixeira, Hecht et al. 2011).

1.4 Epidemiología

La enfermedad de Chagas es un padecimiento potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *T. cruzi*. Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas, distribuyéndose la enfermedad sobre todo en zonas endémicas de 21 países de América Latina (OMS, 2010).

En la última década, debido a un incremento en los niveles de migración, han ocurrido importantes cambios epidemiológicos, y la enfermedad se ha expandido a países no endémicos de Norteamérica, como Estados Unidos y Canadá, la Región del Pacífico Occidental como Australia y Japón, así como en diferentes países de Europa (**Figura 1**) (Liu and Zhou 2015).

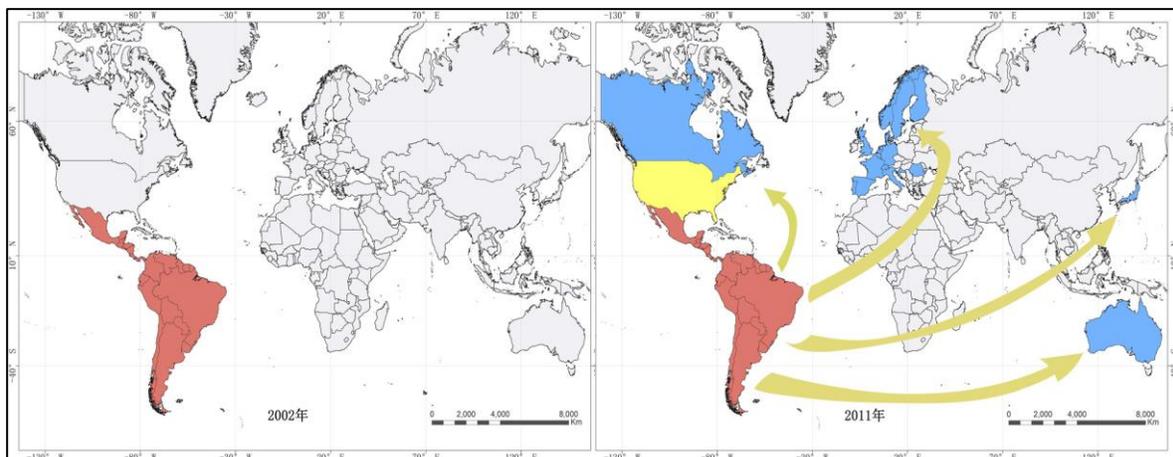


Figura 1. Mapa que muestra las zonas endémicas y datos de cambios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas, entre 2002 y 2011. En rojo se muestran las áreas endémicas donde la transmisión es a través de vectores, en amarillo se muestran las áreas endémicas donde la transmisión es ocasionalmente a través de vectores y en azul se refiere a áreas no endémicas donde la transmisión es a través de transfusión sanguínea o trasplante de órganos, etc. (Tomado de Liu and Zhou 2015)

México es endémico para la infección por *T. cruzi* y hay un total de 18 áreas endémicas principales, localizadas en el sureste del país incluyendo a los estados de Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Hidalgo y

Morelos. Una encuesta serológica nacional realizada de 1987-1989 reportó una seroprevalencia de *T. cruzi* del 1,6% en población abierta, lo que corresponde por lo menos de 1 a 2 millones de personas expuestas al parásito en el país. Además, se ha calculado de acuerdo al número de habitantes, que podrían haber aproximadamente 70,000 casos nuevos por año y una mortalidad del 5-6 % (25,000 casos) (Carabarin-Lima, González-Vázquez et al. 2013).

1.5 Mecanismo de transmisión de *T. cruzi*

Los mecanismos para la transmisión de la infección de Chagas a humanos pueden ser divididos en primarios o principales, o en secundarios. Entre los principales mecanismos se encuentran el vector (80%), transfusión sanguínea (16%), placentaria, o transmisión congénita o por el canal vaginal al momento del nacimiento (3%). Los mecanismos secundarios son considerados por ser menos frecuentes (1%), tales como accidentes en los laboratorios o manejo de los animales infectados, la ingestión de carne cruda de animales infectados, los trasplantes de órganos procedentes de donantes infectados con *T. cruzi* y la transmisión sexual (Coura 2015).

Como se mencionó anteriormente, *T. cruzi* es transmitido principalmente por *triatominos*, que son una subfamilia de insectos perteneciente a la familia *Reduviidae*, del orden *Hemiptera*, los cuales son hematófagos obligados durante todo su ciclo de vida. Existen más de 100 especies de *triatominos* distribuidos en el continente Americano. La mayoría de estas especies están presentes exclusivamente en la vida silvestre transmitiendo al parásito a animales silvestres (ciclo selvático), pero algunas especies se han adaptado colonizando las casas, por lo que son de gran importancia para la transmisión de *T. cruzi* al humano (ciclo domiciliado). Entre las especies de vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre se encuentran *Triatoma infestans* (**Figura 2**), *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* (Teixeira, Hecht et al. 2011) (Rassi, Rassi et al. 2010).



Figura 2. *Triatoma infestans*, el principal transmisor de *T. cruzi* en seres humanos en Sur América. El triatomino adquiere la infección parasitaria al alimentarse de sangre de un animal o humano infectado (Tomado de Teixeira, Hecht et al. 2011).

En México se albergan una de las poblaciones de *triatominos* más diversa, con 39 especies documentadas, y al menos 21 de ellas están infectadas naturalmente con *T. cruzi*, siendo las de mayor importancia epidemiológica: *Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. infestans*, *T. mazzotti*, *T. mexicana*, *T. gearslaeckeri*, *T. picturata*, *Rhodnius prolixus*, *Dipetalogaster maxima* y *Panstrongylus* spp.



Triatoma dimidiata



Triatoma barberi

Figura 3. *Triatoma dimidiata* y *triatoma barberi*, principales especies de *triatominos* distribuidos en México (Tomado de (Hotez 2008)).

1.6 Ciclo biológico de *T. cruzi*

T. cruzi tiene un ciclo de vida en el cual se presentan cuatro formas de desarrollo, que se alternan entre el vector (epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos) y el hospedero mamífero (amastigotes y tripomastigotes sanguíneos) (Hernandez-Osorio, Marquez-Duenas et al. 2010). El ciclo inicia cuando el

triatomino ingiere sangre del hospedero, la cual contiene tripomastigotes infectivos circulantes. Una vez en el intestino medio del insecto, el tripomastigote se transforma en la forma replicativa de epimastigote. En el extremo posterior del tracto digestivo, los epimastigotes se transforman en la forma infectiva no replicativa de tripomastigote metacíclico, los cuales son eliminados en las heces del insecto (Lima, Oliveira et al. 2010). El parásito es capaz de penetrar en el nuevo hospedero, si la piel se rompe por la picadura del insecto, por medio de otros cortes y abrasiones o por mucosa intacta (Clayton 2010). Durante la invasión de diferentes tipos de células, incluyendo macrófagos, células del músculo liso y estriado, y fibroblastos, los tripomastigotes penetran a la célula a través de una estructura conocida como vacuola parasitófora; de la que posteriormente escapan, se diferencian en amastigotes y se replican libremente en el citosol. Después de nueve ciclos de división binaria, los amastigotes se diferencian de nuevo en los tripomastigotes sanguíneos que son muy móviles, siendo liberados por la rotura de la célula hospedera. Por último, la mezcla de tripomastigotes y amastigotes presentes en la sangre de un mamífero infectado, propagan la infección a otras células o completan el ciclo de vida del parásito al ser tomados por un *triatomino* no infectado, durante su ingesta sanguínea (Tyler and Engman 2001).

1.7 Proceso de invasión de *T. cruzi*

La interacción de *T. cruzi* con la célula hospedera y la matriz extracelular ocurre a través de un largo y diverso grupo de glicoproteínas de superficie y proteasas del parásito. Curiosamente, muchas de estas glicoproteínas comparten la fracción de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Las proteínas ancladas a GPI se sintetizan primero en el retículo endoplásmico y posteriormente se adhieren a este orgánulo como proteínas luminales. Una vez estando en el aparato de Golgi, estas proteínas se someten a modificaciones y después de ser transportadas por vesículas, se fusionan a la membrana plasmática, resultando en proteínas extracelulares. Las estructuras y funciones de estas proteínas son diversas, participando en adhesión, señalización parácrina, como enzimas de superficie y diferenciación celular. En otros sistemas eucarióticos, los tripanosomas fueron

reconocidos como células con alta expresión de proteínas ancladas a GPI. En el caso de *T. brucei*, estas proteínas forman una capa clásica de VSG (por sus siglas en inglés de *Variant Surface Glycoprotein*), que utiliza el parásito para la evasión del sistema inmune. En el caso de *T. cruzi*, muchas de estas proteínas ancladas a GPI participan durante el proceso de infección al interactuar con la célula hospedera (Burleigh and Woolsey 2002).

Los mecanismos y las rutas de la invasión de células varían en gran medida con el tipo de célula hospedera, en donde los tripomastigotes de *T. cruzi* son capaces de invadir directamente tanto a los fagocitos profesionales como a las células no fagocíticas. Entre los fagocitos profesionales, los macrófagos residentes de tejido son blancos para la infección primaria y se sabe que los tripomastigotes infectan las células fagocíticas profesionales mediante TLR-2 y TLR-9. En el caso de células no fagocíticas, se ha descrito más de una vía de entrada del parásito. Una de éstas, se basa en señales mediadas por calcio que inducen el tráfico lisosomal a la superficie de la membrana de la célula blanco, que proporciona membrana para la formación de la vacuola parasitófora de una manera dependiente de polimerización de actina y microtúbulos. Otra manera es a través de una invaginación de la membrana plasmática, que implica la señalización de quinasa PI3 y que es independiente de la polimerización de actina.

