

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS

DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Caracterización Biológica y Molecular de TcDSCR3-Like de
Trypanosoma cruzi.”**

T E S I S

Que presenta:

M. EN C. MARGARITA RUBIO ORTIZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de Tesis

DRA. REBECA GEORGINA MANNING CELA



Asesores:

Profesores del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN

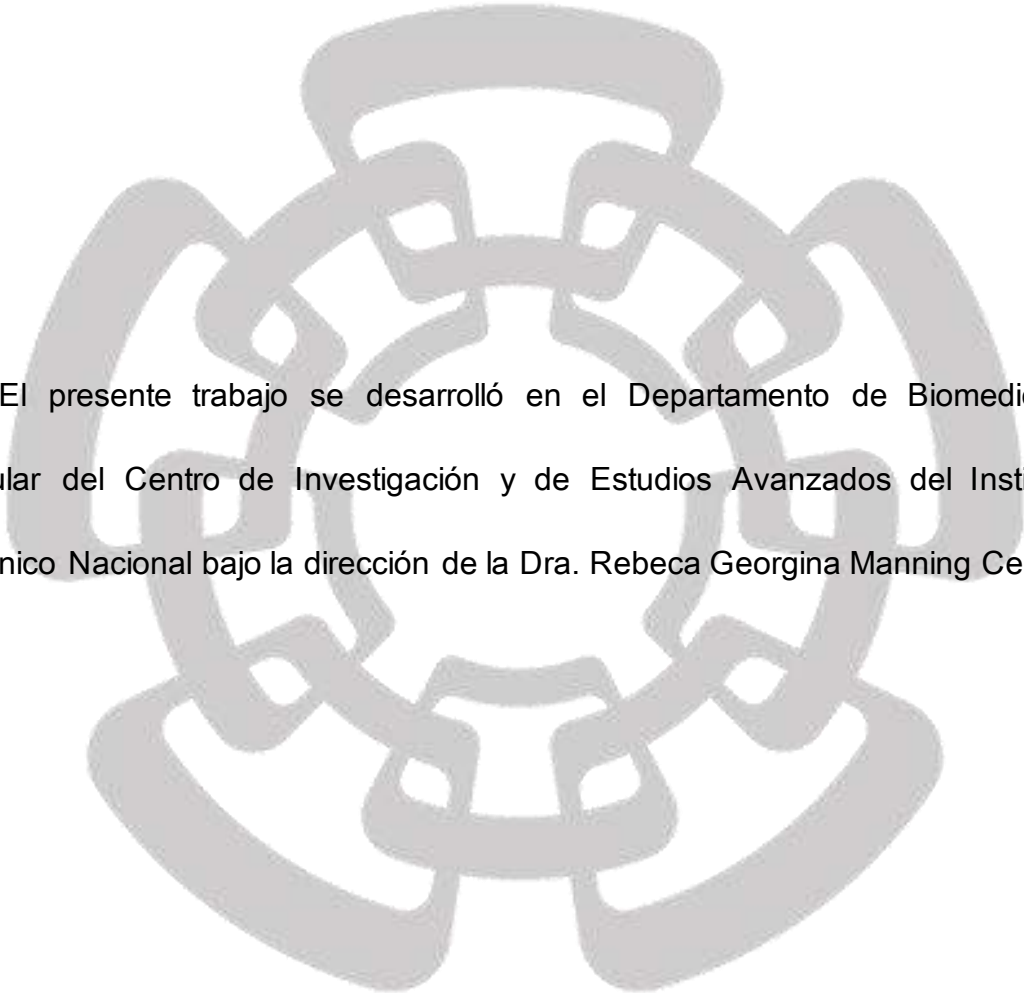
Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