La capacidad para la invasión celular no está restringida a tripomastigotes metacíclicos o derivados de células. Ya que tanto los amastigotes como los epimastigotes son capaces de establecer infecciones (Florencio-Martínez, Márquez-Dueñas et al. 2010). A diferencia de los tripomastigotes, los amastigotes invaden de una manera dependiente de Ca^{2+} insensible a la inhibición de PI3 pero involucra tanto señalización de AMPc como liberación de Ca^{2+} (Epting, Coates et al. 2010).

1.8 Proteínas de superficie

Durante el proceso de infección los parásitos deben sobrevivir, tener acceso a la superficie de la célula, y formar uniones estables con la célula hospedera antes de su entrada (Epting, Coates et al. 2010). Para que el proceso de invasión se lleve

a cabo, el primer paso es la adhesión de los tripomastigotes a la célula hospedera por medio de moléculas de superficie tales como proteínas ancladas a GPI (glicosilfosfatidilinositol) y proteasas. Estas moléculas están involucradas en el desencadenamiento de vías de señalización tanto en el parásito como en la célula hospedera (Martins, Souza et al. 2015). Durante el ciclo de vida del parásito se establecen diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi*, los cuales expresan un subgrupo diferente de proteínas ancladas a GPI en la superficie celular. Estas proteínas son codificadas por miembros de las familias de multigenes, tales como transialidasas (1160), mucinas (1262), proteínas de superficie asociadas a mucinas (1730) y metaloproteinasas (142) (Nakayasu, Yashunsky et al. 2009).

Las transialidasas juegan un papel importante en la transferencia de ácido siálico desde proteínas de superficie de la célula hospedero hasta las mucinas parasitarias, pues se ha establecido que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico (Giorgi and de Lederkremer 2011). Estas moléculas se caracterizan por la presencia de tres dominios: un dominio N-terminal que contiene un sitio de unión, un dominio globular en el extremo carboxilo con una organización tipo lectina, y un dominio C-terminal que está formado por repetidos de 12 aminoácidos conocido como SAPA (por sus siglas en inglés *shed acute phase antigen*). Esta superfamilia se divide en ocho grupos: A) Grupo I que posee función de transialidasa. B) Grupo II que está compuesto por glicoproteínas llamadas gp85 y que forman parte de la superficie del parásito, como por ejemplo Tc-85, gp90 y gp82. Estas moléculas inducen la activación de vías de señalización de calcio, llevando a la remodelación del citoesqueleto de la célula hospedera y el reclutamiento de lisosomas al sitio de entrada del parásito. Este evento es requerido para la formación de la vacuola parasitófora y está relacionado con los procesos de adhesión e invasión de la célula hospedera. C) Grupo III, que contiene proteínas de superficie asociadas al flagelo del parásito, como es el caso de FL-60, que es una proteína capaz de inhibir la vía del complemento de la célula hospedera. D) Grupos IV-VIII, compuesto por las proteínas Tc13, de los cuales se desconocen sus funciones (Oliveira, Freire-de-Lima et al. 2014).

Otras moléculas que participan en la adhesión de los parásitos a la célula hospedera son las mucinas, proteínas que tienen la capacidad de inducir la señalización de calcio y son cruciales para la aceptación de ácido siálico necesarias para la interacción parásito-hospedero (Yoshida and Cortez 2008, Giorgi and de Lederkremer 2011).

La interacción de *T. cruzi* a la célula hospedera por tanto, es un proceso complejo ya que son diversos los factores que determinan dicha interacción. Ejemplo de esto es el número elevado de cepas distintas de *T. cruzi*, las diferentes formas parasitarias que puede infectar a las células (tripomastigotes o amastigotes), la variedad de fuentes de tripomastigotes (MT: tripomastigotes metacíclicos, BT: tripomastigotes sanguíneos o TCT: tripomastigotes derivados de tejidos) y el tipo de célula hospedera implicada. Como se mencionó anteriormente, un gran número de moléculas están involucradas en la unión del parásito a la membrana plasmática de la célula hospedera. Por lo tanto, se ha propuesto que existe la posible participación de diversos ligandos de *T. cruzi*, tanto en células fagocíticas como no fagocíticas, aunque es poco lo que se sabe de lo que sucede posterior a la adhesión. Teniendo en cuenta la creciente lista de ligandos de *T. cruzi* y moléculas blanco de la célula hospedera, un gran número de interacciones celulares parásito-hospedero son posibles y esto podría explicar, la gran versatilidad mostrada por *T. cruzi* al invadir diferentes tipos de células (Romano, Cueto et al. 2012).

1.9 Trafico de proteínas en tripanosomátidos

La endocitosis en tripanosomátidos es un fenómeno que depende de la polaridad celular, debido a que el parásito cuenta con un corsé de microtúbulos que impide la entrada y salida de moléculas por cualquier parte de la membrana. Por lo tanto la endocitosis y la exocitosis se limitan en áreas de la membrana que no contienen microtúbulos subpelliculares. Estos microtúbulos interactúan con la membrana plasmática por medio de filamentos cortos, y están conectados entre sí formando una capa, en la cual estas estructuras mantienen una distancia de aproximadamente 44 nm. En contraste con los eucariontes superiores, en *T. cruzi* las moléculas extracelulares alcanzan el medio interno a través de dos sitios de

entrada: la bolsa flagelar y el citostoma (Silva, Sant'Anna et al. 2010). La bolsa flagelar es un compartimento extracelular formado por una invaginación de la membrana plasmática del parásito de donde emerge el flagelo, y se especializa en la captación y secreción de moléculas requeridas y/o liberadas por el parásito. Este orgánulo representa del 0.4 al 3% de la superficie celular, está altamente especializado y se considera como uno de los organelos más activos en el proceso de endocitosis, en la secreción de proteínas de la célula y en la adición de proteínas integrales de membrana a la superficie celular. El citostoma, es una invaginación profunda y estable de la membrana plasmática, que puede alcanzar la región nuclear y localizarse cerca de la bolsa flagelar. Este compartimento se observa sólo en las formas de amastigotes y epimastigotes de las especies *T. cruzi*, *T. vespertilionis* y *T. dionisii* (Silva, Sant'Anna et al. 2010); (Clayton, Hausler et al. 1995). En *T. cruzi*, se ha reportado que la endocitosis de vesículas que contienen macromoléculas de carga tales como transferrina, peroxidasa y las partículas de transporte como LDL, se liberan de la bolsa flagelar o de la porción posterior del citostoma. Posteriormente estas vesículas endocíticas se fusionan con endosomas tempranos para después unirse a reservosomas, los cuales son un tipo inusual de orgánulo clasificado como orgánulo relacionado con lisosomas (LROs por sus siglas en inglés de *lysosome-related organelles*). Este compartimento fue caracterizado como endosoma tardío, rico en cruzipaina y con un pH luminal de 6. Presenta una forma redonda con un diámetro de 0.4 a 0.6 μm , en donde se pueden contener pequeñas vesículas rellenas de lípidos tales como esterios de colesterol y proteínas (Soares 1999); (Porto-Carreiro, Attias et al. 2000).

1.10 Complejo retrómero

El complejo retrómero es un componente clave de la maquinaria de clasificación de proteínas endosomales, y funciona mediante el reconocimiento de las proteínas de membrana específicas de "carga", que están concentradas en regiones discretas de la membrana endosomal, lo cual permite el transporte de las proteínas cargo a su destino correcto (Seaman 2012). Este complejo media el transporte vesicular de

proteínas transmembranales desde los endosomas a la red de trans-Golgi y a la membrana plasmática (Liu 2016).

El complejo retrómero fue identificado por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae*, cuando se analizaron los genes involucrados en el reciclamiento vacuolar del endosoma hacia Golgi, del receptor Vps10p de la carboxipeptidasa Y (CPY) (Seaman, Marcusson et al. 1997). Este complejo comprende cinco proteínas codificadas por genes *VPS* (por sus siglas en inglés de *vacuole protein sorting*) en el genoma de levadura. El retrómero se caracteriza por ser un complejo heteropentamérico dividido en dos sub-complejos: el trímero Vps35, Vps29 y Vps26, el cual es conservado en todas las células eucariotas, e interactúa por medio de la subunidad Vps35 con las proteínas cargo, y por tanto se denomina sub-complejo cargo-selectivo. El segundo sub-complejo es un dímero conformado por Vps5 y Vps17, los cuales presentan una función estructural y son miembros de la familia de nexinas (SNX por sus siglas en inglés de *sorting nexin*) (Mukadam and Seaman 2015). El complejo retrómero en mamíferos comprende el trímero, Vps26-Vps29-Vps35, del cual Vps35 es el miembro más grande del sub-complejo cargo-selectivo. Esta subunidad tiene una estructura en forma de C e interactúa con la subunidad más pequeña, que es Vps29, a través de la región C-terminal y con Vps26 en el extremo N-terminal. Vps35 se conoce generalmente como la principal subunidad de unión a la proteína de carga. Vps29 es esencial para la interacción del sub-complejo Vps26-Vps35-Vps29 con el dímero SNX, y funciona como un andamio para el montaje del retrómero. Vps26 se une a Vps35 y permite la unión de la proteína cargo a la membrana del endosoma. El trímero no interactúa directamente con los lípidos de membrana del endosoma, pero permanece asociado con el endosoma debido a las interacciones con la GTPasa pequeña Rab7a, o con la SNX3. Por otra parte, los homólogos de Vps5 son SNX1 y SNX2, mientras que para Vps17 son SNX5 y SNX6. Las nexinas poseen un dominio PX (que contienen homología con el dominio phox), el cual es el responsable de la unión a fosfatidilinositol 3-fosfato de la membrana de los endosomas y a un dominio BAR (por sus siglas en inglés Bis/amphiphysin/Rvs) que se encuentra en la región C-terminal que presenta una estructura en forma de "C" cuando está dimerizado. Este dominio detecta la curvatura de la membrana y

promueve la formación de túbulos (Reddy and Seaman 2001, Klinger, Siupka et al. 2015). En la **Tabla 1** se incluyen las proteínas transmembranales reportadas hasta el momento, que requieren del complejo retrómero para su correcta distribución en la célula (Seaman 2012).

Tabla 1. Proteínas cargo que son transportadas por el complejo retrómero (Tomada Seaman, 2012)

Cargo protein	Species identified	Sorting motif	Physiological process
Vps10p	Yeast	FYVFSN	Hydrolase sorting
Ftr1p	Yeast	HLPFTKNLQ ^a	Iron transport
Wntless/MIG-14	Flies, Worms	??	Wnt secretion
CED-1	Worms	??	Apototic cell clearance
CIMPR	Mammals	WLM	Hydrolase sorting
Sortilin	Mammals	FLV	Hydrolase sorting
DMT1-II/Slc11a2	Mammals	YLL	Iron transport
pIgA receptor	Mammals	??	Polymeric IgA transport
Crumbs (Crb)	Mammals, Flies	??	Cell polarity
SorL1/SorLA	Mammals	FTAFANSHY	APP localisation
TGN38 and TGN46	Mammals	??	Not known
β2-adrenergic receptor	Mammals	PDZ motif ^b	GPCR

1.11 Proteína de clasificación vacuolar 26 (Vps26)

Vps26, miembro del complejo retrómero, es una proteína con un peso molecular de 38 kDa y una longitud de 327 residuos de aminoácidos, presenta dos parálogos Vps26A y Vps26B en humano y ambos son capaces de interactuar con otras subunidades del retrómero (Shi, Rojas et al. 2006, Hierro, Rojas et al. 2007).

Vps26 consta de dos dominios y cada uno se pliega es una curvatura profunda β-sándwich. Cada sándwich está formado por hojas β antiparalelas de cuatro hebras, contra una hoja β antiparalela de tres o cuatro hebras, en el dominio N-terminal (Dominio N, residuos del 6 al 148) y en el dominio C-terminal (Dominio C, residuos del 164 al 299), respectivamente. Presenta un *loop* que contiene 15 residuos que abarcan del aminoácido 149 al 163 que se encarga de conectar los dos dominios y es realmente móvil. El dominio N y C terminal están relacionados por un eje de rotación con dos pseudo-plegues intramoleculares. Vps26 es eléctricamente polarizada y en su superficie contiene un parche básico prominente y dos parches ácidos. Los residuos en este parche básico se conservan desde

levadura hasta el humano. El segundo parche ácido se extiende a ambos lados de la interface entre los dos dominios y sólo se conserva parcialmente en levadura. Además contiene un parche electropositivo en el otro extremo del dominio N, el cual contiene residuos conservados: Lys61, Arg62, Arg138 y Arg139. Por otra parte, varios residuos de fenilalanina (Phe) sobresalen en solución inmediatamente contigua al parche básico. Esta combinación de residuos hidrofóbicos y básicos expuestos, es una característica de las estructuras de unión a la membrana (Shi, Rojas et al. 2006). Debido a su plegamiento, Vps26 adquiere un parentesco estructural a las arrestinas, una familia de proteínas que se caracterizan por conectar a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y a moléculas de clatrina durante la endocitosis; por lo tanto, juegan un papel esencial en la señalización celular y el tráfico de membrana (Aubry, Guetta et al. 2009). Una de las características que definen a las proteínas de la familia de las arrestinas, es la existencia de un núcleo polar incrustado entre los dos dominios. Esta característica la comparte Vps26 en el sentido general, ya que el dominio de la interface contiene grupos de interacciones polares ocultas. La extensión global de los núcleos polares son similares, aunque la identidad de los aminoácidos individuales no se conserva (Shi, Rojas et al. 2006).

2. Antecedentes directos

La adaptación de *T. cruzi* a diversos ambientes encontrados en los diferentes hospederos, induce una compleja regulación en la expresión de genes, que preceden y que son concomitantes a los cambios morfológicos observados durante la transformación del parásito. Esta transformación de estadio es un proceso progresivo y continuo con la formación de diferentes formas intermedias (FIs), que parecen seguir el mismo camino de diferenciación, independientemente de si existen en el hospedero invertebrado o vertebrado. Las FIs aparecen transitoriamente durante la diferenciación de epimastigote a tripomastigote metacíclico (metaciclogenesis) en el triatomino, y en la diferenciación de tripomastigotes metacíclicos o de tripomastigotes derivado de tejido en amastigotes (amastigogenesis primaria y secundaria, respectivamente), y también de amastigotes a tripomastigotes sanguíneos (tripomastigogénesis) dentro de las

células hospederas de mamíferos (Hernandez-Osorio, Marquez-Duenas et al. 2010).

En el laboratorio se obtuvo una forma intermedia durante la amastigogénesis secundaria *in vitro*, a partir de la cual se realizaron estudios de expresión diferencial con respecto a tripomastigotes, en donde se obtuvieron 10 diferentes productos de substracción en un rango de 200 a 2000 pb. A partir de estos productos, se construyó una biblioteca de substracción en *pGEM-T Easy*. El análisis de la expresión diferencial de los ARNm entre la FI, tripomastigotes y amastigotes, identificó 37 secuencias que se expresan diferencialmente en la FI. El análisis *in silico* de las 37 secuencias indicó que 14 de estas corresponden a secuencias reportadas como secuencias hipotéticas y las 13 restantes tienen homología con proteínas ya reportadas. Se realizó el análisis funcional de una de estas clonas denominada inicialmente TcArrestina (TcCLB.506941.210/NCBI: XM_813993.1), mediante la generación de parásitos *Knock-down* (KD) que expresan una ARNm antisentido (ARNmAS) al ARNm en estudio y se evaluó su participación en el proceso de infección y diferenciación del parásito en fibroblastos 3T3 NIH. El análisis por PCR mostró que los parásitos transfectados expresan el ARNm antisentido (PCR tiempo final), con la consecuente disminución del ARNm endógeno de TcArrestina (PCR tiempo real), demostrando la obtención de los parásitos KD. El análisis fenotípico de los parásitos KD mostró que fueron aproximadamente 98% menos infectivos que los parásitos control mock. Además cuando se evaluó la liberación de parásitos KD al sobrenadante de las células infectadas, se observó un menor número de parásitos de TcArrestinaAS (99.8% menos) en comparación con los parásitos control. Estos resultados mostraron que TcArrestina puede estar participando en el proceso de infección del parásito. Para determinar en qué punto del proceso de infección estaba el defecto, se estudiaron las diferentes etapas del proceso de infección (invasión, diferenciación de tripomastigote a amastigote, multiplicación, diferenciación de amastigote a tripomastigote y salida) de los parásitos KD y control. Los resultados mostraron que los parásitos KD no invaden (0% de eficiencia invasión) a las células blanco durante las primeras 48 horas de la infección, a diferencia de los parásitos control mock y

silvestres que mostraron alrededor del 7% de eficiencia en invasión, sugiriendo que probablemente el defecto observado en los parásitos KD de TcArrestina en el proceso de infección observado anteriormente, es a nivel de la invasión a células (Rubio-Ortiz, 2012. Tesis de Maestría).

Ya que se observó una clara participación de TcArrestina en el proceso de infección del parásito, en particular en la invasión a la célula blanco, se decidió continuar con una caracterización más profunda de dicha molécula. Por lo tanto, se realizó un análisis *in silico* más profundo de su secuencia, usando el banco de datos generales y el banco de datos de *T. cruzi*. Nuestra secuencia en estudio está anotada en el banco de datos de *T. cruzi* como hipotética, por no tener homología con alguna secuencia con función conocida. Se encontró también que contenía un dominio que corresponde a la super-familia de N-Arrestinas, por lo cual le dimos originalmente el nombre de TcArrestina-like de *T. cruzi*. Dicho dominio está compuesto por tres miembros: pfam00339, pfam07070 y pfam03643, de los cuales TcArrestina-like de *T. cruzi* contiene específicamente al dominio pfam03643, propio de la proteína de clasificación vacuolar 26 (Vps26) perteneciente a la familia de las Arrestinas, por lo que se le nombró desde ese momento en adelante como TcVps26-like de *T. cruzi*.

Ya que demostramos que parásitos KD para TcVps26-like afecta el proceso de infección, y que esta proteína participa de alguna manera en el proceso de invasión de la célula blanco, el siguiente paso es determinar cómo lleva a cabo dicha función. Como se dijo anteriormente TcVps26 forma parte del complejo retrómero, encargado de reciclar moléculas de superficie del parásito, por lo que posiblemente la función de TcVps26 en el proceso de invasión, es de manera indirecta al reciclar las moléculas de superficie del parásito que son las que tendrían posiblemente la función directa en dicho proceso. Por lo tanto, identificar el interactoma de TcVps26-like, permitiría identificar no sólo a los otros componentes del complejo retrómero sino también a las proteínas cargo que son transportadas por este medio y que serían posiblemente las directamente involucradas en el proceso en estudio.

3. Justificación

El proceso de invasión de *T. cruzi* a la célula blanco, es un paso determinante para que el parásito sea capaz de completar su ciclo de vida, establezca una infección eficiente y desarrolle la patogenia de la enfermedad. Sin embargo, son pocas las moléculas que participan en el proceso de invasión que han sido identificadas y caracterizadas hasta el momento.

4. Hipótesis

Durante la interacción parásito-célula blanco, TcVps26-*like* de *T. cruzi* se une a proteínas que tienen un papel en el proceso de invasión del parásito.

5. Objetivo general

Analizar el interactoma de TcVps26-*like* durante el proceso invasión de *T. cruzi*.

5.1 Objetivos Particulares:

- 5.1.1.1 Evaluar la expresión de HA-TcVps26-*like* ectópica en epimastigotes transfectantes estables
- 5.1.1.2 Analizar las proteínas asociadas con HA-TcVps26-*like* usando ensayos de co-inmunoprecipitación
- 5.1.1.3 Determinar el perfil de interacción de HA-TcVps26-*like*, durante el proceso de invasión de *T. cruzi*
- 5.1.1.4 Identificar a los componentes del interactoma de HA-TcVps26-*like* obtenido anteriormente, mediante MS/MS.