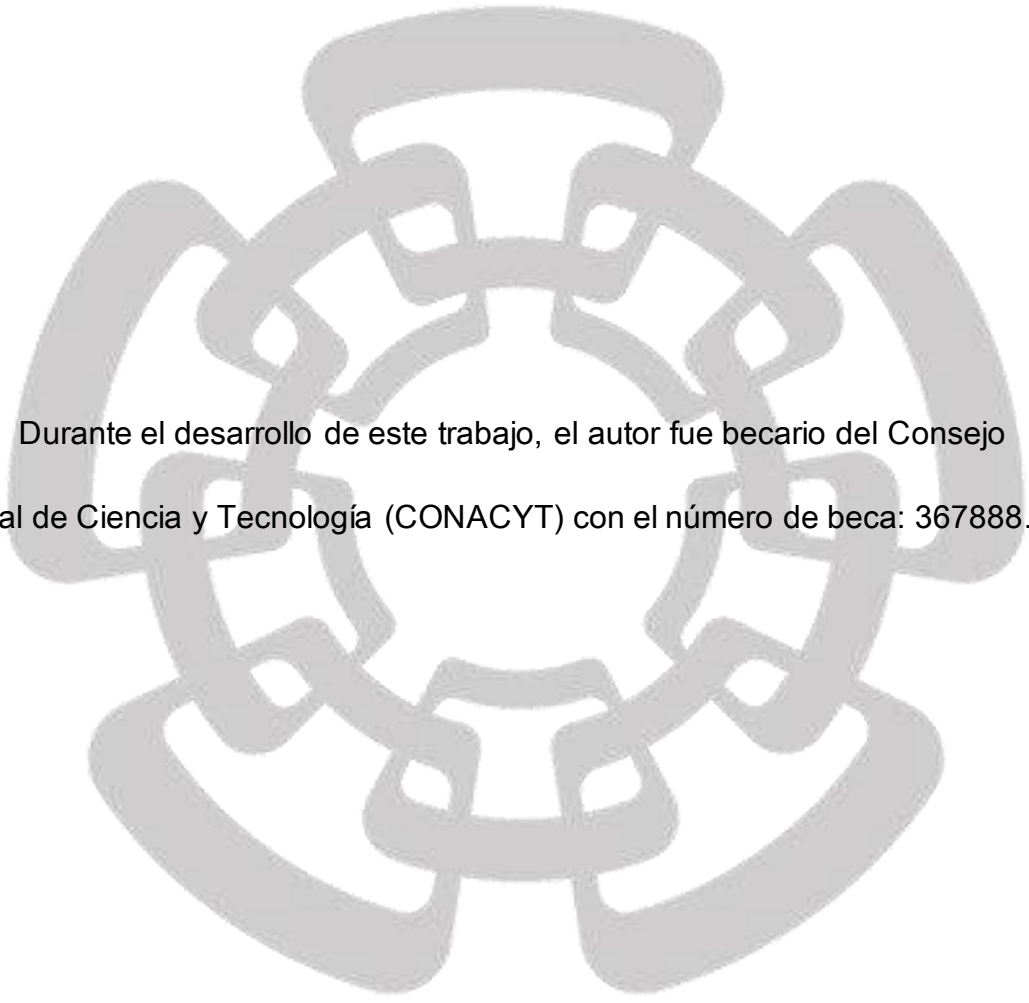
Dr. Vianney F. Ortiz Navarrete

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

Dr. Santiago Martínez Calvillo



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 Georgina Manning Cela.



Durante el desarrollo de este trabajo, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de beca: 367888.

Dedicatoria

A mi hermosa familia:

Manuel†

M^aInes

Santiago

Ana

Armando

Lucia

Mis sobrinos

A todos ellos, seres que amo, respeto y admiro con todo mi corazón.

Agradecimientos

Esta etapa de mi vida ha sido muy enriquecedora para mí, he crecido en muchos aspectos de la vida por lo que les agradezco a cada una de las personas que han sido parte de este trayecto.

Agradezco enormemente a la Dra. Rebeca por darme la oportunidad de seguir con el proyecto. Por todas las enseñanzas durante la realización de este trabajo y por el apoyo que me brinda.

A mis compañeros de laboratorio: Claudia, Don Pedrito, Teresa, Anais, Dxine, Gabriel, Alberto, Jorge. Muchas gracias por las pláticas tan amenas y las grades risas compartidas en el laboratorio. Muchas gracias a Claudia por las enseñanzas, el intercambio de ideas y por escucharme siempre en el laboratorio.

A mis asesores, Dr. Santiago, Dr. Nicolás, Dr. Miguel y Dr. Vianney por ser parte de mi comité tutorial y por las observaciones hechas al trabajo.

A José Eduardo, por estar, por ser, por los consejos, por todo, he aprendido mucho a tu lado y te agradezco que seas parte de mi vida.