6. Materiales y métodos

6.1 Parásitos

Epimastigotes transfectantes estables con la construcción HA-TcVps26-*like* y parásitos MOCK de la cepa CL Brener, fueron cultivados a 28°C en medio LIT (*Liver infusion-Triptosa*) complementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 0.5% de ampicilina-estreptomicina y Hemina a una dilución 1/200 a partir de un stock de 5 mg/ml. Los parásitos fueron resembrados cada 4 días en una dilución 1:10 para su mantenimiento.

Los parásitos HA-TcVps26-*like* fueron obtenidos en un trabajo previo en el cual se utilizó el vector de expresión pTREX-n para su construcción (Rubio-Ortiz, 2012. Tesis de Doctorado). Este vector tiene un promotor homólogo fuerte de ARNr que permite altos niveles de expresión constitutiva de la secuencia clonada. Además contiene secuencias intergénicas HX1 y GAPDH que proporcionan sitios de *trans-splicing* y poliadenilación que le ayudan a tener una expresión eficiente. Este vector se integra a una región ribosómica del parásito la cual se ha demostrado que no le causa ningún efecto deletéreo en el parásito transfectado (Lorenzi, Vazquez et al. 2003).

6.2 Línea celular

Fibroblastos 3T3 NIH de embrión de ratón (ATCC Numero CLR -1658™), fueron sembrados en cajas de cultivo *Corning* (100 X 20 mm de diámetro) a una razón de pase de 1:10 con 10 ml de medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO*) alto en glucosa, suplementado con 10% SFB y 0.5% de solución penicilina-estreptomicina (10,000 U/ml en solución salina de NaCl al 0.85%), e incubados a 37°C y 5% de CO₂ hasta una confluencia del 80%. Para su resiembra, las monocapas al 80% de confluencia fueron lavadas con 3 ml de PBS1X-EDTA 0.53 M, se agregó 1 ml de tripsina-EDTA y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente las cajas fueron agitadas ligeramente para desprender las células y

se tomó 100 µl de la suspensión celular para colocarla en una nueva caja con medio nuevo para mantener el stock.

6.3 Ensayo de inmunofluorescencia

Se obtuvieron 5×10^6 epimastigotes y se lavaron con PBS1X centrifugando 3000rpm/10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, se repitió el paso de lavado, la pastilla obtenida fue resuspendida en PBS 1X y se colocaron aproximadamente 1×10^5 parásitos sobre portaobjetos tratados con poly-L-Lisina (Silane-Prep slides SIGMA DIAGNOSTICS, catalog number S4651). Los portaobjetos se dejaron secar y se permeabilizó a los parásitos con Tritón X-100 al 0.1% en PBS 1X estéril en cámara húmeda a TA, durante 15 minutos. Posteriormente se bloquearon las muestras con BSA (Albumin, bovine, Cohn fraction V pH 7.0) al 2% en PBS 1X estéril a 37° C por 1 hora y se lavaron con PBS 1X. Se incubaron las laminillas con 100 µl de una dilución de 1:100 del anticuerpo primario α -HA (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. #cat sc-7392) a 4° C durante toda la noche en cámara húmeda. Se lavaron con PBS 1X, se incubaron con 100 µl de una dilución 1:100 del anticuerpo secundario Alexa fluor 546 (Invitrogen #catA11003) y se montaron con vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories Cat. H-1000). Las muestras fueron analizadas en el microscopio confocal.

6.4 Obtención de extracto total de proteínas

Se obtuvieron 2×10^8 parásitos transfectantes estables con pTrexn-HA-Vps26-*like* y con pTREXn como control, se centrifugaron a 3000 rpm/10 minutos, se lavaron con PBS 1X y se pusieron a interactuar con células 3T3-NIH durante 2 y 48 horas. Pasado el tiempo de incubación se obtuvieron los parásitos centrifugando a 3000rpm/10 minutos y se realizaron lavados con PSB 1X centrifugando en cada lavado. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en 500 µl de Buffer de lisis (Tris-HCl 250 mM pH 7.4, Nonidet 40 [Np40] 1 %, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Glicerol 5%) y 25 µl de la mezcla de inhibidores de proteasas Complete® (ROCHE). A continuación se incubaron a 4°C durante 30 minutos en agitación. Finalmente los

sobrenadantes se cuantificaran por el método de Lowry utilizando el kit Protein Assay (BIO-RAD cat: 500-0013 y 14) y se verificó su integridad mediante geles de SDS-PAGE al 12%.

6.5 Western blot

Los extractos totales de proteínas se hirvieron con Buffer de carga 2X (Tris 1M pH 6.8, SDS 2.5%, Glicerol 5%, DTT 200 mM) y se cargaron en geles SDS-PAGE al 12%. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad cat#162-0115) a 100V durante una hora y media y se verifico la eficiencia de la transferencia tiñendo la membrana con rojo Ponceau (Sigma cat: P-7170) y destiñéndola con PBS 1X (NaCl 0.14M, KCL 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM). Una vez comprobada la eficiencia de la transferencia la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche Svelty al 6% en PBS1X-Tween 0.05% durante una hora. Se descartó la solución de bloqueo y se dejó incubando toda la noche con el anticuerpo primario α -HA (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. #cat sc-7392) en una dilución 1:100 en leche Svelty al 6% en PBS1X-Tween 0.05%. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS1X-Tween 0.05%. Se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG (H+L) conjugado a peroxidasa (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. #cat sc-2005) a una dilución 1:5,000 en leche Svelty al 6% en PBS1X-Tween 0.05% durante hora y media. La membrana fue lavada nuevamente con PBS1X por 5 minutos y posteriormente se revelado por quimioluminiscencia siguiendo las especificaciones del proveedor (Thermo scientific Prod #cat 34080).

6.6 Ensayos de co-inmunoprecipitación

Primero se realizó la preparación de la resina, la cual se equilibró colocando 50 μ l de éstas en columnas acopladas a microtubos de 2 ml (Handee Spin Cup PIERCE). A la resina se la añadió 200 μ l de buffer de acoplamiento 1X (NaCl 0.14 M, Na₂HPO₄ monobásico 0.008 M, KH₂PO₄ dibásico .002 M KCl 0.01 M, NaN₃ 0.05 %, pH 7.4, 4 °C) y se centrifugó a 1,000 g, 4°C por 1 minuto, repitiéndose el proceso un total de 3 veces. Posteriormente se realizó el acoplamiento del

anticuerpo con la resina, utilizando 10 µg de anticuerpo α-HA (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. #cat sc-7392) resuspendido en buffer de acoplamiento 1X hasta alcanzar un volumen final de 200µl, y se le añadió 3 µl de la solución de cianoborohidruro de sodio NaCNBH₃. Los microtubos se incubaron en un rotador orbital a temperatura ambiente durante 120 minutos. Al término de esta incubación la columna se centrifugó a 1,000 g a 4°C por 1 minuto, recolectando en un tubo nuevo la fracción no unida, la cual se guardó para futuros análisis. Después se realizó un lavado a la columna con buffer de acoplamiento 1X centrifugando a 1,000 g, 4°C por 1 minuto y desechando la solución de flujo, se repitió el lavado y se realizó un lavado adicional con buffer de inactivación (Tris HCl 1 M pH 7.4 4°C). Posteriormente se colocaron 200 µl de buffer de inactivación a la resina y se agregaron 3 µl de NaCNBH₃, dejando incubar la muestra durante 15 minutos en un rotador orbital a temperatura ambiente. Después se eliminó el líquido de desecho centrifugando a 1,000 g a 4°C por 1 minuto y se realizaron 2 lavados con buffer de acoplamiento 1X y 6 lavados con solución de lavado (NaCl 1M) usando las mismas condiciones de micro centrifugación anteriores. De manera paralela al acoplamiento de las columnas, se realizó el mismo procedimiento para cada una de las columnas empleadas como control negativo, que incluyen la columna acoplada con un anticuerpo no relacionado (α-GST de ZYMED, IgG2b producido en ratón, 13-6700) y la columna que contenía solo la resina sin anticuerpo unido.

Siguiendo con el protocolo se realizó el preaclareado de los extractos de proteínas poniendo en una columna nueva 80 µl de la resina control y se centrifugó para remover el buffer de almacenamiento, se agregó buffer de acoplamiento 1X, se centrifugó a 1,000 g, 4°C por 1 minuto descartando el líquido, se agregó el extracto a la columna y se incubó a 4°C durante una hora en un rotador orbital. Pasado este tiempo se centrifugó a 1,000 g, 4°C por 1 minuto y se guardó el extracto proteico liberado en la centrifugación.

Para el ensayo de co-inmunoprecipitación se utilizó la columna preparada como se mencionó anteriormente y se colocó el extracto de proteínas previamente preaclareado de los parásitos transfectantes estables con pTrexn-HA-Vps26-*like* y con pTrexn. A las columnas control también se les agregó extracto de proteínas de

parásitos transfectantes estables con pTrexn-HA-Vps26-*like* y con pTrexn. Las columnas con los extractos de dejaron incubando en un rotador orbital toda la noche a 4°C. Al término de esta incubación se centrifugaron las columnas y el flujo obtenido se guardó para futuros análisis. La resina se lavó 3 veces con buffer de lavado/lisis (Tris-HCl 250 mM pH 7.4, Nonidet 40 [Np40] 1 %, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Glicerol 5%) y se centrifugó después de cada lavado en las mismas condiciones anteriores.