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1	<i>Trypanosoma cruzi</i> es un protozoo de vida digénico y sus diferentes estadios de desarrollo	1
Figura 2	Diagrama de la historia natural de la enfermedad de Chagas	5
Figura 3	Distribución global de los casos de la enfermedad de Chagas, basados en estimados oficiales, 2006-2010	8
Figura 4	Distribución de algunas especies de Triatomíneos de importancia epidemiológica	11
Figura 5	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 6	Estructura tridimensional de las proteínas del clan de las arrestinas humanas	22
Figura 7	Estructura tridimensional de la β -Arrestina 1, características y sitios de interacción	24
Figura 8	Árbol Filogenético del clan de las Arrestinas presentes en <i>H. sapiens</i>	32
Figura 9	Representación esquemática de la participación de DSCR3 en una ruta de señalización similar a las MAPKs	33
Figura 10	El Complejo <i>retriever</i> , modelo funcional y localización endosomal. Comparación con el complejo retromer	34
Figura 11	Representación esquemática de la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 / XP_819086.1 encontrada en la biblioteca de substracción	80
Figura 12	Representación esquemática de los dominios presentes en la secuencia hipotética TcCLB.506941.210	81
Figura 13	Alineamiento de la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 y las secuencias de Vps26 de humano (Hs) isoformas A y B.	82
Figura 14	Estructura tridimensional de la secuencia aminoacídica TcCLB.506941.210	83

Figura 15	Comparación entre la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 (<i>TcDSCR3-Like</i>) y la secuencia de <i>DSCR3</i> de humano (Hs)	85
Figura 16	Árbol Filogenético de <i>DSCR3</i> entre el género <i>Trypanosoma</i> y otras especies	86
Figura 17	Evaluación de la expresión del ARNm antisentido en los parásitos transfectantes estables de pTREXn-TcDSCR3-Like-AS	88
Figura 18	Análisis de la expresión del ARNm endógeno <i>TcDSCR3-Like</i> en los parásitos transfectantes estables de TcDSCR3-Like-AS mediante PCR Tiempo real	89
Figura 19	PCR tiempo real cuantitativo de la expresión relativa de <i>TcDSCR3-Like</i> en los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> .	91
Figura 20	Evaluación del reconocimiento del anticuerpo heterólogo Vps26 a TcDSCR3-Like de <i>T. cruzi</i>	93
Figura 21	Expresión de la proteína ciclodeaminasa formiminotransferasa (58K FTCD) en epimastigotes (E) silvestres y la fragmentación de Golgi	95
Figura 22	Representación esquemática de la fusión de las secuencias nucleotídicas de <i>TcDSCR3-Like</i> con las banderas de hemaglutinina (HA, extremo 5') y la proteína verde fluorescente (GFP, extremo 3')	96
Figura 23	Obtención de la construcción pGEMT-HA-TcDSCR3-Like	97
Figura 24	Obtención de la construcción pGEMT-TcDSCR3-Like	98
Figura 25	Obtención de la construcción pTREXn-HA-TcDSCR3-Like	99
Figura 26	Obtención de la construcción pTREXn-TcDSCR3-Like-GFP	100
Figura 27	Expresión de las proteínas ectópicas HA-TcDSCR3-Like y TcDSCR3-Like-GFP en el estadio de epimastigotes	102
Figura 28	Localización subcelular de TcDSCR3-Like en el estadio de epimastigote	104

Figura 29	Localización de TcDSCR3-Like-GFP después de la interacción con la célula blanco (estímulo de invasión)	106
Figura 30	HA-TcDSCR3-Like co-localiza con endosomas tempranos en el estadio de epimastigote	107
Figura 31	La expresión ectópica de HA-TcDSCR3-Like afecta la actividad endocítica del estadio de epimastigote	108
Figura 32	Análisis funcional de los parásitos HA-TcDSCR3-Like	111
Figura 33	Patrón de bandeado diferencial y reconocimiento de la bandera de HA en los extractos inmunoprecipitados	113
Figura 34	Clasificación de las proteínas analizadas <i>in silico</i> entre proteínas con función conocida o como proteína hipotética	114
Figura 35	Análisis de las proteínas obtenidas en el ensayo de co-inmunoprecipitación mediante <i>Gene Ontology</i> (GO)	116
Tabla 1	Cepas bacterianas utilizadas	41
Tabla 2	Medios de cultivo utilizados	41
Tabla 3	Anticuerpos utilizados	44
Tabla 4	Oligonucleótidos sintéticos utilizados	45
Anexo 1	Secuencias de DSCR3 en las diferentes especies utilizadas para generar el árbol filogenético	135
Anexo 2	Alineamiento de TcDSCR3-Like con Vps26 de otras especies	139
Anexo 3	Estructuras predichas para TcDSCR3-Like utilizando como templatado proteínas que pertenecen al clan de las arrestinas	140
Anexo 4	Alineamiento entre la secuencia teórica de HA-TcDSCR3-Like y el resultado de secuenciación	141
Anexo 5	Alineamiento de la secuencia teórica pTRENtTcDSCR3-Like-GFP y el resultado de secuenciación	142

Índice de Abreviaturas

AcNa	Acetato de sodio
Adc	Proteínas que contienen dominios de Arrestina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-cd	ADN de cadena doble
ADN-cs	ADN de cadena simple
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AmR	Resistencia a ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARRDCs	Proteínas que contienen dominios de Arrestinas
ARTs	Adaptadores de tráfico relacionado con las Arrestinas
AS	Antisentido
BCA	Ácido bicinconínico
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina de suero bovino
C ₆ H ₂ O ₆	Glucosa
Ca ²⁺	Calcio
CH ₃ CO ₂ K	Acetato de potasio
CO ₂	Dióxido de carbono
CO-IP	Co-inmunoprecipitación
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
dNTPs	Deoxinucleótidos
DSCR3	Gen 3 de la Región Crítica del Síndrome de Down
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
ETP	Extracto total de proteínas
FI-3	Forma intermedia de 3 horas

GFP	Proteína verde fluorescente
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GST	Glutation S-transferasa
HA	Hemaglutinina
HMM	Modelo oculto de Markov
HRP	Peroxidasa de rábano
HSA21	Trisomía parcial o completa del cromosoma 21
IFI	Inmunofluorescencia
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
K₂HPO₄	Fosfato de potasio dibásico
KCl	Cloruro de potasio
KD	<i>Knock down</i>
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico
LacZ	B-galactosidasa
LB	Luria bertani
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LIT	Infusión de hígado-Triptosa
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MCS	Sitio múltiple de clonación
mGenTHREADER	Reconocimiento de estructura genómica
MgSO₄	Sulfato de magnesio
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio difásico
NaCl	Cloruro de sodio
NaCNBH₃	Ciano-borohidrido de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Neo	Neomicina
NFX	Nifurtimox
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Tampón de fosfatos salino
PFA	Paraformaldehído

RIPA	Radioinmunoprecipitación
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal de bovino
SNX	Nexina
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris-borato-edta
TcPI-PLC	Fosfolipasa C modificada con lípidos
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TXNIP	Proteína de interacción con tiorredoxina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Vps26	Proteína de clasificación vacuolar 26
WB	Western Blot
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Resumen

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, una enfermedad altamente mortal, incapacitante e incurable hasta el momento. Es un protozoo hemoflagelado que presenta cuatro estadios de desarrollo que se alternan entre un hospedero invertebrado y uno vertebrado, en donde desarrolla un complejo ciclo de vida digénico que lo expone a diversos cambios microambientales que inducen su diferenciación. Para que se establezca la patogenia de la enfermedad, se requiere que el parásito lleve a cabo un ciclo intracelular infectivo, en el que un paso determinante es la amastigogénesis que consiste en la transformación del tripomastigote en amastigote. El análisis de expresión diferencial entre una forma intermedia (FI, obtenida durante la amastigogénesis) y tripomastigotes, identificó a la secuencia TcCLB.506941.210 anotada como hipotética. El análisis de parásitos que expresan establemente un ARN antisentido para el transcrito de TcCLB.506941.210, indicó su participación en la diferenciación extracelular e invasión de *T. cruzi*. En este trabajo continuamos con la caracterización de TcCLB.506941.210, cuyo análisis *in silico* identificó un dominio de la superfamilia de las N-Arrestinas (cl19290) que contiene dos dominios sobrepuestos: PF03643 (Vps26) y SUPERFAMILY (SSF81296) que es un dominio con una estructura tipo sándwich de hojas betas similar al de las inmunoglobulinas que semeja al dominio PF00339, y que en conjunto corresponden a las proteínas DSCR3. Además, se encontró un 30.76% de identidad con la secuencia de HsDSCR3 y similitud en sus