Para la elución se colocaron las columnas en tubos nuevos y se añadió 10 µl de buffer de elución (Aminas primarias pH 2.8). Se centrifugó y se volvió a agregar 50 µl de buffer de elución, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó y guardó el líquido obtenido. El producto de elución se analizó en geles SDS-PAGE al 12% y se tiñeron los geles con plata utilizando el kit SILVER QUEST (Invitrogen #cat: LC6070) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

6.7 Preparación de muestras para Espectrometría de masas

Para la preparación de las muestras, primero se cortaron los carriles y se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1mm hasta completar el total del carril para su análisis. Se procedió a desteñir cada fragmento de gel adicionando 100 µl de solución desteñidora del kit SILVER QUEST (50 µl de solución A y 50 µl de solución B) e incubando 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se removió el sobrenadante con una micropipeta, se le adicionó 200 µl de agua ultrapura y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, repitiéndose los lavados 2 veces más. Después se adicionó 200 µl de metanol al 100% por 5 minutos a temperatura ambiente, se removió el metanol y se agregó 200 µl de metanol al 30% por 5 minutos. Se eliminó el metanol al 30% y se le agregó de nuevo metanol al 100% incubando 5 minutos. Se quitó el metanol y se adicionaron 200 µl de metanol al 100% otros 5 minutos. Pasado el tiempo se quitó todo el metanol de las muestras y se secaron parcialmente en el *SpeedVac* por 10 minutos. A continuación se agregó 50 µl de DTT, se incubó 35 minutos a 56°C, se retiró el DTT y se agregaron 70 µl de IAA (iodoacetamida). Se incubaron las muestras protegidas de la luz durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron lavados de 10

minutos a temperatura ambiente con Bicarbonato de amonio 100mM y después de adicionó 200 μ l de acetonitrilo 100% por 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron lavados nuevamente con Bicarbonato de amonio y se agregó acetonitrilo 2 veces más. Se removió el acetonitrilo y se secaron las muestras en un *SpeedVac* por 10 minutos. Posteriormente se le agregaron 50 μ l de Tripsina (20 ng/ μ l) y se incubaron las muestras a 4°C por 40 minutos. Después se eliminó el sobrenadante, se adicionó 50 μ l de Bicarbonato de amonio 50mM y se dejó incubando a 37°C toda la noche. Pasado este tiempo de incubación se agregó 40 μ l de ácido fórmico 5%, se dejó incubando 10 minutos a temperatura ambiente y se recuperó e sobrenadante en un tubo nuevo. Se adicionaron 40 μ l de la solución de ácido fórmico al 5%, acetonitrilo al 50% y se incubó la muestra 10 minutos a temperatura ambiente, recuperando el sobrenadante en el mismo tubo y se repitió este último paso. Posteriormente los tubos se metieron al *SpeedVac* por 4 horas, hasta que se dejó un volumen de 20 μ l. Las muestras se desalaron utilizando las puntas Millipore ZipTip® (#cat ZTC18S096)

Los péptidos obtenidos se procesaron por espectrometría de masas en tándem, utilizando el método de ionización ESI (ionización por electrospray) y un analizador de sectores de cuadrupolo (Q). Se realizó el análisis de las secuencias obtenidas utilizando el software on-line MASCOT, así como la base de datos on-line de UniProt, NCBI-Blast y TritypDB.

7. Resultados

Para identificar a las proteínas que pudieran unirse a TcVps26-*like* durante el proceso de invasión del parásito a la célula blanco, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación. Para ello se utilizó un anticuerpo anti-Hemaglutinina (α -HA) y extractos totales de proteínas de parásitos *Knock-in* (KI) de HA-TcVps26-*like* (Rubio-Ortiz, 2012. Tesis de Doctorado), estimulados con célula blanco por 2 horas, como se describe en Materiales y Métodos.

1) Evaluación de la expresión de la secuencia que codifica HA-TcVps26-*like* en epimastigotes transfectantes estables

Como primer paso era necesario determinar el nivel de expresión de la proteína ectópica HA-TcVp26-*like* en los parásitos KI, para lo que se realizaron ensayos de *Western blot* (WB), con extractos totales de proteínas de los parásitos transfectados con pTREX-n-HA-TcVp26-*like* y de los parásitos control MOCK (que contienen solo el vector pTREX-n), utilizando un anticuerpo α -HA como se describe en Materiales y Métodos.

Como se muestra en la **Figura 4**, el anticuerpo monoclonal contra HA reconoce una proteína de aproximadamente 35 KDa en los parásitos transfectados con pTREX-n-HA-TcVp26-*like*, el cual es el tamaño esperado de la proteína ectópica HA-TcVp26-*like*. Este reconocimiento no se observa en los parásitos control MOCK, mostrando la especificidad del ensayo.

Estos resultados demuestran la expresión de la secuencia que codifica HA-TcVps26-*like* ectópica en los parásitos KI.

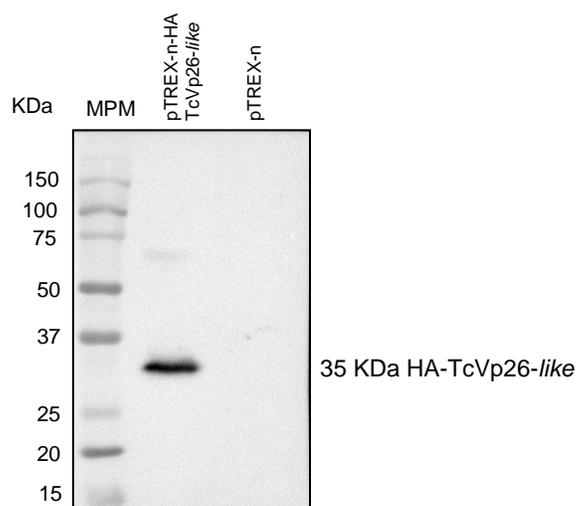


Figura 4. Análisis de la expresión de la proteína ectópica HA-TcVp26-like. Se realizaron ensayos de *Western blot* de los extracto total de proteínas de los parásitos transfectantes estables (pTREX-n-HA-TcVp26-like, pTREX-n) utilizando el anticuerpo anti-HA, para evaluar la fusión de la proteína Vps26-like con la bandera de HA.

2) Evaluación de la localización de la proteína HA-TcVps26-like en el parásito

Una vez que se comprobó la expresión de HA-TcVps26-like ectópica, procedimos a evaluar su localización celular en ensayos de inmunofluorescencia indirecta en parásitos KI de HA-TcVps26-like y parásitos control MOCK, utilizando un anticuerpo α -HA, como se describe en Materiales y Métodos.

En la **Figura 5** se muestra que los epimastigotes KI de HA-TcVps26-like, tienen una distribución de la proteína ectópica en todo el cuerpo y flagelo del parásito. Además, la presencia de la proteína HA-TcVps26-like ectópica muestra un patrón punteado tipo vesicular, que se requeriría de experimentos futuros de co-localización con marcadores vesiculares para discernir si efectivamente se encuentra en vesículas y definir de qué tipo podrían ser éstas. Como era esperado los parásitos MOCK no mostraron ningún tipo de tinción, demostrando la especificidad de la tinción.

Además de la localización, estos resultados también confirmaron la expresión de la secuencia que codifica a la proteína ectópica HA-TcVps26-*like* en los parásitos KI, evaluada anteriormente por WB.

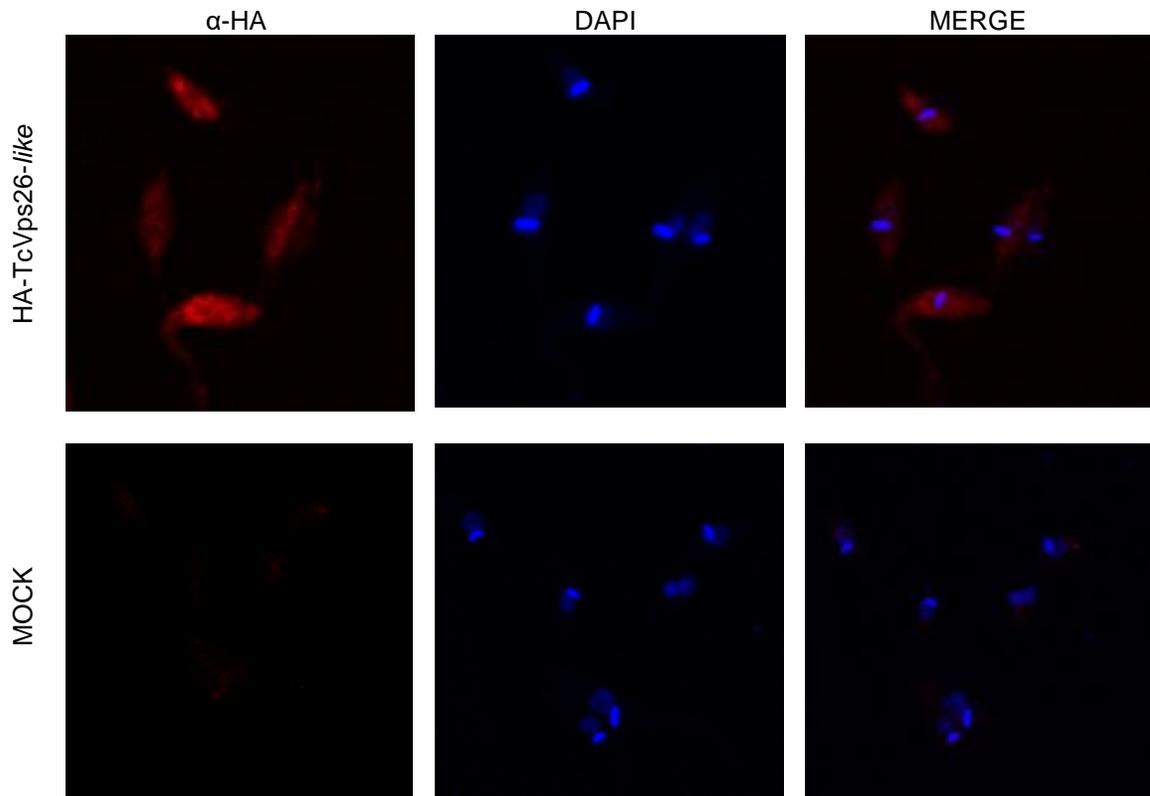


Figura 5. Localización de la proteína HA-TcVps26-*like*. Imágenes de las inmunofluorescencias de epimastigotes KI de HA-TcVps26-*like* y MOCK, utilizando el anticuerpo primario anti-HA y el secundario Alexa fluor 546, en donde se puede observar con rojo la bandera de HA y en azul la contra-tinción del núcleo con DAPI.