estructuras secundarias y modelos tridimensionales, sugiriendo que TcCLB.506941.210 pudiera corresponder a TcDSCR3-Like de *T. cruzi*. Demostramos que los parásitos *Knock Down* (KD) de *TcDSCR3-Like* mostraron una reducción del 94.05 % en el nivel de su transcrito, y que su nivel de transcrito entre estadios es 5.66, 3 y 1.77 veces mayor en la forma intermedia que en epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes, respectivamente. La expresión ectópica de las quimeras HA-TcDSCR3-Like y TcDSCR3-Like-GFP, determinó su localización en el citoplasma del parásito, concentrándose en estructuras tipo vesículas muy cercanas al cinetoplasto y núcleo, la cual se intensifica ante un estímulo de invasión y una colocalización con los endosomas del parásito. Además HA-TcDSCR3-Like mostró tener un papel importante en el proceso de endocitosis de transferrina. Finalmente, el análisis del interactoma de HA-TcDSCR3-Like identificó proteínas asociadas a procesos relacionados al metabolismo, estructura y transporte del parásito. Estos resultados en conjunto apoyan que la secuencia en estudio corresponde a TcDSCR3 de *T. cruzi* teniendo un papel importante en la diferenciación e invasión del parásito posiblemente participando a través del tráfico de proteínas de *T. cruzi*.

Abstract

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, a highly deadly, incapacitating and incurable illness so far. It is a hemoflagellated protozoan that has four developmental stages that alternate between an invertebrate and vertebrate host, where develops a complex digenetic life cycle that exposes it to diverse microenvironment changes that induce its differentiation. For the establishment of disease pathogenesis is required that the parasite develops an intracellular cycle of infection, in which a determining step is the amastigogenesis that consists of the transformation from trypomastigote into amastigote. The analysis of differential expression between an intermediate form obtained during the amastigogenesis and trypomastigotes identified the TcCLB.506941.210 sequence, annotated as hypothetical. The analysis of parasites that stably express an antisense RNA against the TcCLB.506941.210 transcript indicated its participation in the extracellular differentiation and invasion processes of *T. cruzi*. In this work we continue with the characterization of TcCLB.506941.210, whose *in silico* analysis identified the presence of a domain of the N-Arrestin superfamily (cl19290) that contains two overlapping domains: PF03643 (Vps26) and SUPERFAMILY (SSF81296) that is a domain with a Ig-like beta sandwich fold that resembles the PF00339 domain that corresponds to DSCR3 proteins. Besides, 30.76 % identity was found with the sequence of HsDCSR3 and a similarity in their secondary structures and three-dimensional models, suggesting that TcCLB.506941.210 could

correspond to TcDSCR3-Like of *T. cruzi*. We demonstrated that Knock Down (KD) parasites of TcDCSR3-Like showed a 94.05 % reduction in its transcript level and that their level of transcription between developmental stages was 5.66, 3 and 1.77 timer higher in the intermediate form with respect to epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes, respectively. The ectopic expression of HA-TcDSCR3-Like and TcDSCR3-Like-GFP chimeras, determined its localization in the parasite cytoplasm mainly in vesicles-like structures close to the kinetoplast and nucleus that increase in number and intensity under the invasion stimulus, and that co-localize with the parasite endosomes. In addition HA-TcDSCR3-Like showed an important role in the endocytosis of transferrin. Finally, the HA-TcDCSR3-Like interactome identified proteins that are associated with processes related to metabolism, structure and transport of the parasite. All these results together support that the sequence under study correspond to TcDSCR3 of *T. cruzi* that has an important role in the differentiation and invasion processes of the parasite, possibly participating through the proteins trafficking of *T. cruzi*.

Índice General

Índice de Figuras y Tablas.	I
Índice de Abreviaturas.	IV
Resumen.	VII
I. Introducción.	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2 Enfermedad de Chagas.	2
1.2.1 Tratamiento de la enfermedad de Chagas.	5
1.2.2 Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.	7
1.3 Mecanismos de Transmisión de <i>T. cruzi</i>	9
1.4 Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	12
1.5 Proceso de diferenciación de <i>T. cruzi</i>	14
1.6 Tráfico de proteínas en cinetoplastidos.	18
1.7 Clan de las Arrestinas.	21
1.7.1 Arrestinas.	22
1.7.2 Proteínas que contienen dominios de Arrestina (ARRDCs).	24
1.7.3 Adaptadores de tráfico relacionadas con las Arrestinas (ARTs).	26
1.7.4 Proteína de clasificación vacuolar 26 (Vps26).	27
1.7.5 Gen 3 de la Región Crítica del Síndrome de Down (DSCR3).	30
1.8 Antecedentes directos.	35
II. Planteamiento del problema.	37
III. Justificación.	38
IV. Hipótesis.	38
V. Objetivo General.	39
VI. Materiales y Métodos.	40
VII. Resultados.	80
VIII. Discusión.	117
IX. Conclusión.	124
X. Perspectivas.	125
XI. Bibliografía.	126

I. Introducción

1.1 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozoo parásito hemoflagelado, intracelular obligado el cual se caracteriza por presentar una única mitocondria que contiene múltiples copias de ADN circular concatenadas (Cinetoplasto) y un flagelo. *T. cruzi* tiene cuatro etapas de desarrollo: el epimastigote, amastigote y tripomastigotes metacíclico y sanguíneo los cuales se alternan entre un hospedero vertebrado y uno invertebrado (Figura 1) (Levine, Corliss et al. 1980, Navarro, De Lima et al. 2003, Andersson 2011, Sales Junior, Molina et al. 2017)

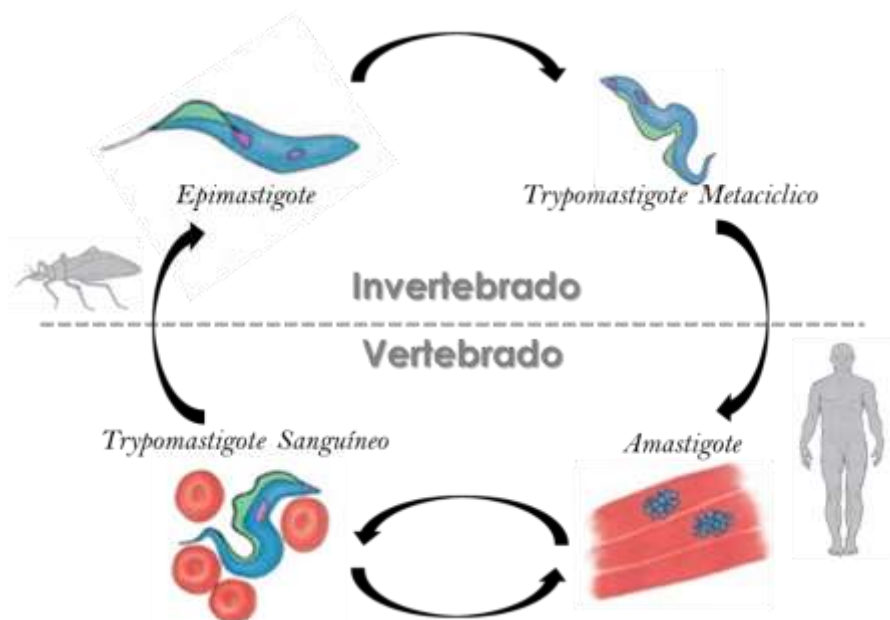


Figura 1. *Trypanosoma cruzi* es un protozoo de vida digénico (que requiere de un hospedero invertebrado y otro vertebrado) que presentan un ciclo vital y sus diferentes estadios de desarrollo. Modificado de (Atwood, Weatherly et al. 2005).

Fue descubierto en 1909 por el médico e investigador brasileño Carlos Chagas, al examinar los intestinos del insecto vector *Triatoma infestans* comúnmente conocido ahora con el nombre de vinchuca o chinche hocicona; también describió el ciclo de vida del parásito, vías de transmisión, sus reservorios y la enfermedad de Chagas en el hombre. Taxonómicamente *T. cruzi* pertenece al phylum Sarcomastigophora, clase Mastigophora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum* (Levine, Corliss et al. 1980, Maslov and Simpson 1995, Navarro, De Lima et al. 2003, Andersson 2011). Este parásito es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, una enfermedad potencialmente mortal, altamente incapacitante e incurable hasta el momento (OMS 2017).