3) Obtención y análisis del interactoma de HA-TcVp26-*like*, obtenido por ensayos de co-inmunoprecipitación.

Para determinar las proteínas asociadas a HA-TcVp26-*like* durante el proceso de invasión del parásito, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación como se describe en Materiales y Métodos. Esto no sólo nos permitirá determinar las proteínas a las que se una HA-TcVp26-*like* y su posible función en caso de que tengan esta anotación en los bancos de datos; sino también, dar pautas para identificar la posible función de HA-TcVp26-*like*. Además, ya que este ensayo es

realizado ante el estímulo de infección, estos experimentos nos proporcionarán información de la posible función de HA-TcVp26-*like* y de las proteínas asociadas a esta proteína en particular en el proceso de infección del parásito.

3.1) Establecimiento de las condiciones óptimas de co-inmunoprecipitación.

Como primer paso, era necesario verificar que el ensayo de co-inmunoprecipitación se estaba realizando de manera eficiente. Por lo tanto realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación y el resultado del mismo se analizó por WB.

Como se muestra en la **Figura 6**, con el extracto total de proteínas de los parásitos KI de HA-TcVps26-*like* se obtuvo una banda de peso molecular de 35 KDa, el cual es el tamaño esperado de HA-TcVps26-*like*. Esta banda también se observa en los lavados (fracción no unida) de los extractos totales de proteínas que se pusieron a interactuar con los controles negativos de perlas solas y un anticuerpo no relacionada (anticuerpo α -GST), indicando como era esperado que no hubo unión inespecífica de las proteínas del extracto total del parásito a las perlas o a un anticuerpo no relacionado. También se puede observar que cuando se analizaron los productos de la co-inmunoprecipitación con los extractos totales de proteínas de los parásitos MOCK (transfectados sólo con el esqueleto del vector pTREX-n), no se observa ninguna banda indicativa de algún reconocimiento inespecífico con el anticuerpo α -HA.

Estos resultados en conjunto indicaron que teníamos las condiciones óptimas de co-inmunoprecipitación y que podíamos proceder a realizar los ensayos finales para la identificación de las proteínas unidas a HA-TcVps26-*like*, por espectrometría de masas en tándem.

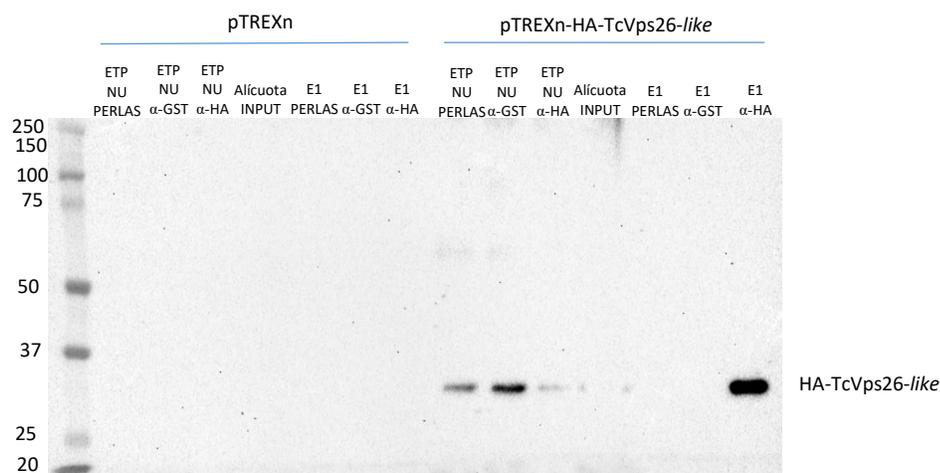


Figura 6. Análisis de los productos de co-inmunoprecipitación por ensayos de *Western blot*. ETP (extracto total de proteínas), NU (No unido), E1 (Eluido 1). Los productos de la co-inmunoprecipitación se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% y se realizaron ensayos de WB utilizando el anticuerpo anti-HA.

3.2) Evaluación del perfil de interacción de la proteína HA-TcVps26-like

Para identificar el perfil de interacción de la proteína HA-TcVp26-like, los productos de elución obtenidos durante los ensayo de co-inmunoprecipitación finales, se corrieron en geles SDS-PAGE al 12% y posteriormente se realizó la tinción con plata para visualizar el patrón de bandeo.

En la **Figura 7** se muestra un ejemplo representativo del perfil de bandeo de las proteínas co-inmunoprecipitadas tanto de los parásitos HA-TcVps26-like (panel c) como de los parásitos MOCK (panel b). Al comparar ambos paneles se observan bandas que se comparten en ambas muestras, una de las cuales tiene un peso molecular de aproximadamente de 50 KDa, que pudiera corresponder a la cadena pesada del anticuerpo, lo que es común observar en este tipo de ensayos. Aun cuando el kit utilizado para estos ensayos está diseñado para la unión covalente del anticuerpo a las perlas y evitar su presencia como contaminante no deseado en el producto de co-inmunoprecipitación, hemos observado que una pequeña parte del anticuerpo aún se desprende y se viene junto con el eluido. Sin embargo, es de hacer notar que la cantidad de este contaminante es mucho menor en nuestras

condiciones que en las condiciones estándar en donde no se lleva a cabo la unión covalente del anticuerpo a las perlas, lo que optimiza los pasos posteriores de espectrometría de masas y detección e identificación de los péptidos obtenidos, en nuestras condiciones de ensayo.

Eliminando las bandas compartidas o que se encuentran en notoria menor cantidad en el control MOCK (panel b), se detectaron 11 bandas de diferentes pesos moleculares en un rango de 18 a 110 KDa, en el producto de co-inmunoprecipitación de los parásitos KI de HA-TcVps26-*like* (panel c). En nuestra muestra en estudio, también se observó la presencia de una banda muy enriquecida de un peso molecular de 35 KDa, que de acuerdo a su peso molecular y al reconocimiento con el anticuerpo α -HA observado en los ensayos de WB, corresponde a la proteína HA-TcVps26-*like* ectópica de los parásitos KI. El análisis de resultados mostró que el perfil de interacción de HA-TcVps26-*like*, comparando con el marcador de peso molecular (panel a), está constituido por proteínas de 18, 23, 25, 29, 35, 38, 45, 51, 75, 100 y 110 KDa (panel d).

Estos resultados en conjunto nos indican que la proteína HA-TcVps26-*like* interacciona con al menos 11 proteínas de diferente peso molecular.

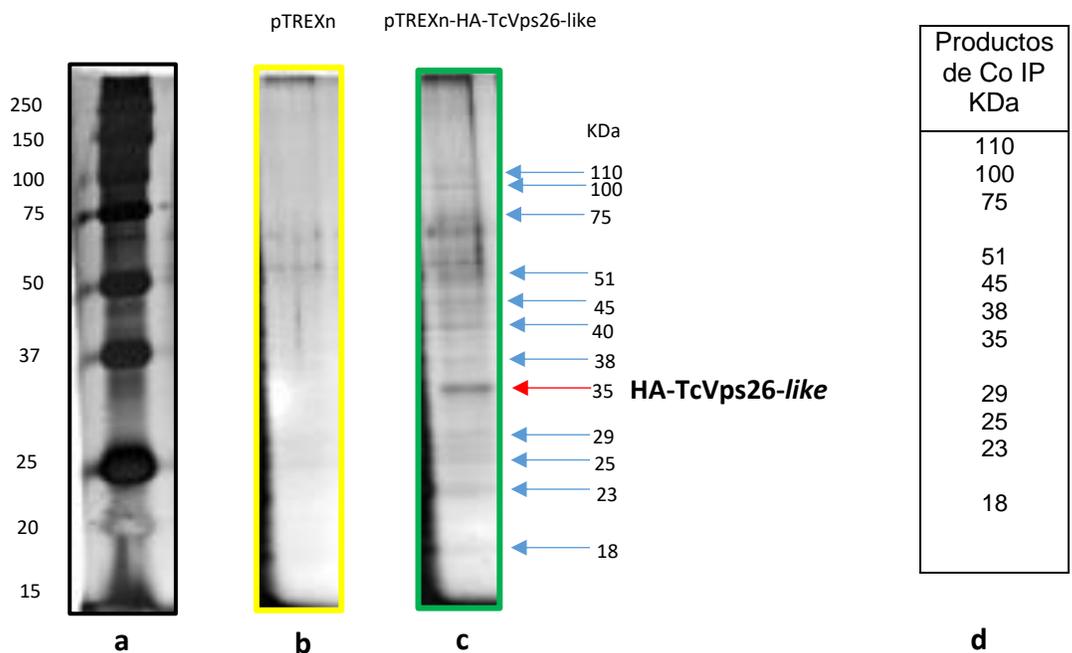


Figura 7. Perfil de interacción de la proteína HA-TcVp26-like. (a) marcador de peso molecular. (b) Producto de co-inmunoprecipitación de los parásitos MOCK. (c) Producto de co-inmunoprecipitación de los parásitos transfectados estables con la construcción pTREX-n-HA-TcVp26-like

3.3) Análisis por espectrometría de masas en tándem de los productos de co-inmunoprecipitación

Posteriormente, para determinar la identidad de las proteínas que conforman el perfil de interacción de HA-TcVp26-like, algunos de los fragmentos del gen conteniendo las bandas teñidas se procesaron por espectrometría de masas en tándem utilizando el método de ionización ESI (ionización por electrospray) y un analizador de sectores de cuadrupolo (Q). Además, las secuencias se identificaron con el software on-line MASCOT, así como con la base de datos on-line de UniProt, NCBI-Blast y TritypDB, como se describe en Materiales y Métodos.

Como se observa en la **Tabla 2**, se obtuvo un total de 6 péptidos que corresponden a 4 proteínas identificadas como: una proteína hipotética que correspondía a nuestra proteína en estudio HA-TcVps26-like, las proteínas de choque térmico 85 y 83, y la proteína Triparedoxin peroxidasa. La presencia de HA-TcVp26-like era esperada, ya que ésta tendría que estar presente en el producto de co-inmunoprecipitación. De acuerdo a las funciones que tienen en otros sistemas eucarióticos, las proteínas de choque térmico 85 y 83 y la proteína Triparedoxin peroxidasa, pudieran estar relacionadas con el tráfico de proteínas hacia la membrana plasmática y con la defensa del parásito en el proceso de oxidación-

reducción que se produce durante las diferentes etapas del proceso de infección de *T. cruzi*. Cabe mencionar que las secuencias anteriores no se encontraron en la muestra obtenida de los parásitos control MOCK.

También se detectaron péptidos correspondientes a otras proteínas de humano como queratina en las muestras y controles (datos no mostrados). Este resultado indicó que las todas las muestras estaban contaminadas con proteínas de humano. De acuerdo a la experiencia del laboratorio de servicios generales en donde se llevaron a cabo los análisis de espectrometría de masas, este inconveniente suele presentarse cuando no se tienen soluciones de uso exclusivo para espectrometría de masas para la preparación de los geles de poliacrilamida y/o para su tinción, las cuales se necesitan manejar con cuidados especiales. Nosotros no contábamos con soluciones bajo estas condiciones, por lo que pensamos que este pudo haber sido el problema de contaminación de nuestras muestras.

La obtención de un bajo número de péptidos en la secuenciación, podría ser también resultado de la contaminación con las proteínas de humano. Esto debido a que al estar en mayor cantidad las proteínas contaminantes, se reducen los niveles de detección de las proteínas problema al estar éstas últimas en mucha menor cantidad. Por lo que no sólo se obtienen pocos péptidos, sino también no se detectan todas las proteínas problema presentes en las muestras.

Actualmente ya se realizaron tres experimentos independientes de co-inmunoprecipitación, cuyos perfiles de interacción mostraron los mismos resultados que se observan en la figura 7. Estas muestras ya fueron procesadas y analizadas por espectrometría de masas, considerando la experiencia anterior. Por lo tanto se prepararon los geles y se tiñeron con soluciones nuevas y con los cuidados pertinentes, y una vez que recibamos los resultados estos serán analizados para obtener el interactoma completo de HA-TcVps26-*like*.

Tabla 2. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Numero de acceso	Proteína identificada (Tritypdb)	Función	Referencias
TcCLB.507027.40 Tc00.1047053506941.210	Proteína hipotética	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína en estudio (HA-TcVps26-like) 	
Tc00.1047053507713.30 Tc00.1047053509105.140	Proteína de choque térmico 85	<ul style="list-style-type: none"> • Plegamiento de proteínas, identificada en fracciones de vacuola contráctil • Proteína identificada en la vacuola contráctil • La vacuola contráctil transporta transalidasas a la membrana plasmática de <i>T. cruzi</i> 	(Ulrich, 2011) (Niyogi, 2014)
Tc00.1047053509643.139	Proteína de choque térmico 83	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta estrés, plegamiento de proteínas • Proteína chaperona 	(Nadeau, 1992)
Tc00.1047053504839.44	Triparedoxin peroxidasa	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso de oxidación-reducción, actividad antioxidante • Parásitos que sobre-expresan Triparedoxin peroxidasa muestran mayor infectividad 	(Piñeyro, et al., 2008)

8. Discusión

Durante el proceso de invasión de *T. cruzi*, el cual es fundamental para su supervivencia en el hospedero vertebrado, participan diversas moléculas tanto del parásito como de la célula hospedera, las cuales son poco conocidas hasta el momento, al igual que los mecanismos moleculares involucrados.

En trabajos previos nuestro grupo de investigación encontró una molécula denominada TcVps26-like que se expresa diferencialmente en una biblioteca de substracción entre la forma de tripomastigote y una forma intermedia en la diferenciación de tripomastigote a amastigote. El análisis funcional de parásitos *Knock-down* (KD) de TcVps26-like indicó que esta proteína participa en el proceso de invasión a la célula blanco. También estudios *in silico* de la secuencia de TcVps26-like, determinaron que esta molécula está anotada en la base de datos de tripanosomátidos (tritypdb), como una proteína hipotética que contiene 2 dominios, uno que corresponde a la superfamilia de las N-arrestinas (SSF81296), y un dominio PFAM (PF03643) característico de la proteína de clasificación vacuolar 26 (Vps26). Este análisis también indicó que la proteína Vps26 de células eucariotas, que se

sabe participa en procesos de tráfico en el complejo retrómero, se parece mucho estructuralmente a las proteínas de la familia de las arrestinas, a pesar de la ausencia de homología en su secuencia (Shi, Rojas et al. 2006). A la fecha, no se sabe si las similitudes estructurales entre Vps26 y las proteínas de la familia de las arrestinas, tienen un parentesco funcional más allá de la participación de Vps26 en el complejo retrómero (Aubry, Guetta et al. 2009).

Las arrestinas son una pequeña familia de proteínas de cuatro miembros en mamíferos, divididas en: dos visuales (arrestina-1 en las células de vástago y arrestina-4 en células de cono) y dos no visuales (β -arrestina 1 y β -arrestina 2, también llamada arrestina-2 y arrestina-3, respectivamente) (Kang, Tian et al. 2014). Estas proteínas tienen una asombrosa versatilidad, interactuando con diferentes subtipos de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), a numerosas proteínas de señalización no receptora como MAPK, a componentes de la maquinaria de internalización como Clatrina y AP2, y a elementos del citoesqueleto (Gurevich and Gurevich 2013).

Estudios recientes han identificado dos familias adicionales de proteínas relacionadas a arrestinas que incluyen a las α -arrestinas y a un grupo de proteínas relacionadas a Vps26 (Kang, Tian et al. 2014).

Se ha reportado que el genoma de mamíferos codifica 6 proteínas α -arrestinas entre las que se encuentran: 5 proteínas ARRDC1-5 (proteínas que contienen el dominio arrestina) y TXNIP (proteína de interacción a tiorredoxina), también conocida como VDUP (proteína de regulación de la vitamina D3). La TXNIP y todas las ARRDCs, excepto la ARRDC-5, contienen 2 sitios [L,P]PxY que son capaces de unirse a los dominios WW generalmente encontrados en las proteínas HECT de tipo ubiquitin-ligasas. Las ARRDC también sirven como plataforma para la ubiquitinación de sus proteínas cargo. Por otro lado, ARRDC3 se une a la forma fosforilada activada de la integrina β -4 y controla su endocitosis, ubiquitinación y degradación. Esta proteína también recluta la ubiquitin-ligasa E3 Nedd4, para mediar la ubiquitinación del receptor β 2-adrenérgico que es un paso esencial en su degradación. Las proteínas ARRDC1-4 y TXNIP muestran interacciones con

subunidades de la maquinaria ESCRT, como Alix y Tsg101 (conocidas como VPS23 en levaduras). Se ha reportado que las proteínas ARRDC3 y ARRDC4 se localizan en la membrana plasmática y se asocian con endosomas y lisosomas, y que la proteína ARRDC1 se localiza en la membrana plasmática o en puntos intracelulares. Mientras que TXNIP y ARRDC2 son esencialmente nucleares (Aubry and Klein 2013).

Dentro de la otra familia de proteínas vinculadas a arrestinas se encuentran las proteínas relacionadas a Vps26, que incluyen a la proteína Vps26 y a DSCR3 que se caracterizan por contener tanto el dominio de las N-arrestinas (SSF81296) como el dominio PFAM (PF03643). Vps26 forma parte del complejo cargo-selectivo del complejo retrómero junto con las subunidades Vps35 y Vps29. La función de la subunidad Vps26 ha sido la menos entendida debido a que no hay proteínas homólogas con estructura y función conocida. Se ha demostrado por mutagénesis dirigida para alterar su estructura tridimensional y por ensayos de doble híbrido, que Vps26 interactúa directamente con Vps35 a través de un *loop* que abarca los residuos 234-246 cerca del dominio C-terminal (Shi, Rojas et al. 2006). Otra proteína que se encuentra dentro de este grupo es la DSCR3 (Gen 3 de la región crítica del síndrome de Down) que es una de las proteínas que se pierde en este síndrome. DSCR3 tiene un 10-17% de identidad y un 17-27% de homología con las α/β -arrestinas, siendo las proteínas más cercanas VPS26A (14,8% de identidad) y ARRDC5 (16,9% de identidad). DSCR3 comparte la secuencia de parentesco tanto las arrestinas como con Vps26, y representa un enlace intermedio entre las dos familias, en donde la estructura modelada de DSCR3 es muy cercana a la de VPS26. También se ha sugerido que DSCR3 funciona como una plataforma de señalización en la vía de señalización de MAPK, actuando como una proteína andamio (Aubry and Klein 2013).

Las características del análisis *in silico* que presenta la proteína en estudio en este trabajo de investigación y que muestra que TcVps26-*like* tiene tanto el dominio de las arrestinas como de Vps26, sugiere que esta proteína pudiera pertenecer a la familia de las arrestinas, o formar parte del complejo retrómero. Una posible manera

de verificar estas hipótesis es la identificación de las proteínas a las cuales se une TcVps26-*like*, utilizando ensayos de co-inmunoprecipitación.

En este trabajo identificamos el interactoma parcial de TcVps26-*like*, encontrando su unión a proteínas de choque térmico 85 y 83, así como a la proteína Triparedoxin peroxidasa.

Las proteínas de choque térmico (HSP) son inducidas como parte de la respuesta a estrés y juegan un papel importante en el plegamiento, ensamblaje, localización intracelular, secreción, regulación y degradación de otras proteínas. En general, las HSP funcionan como chaperonas moleculares interactuando con proteínas dobladas incorrectamente (Ürményi, Silva et al. 2014).

En el caso HSP83, esta proteína forma parte de la familia de HSP90 en la cual se encuentran proteínas que van desde un peso molecular de 80-110 KDa. En tripanosomátidos HSP83 comparte una alta identidad con HSP90 de mamíferos y se sabe que está presente tanto en el estadio de epimastigote como de tripomastigote. A diferencia de la HSP90 de mamífero, que se une a ATP pero no tiene actividad de ATPasa, la HSP83 del parásito es una ATPasa altamente activa (Nadeau, Sullivan et al. 1992).

Por otra parte, la HSP85 del parásito presenta alto porcentaje de identidad con HSP90 de *Homo sapiens* y ha sido identificada en fracciones enriquecidas de la vacuola contráctil de epimastigotes de *T. cruzi* (Ulrich, Jimenez et al. 2011). La vacuola contráctil es un compartimento intracelular necesario para regular la osmolaridad del parásito y se ha reportado que esta vacuola junto con otras proteínas accesorias como Rab11, participan en el transporte de Transialidasas a la membrana plasmática de *T. cruzi*. Estas Transialidasas son cruciales para que el parásito se pueda acoplar a receptores de la célula hospedera e inducir vías de señalización que permiten la internalización del parásito (Niyogi, Mucci et al. 2014).

Finalmente, la tryparedoxin peroxidasa de *T. cruzi* (TcTXNPx), pertenece a la familia de las peroxiredoxinas que contienen dos cisteínas (2-Cys). Estas enzimas funcionan como antioxidantes a través de sus actividades de peroxidasa y

peroxinitrito reductasa (Piñeyro, Pizarro et al. 2005). Durante la infección a la célula hospedera los parásitos están expuestos a especies reactivas de nitrógeno y oxígeno y como parte de su sistema de defensa antioxidante expresan a la enzima tryparedoxin peroxidasa (Piñeyro, Arcari et al. 2011). Por otra parte, se ha reportado que parásitos que sobre-expresan la tryparedoxin peroxidasa tienen mayor infectividad, tanto en células fagocíticas como no fagocíticas (Gadelha, Gonçalves et al. 2013).

Los resultados anteriores muestran que la proteína en estudio *TcVps26-like* aparentemente interacciona con proteínas de la vacuola contráctil, un compartimiento que se ha reportado participa en el transporte de transialidasas indispensables para que el parásito pueda invadir. Por lo tanto, de acuerdo con las características de secuencia y estructurales de *TcVps26-like*, esta molécula pudiera estar participando como una proteína andamio involucrada en el transporte de transialidasas hacia la membrana plasmática del parásito, aunque experimentos futuros serán necesarios para demostrar esto.

9. Conclusiones

- HA-*TcVps26-like* interacciona con al menos 11 proteínas del parásito de un peso molecular de 18-110 KDa.
- La identificación preliminar del interactoma de HA-*TcVps26-like* muestra una interacción con proteínas de choque térmico 85 y 83 que se ha reportado participan en el transporte de transialidasas a la membrana del parásito; así como, con Triparedoxin peroxidasa que se ha reportado que parásitos que sobre-expresan a esta proteína aumentan su infectividad.

10. Bibliografía

Aubry, L., et al. (2009). "The arrestin fold: variations on a theme." Curr Genomics **10**(2): 133-142.

Aubry, L. and G. Klein (2013). "True Arrestins and Arrestin-Fold Proteins." Progress in Molecular Biology and Translational Science **118**: 21-56.

Burleigh, B. A. and A. M. Woolsey (2002). "Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion." Cellular Microbiology **4**(11): 701-711.

Carabarin-Lima, A., et al. (2013). "Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update." Acta Tropica **127**(2): 126-135.

Clayton, C., et al. (1995). "Protein trafficking in kinetoplastid protozoa." Microbiol Rev **59**(3): 325-344.

Clayton, J. (2010). "Chagas disease 101." Nature **465**(7301): S4-5.

Coura, J. R. (2015). "The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review." Mem Inst Oswaldo Cruz **110**(3): 277-282.

El-Sayed, N. M., et al. (2005). "The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-415.

Epting, C. L., et al. (2010). "Molecular mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi." Experimental Parasitology **126**(3): 283-291.

Florencio-Martínez, L., et al. (2010). "Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of Trypanosoma cruzi." Experimental Parasitology **126**(3): 332-336.

Gadelha, F. R., et al. (2013). "Release of the cytosolic tryparedoxin peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated Trypanosoma cruzi tissue culture-derived trypomastigotes." Experimental Parasitology **133**(3): 287-293.

Giorgi, M. E. and R. M. de Lederkremer (2011). "Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite." Carbohydr Res **346**(12): 1389-1393.

Gurevich, V. V. and E. V. Gurevich (2013). "Structural Determinants of Arrestin Functions." Progress in Molecular Biology and Translational Science **118**: 57-92.

Hernandez-Osorio, L. A., et al. (2010). "Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms." J Biomed Biotechnol **2010**: 283842.

Hierro, A., et al. (2007). "Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex." Nature **449**(7165): 1063-1067.

Hotez, P. J. (2008). "Holidays in the Sun and the Caribbean's Forgotten Burden of Neglected Tropical Diseases." PLoS Negl Trop Dis **2**(5): e239.

Kang, D. S., et al. (2014). "Role of β -arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking." Current opinion in cell biology **0**: 63-71.

Klinger, S. C., et al. (2015). "Retromer-Mediated Trafficking of Transmembrane Receptors and Transporters." Membranes **5**(3): 288-306.

Lima, F. M., et al. (2010). "The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells?" New Biotechnology **27**(6): 837-843.

Liu, J. J. (2016). "Retromer-Mediated Protein Sorting and Vesicular Trafficking." J Genet Genomics **43**(4): 165-177.

Liu, Q. and X. N. Zhou (2015). "Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries." Infect Dis Poverty **4**: 60.

Lorenzi, H. A., et al. (2003). "Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*." Gene **310**: 91-99.

Martins, N. O., et al. (2015). "Molecular Characterization of a Novel Family of Trypanosoma cruzi Surface Membrane Proteins (TcSMP) Involved in Mammalian Host Cell Invasion." PLoS Negl Trop Dis **9**(11): e0004216.

Mukadam, A. S. and M. N. Seaman (2015). "Retromer-mediated endosomal protein sorting: The role of unstructured domains." FEBS Lett **589**(19 Pt A): 2620-2626.

Nadeau, K., et al. (1992). "83-kilodalton heat shock proteins of trypanosomes are potent peptide-stimulated ATPases." Protein Science : A Publication of the Protein Society **1**(8): 970-979.

Nakayasu, E. S., et al. (2009). "GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of Trypanosoma cruzi." Mol Syst Biol **5**: 261.

Navarro, M. C., et al. (2003). "Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of Trypanosoma cruzi." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(1): 83-91.

Niyogi, S., et al. (2014). "Rab11 Regulates Trafficking of Trans-sialidase to the Plasma Membrane through the Contractile Vacuole Complex of Trypanosoma cruzi." PLoS Pathogens **10**(6): e1004224.

Oliveira, I. A., et al. (2014). "Trypanosoma cruzi Trans-sialidase: structural features and biological implications." Subcell Biochem **74**: 181-201.

Piñeyro, M. a. D., et al. (2005). "Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite Trypanosoma cruzi." Journal of Structural Biology **150**(1): 11-22.

Piñeyro, M. D., et al. (2011). "Tryparedoxin peroxidases from Trypanosoma cruzi: High efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite." Archives of Biochemistry and Biophysics **507**(2): 287-295.

Porto-Carreiro, I., et al. (2000). "Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes." Eur J Cell Biol **79**(11): 858-869.

- Rassi, A., Jr., et al. (2010). "Chagas disease." The Lancet **375**(9723): 1388-1402.
- Reddy, J. V. and M. N. Seaman (2001). "Vps26p, a component of retromer, directs the interactions of Vps35p in endosome-to-Golgi retrieval." Mol Biol Cell **12**(10): 3242-3256.
- Romano, P. S., et al. (2012). "Molecular and cellular mechanisms involved in the Trypanosoma cruzi/host cell interplay." IUBMB Life **64**(5): 387-396.
- Seaman, M. N. (2012). "The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond." J Cell Sci **125**(Pt 20): 4693-4702.
- Seaman, M. N., et al. (1997). "Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products." J Cell Biol **137**(1): 79-92.
- Shi, H., et al. (2006). "The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain." Nat Struct Mol Biol **13**(6): 540-548.
- Silva, N. L. d. C., et al. (2010). "Endocytosis in Trypanosoma cruzi."
- Soares, M. J. (1999). "The reservosome of Trypanosoma cruzi epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis." Mem Inst Oswaldo Cruz **94 Suppl 1**: 139-141.
- Teixeira, A. R. L., et al. (2011). "Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity." Clin Microbiol Rev **24**(3): 592-630.
- Tyler, K. and D. Engman (2001). "The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited." International journal for parasitology **31**(5): 472-481.
- Ulrich, P. N., et al. (2011). "Identification of Contractile Vacuole Proteins in Trypanosoma cruzi." PLoS ONE **6**(3): e18013.
- Ürményi, T. P., et al. (2014). The Heat Shock Proteins of Trypanosoma cruzi. Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma. A. L. S. Santos, M. H. Branquinha, C. M. d'Avila-Levy, L. F. Kneipp and C. L. Sodr . Dordrecht, Springer Netherlands: 119-135.

Yoshida, N. and M. Cortez (2008). "Trypanosoma cruzi: parasite and host cell signaling during the invasion process." Subcell Biochem **47**: 82-91.