1.2 Enfermedad de Chagas

También denominada Tripanosomiasis Americana, es una zoonosis reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las 13 enfermedades tropicales desatendidas, a pesar de ser una de las enfermedades infecciosas más letales. Su distribución se extiende a través del norte, centro y sur de América, distribuyéndose de manera endémica desde el norte de México hasta el sur de Argentina y Chile afectando un total de 21 países. Sin embargo, en las últimas décadas se ha detectado en los Estados Unidos, Canadá, muchos países europeos y algunos países del Pacífico occidental. Esto debido principalmente a la

movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo (Schmunis 2007, Rassi, Rassi et al. 2010, Teixeira, Hecht et al. 2011). Presente desde la antigüedad, hoy en día continua siendo un problema social y económico relevante; ya que causa efectos devastadores en poblaciones de áreas rurales de América Latina, siendo la cardiopatía chagásica la que típicamente produce la muerte de personas entre 30 y 50 años de edad en países endémicos. Hasta el día de hoy es considerada incurable con altas tasas de mortalidad que se traducen a cientos o miles de muertes por año, siendo el principal problema la determinación de la patogenia (Rassi, Rassi et al. 2010, Teixeira, Hecht et al. 2011). La existencia de la enfermedad de Chagas en los humanos es puramente accidental, en la medida en que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales debido a la urbanización (1940s) y provocó desequilibrios ecológicos, forzando a los triatomíneos infectados a ocupar viviendas humanas estableciéndose de esta manera como un problema médico y social. De esta manera se llevó a cabo el proceso de domiciliación, contribuyendo el hombre de esta manera en la cadena epidemiológica (Coura and Vinas 2010, Rassi, Rassi et al. 2010).

La enfermedad de Chagas ocurre en dos fases: aguda y crónica que se subdivide una etapa asintomática y otra sintomática. La fase aguda, tiene una duración aproximada de 2 meses después de la infección y puede ocurrir a cualquier edad. Durante esta fase un gran número de parásitos circulan en la sangre y disminuyen substancialmente a partir de los 90 días. En la mayoría de los casos los

síntomas son ausentes o leves e inespecíficos. En menos del 50% de las personas picadas por el insecto triatomino, los primeros signos visibles característicos pueden ser una inflamación en el sitio de inoculación (Chagoma o Chancro de inoculación) o un edema palpebral unilateral (Signo de Romaña: cuando la conjuntiva es la puerta de entrada). Adicionalmente, se puede presentar fiebre, dolor de cabeza, inflamación de los ganglios linfáticos, hepatoesplenomegalia, palidez, dolor muscular, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o de pecho. La fase aguda severa se presenta en menos del 1-5% de los pacientes, los cuales pueden presentar miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis (Riesgo de mortalidad 0.2-0.5%). La transmisión oral causa una enfermedad más severa y con mayor mortalidad que la transmitida por vectores. Esta fase por lo general se resuelve espontáneamente, permaneciendo los individuos infectados crónicamente si no reciben tratamiento. De esta forma se inicia una etapa denominada fase indeterminada o asintomática, que se caracteriza por haber una seropositividad para *T. cruzi*, así como la ausencia de signos y síntomas clínicos de afectación cardíaca y digestiva. Después de 10-30 años los individuos infectados pueden desarrollar una fase crónica sintomática, en que los parásitos permanecen principalmente en los músculos cardíacos y digestivos, reportándose hasta un 30% de pacientes que desarrollan cardiopatía Chagásica crónica y hasta el 10% que padecen alteraciones digestivas (generalmente agrandamiento del esófago o colon), neurológicas o mixtas. Lo anterior puede conducir a la muerte súbita debido

a arritmias cardíacas o insuficiencia cardíaca progresiva causada por la destrucción del músculo cardíaco y el sistema nervioso (Figura 2) (OMS 2017).

Hasta hace poco la enfermedad de Chagas era percibida como una enfermedad parasitaria en la fase aguda (miocitólisis inducido por el parásito e inflamación) y autoinmune en la fase crónica. Sin embargo, ahora es reconocida como una interacción multifactorial, persistente y variable entre el patógeno y el hospedero (Lescure, Le Loup et al. 2010).

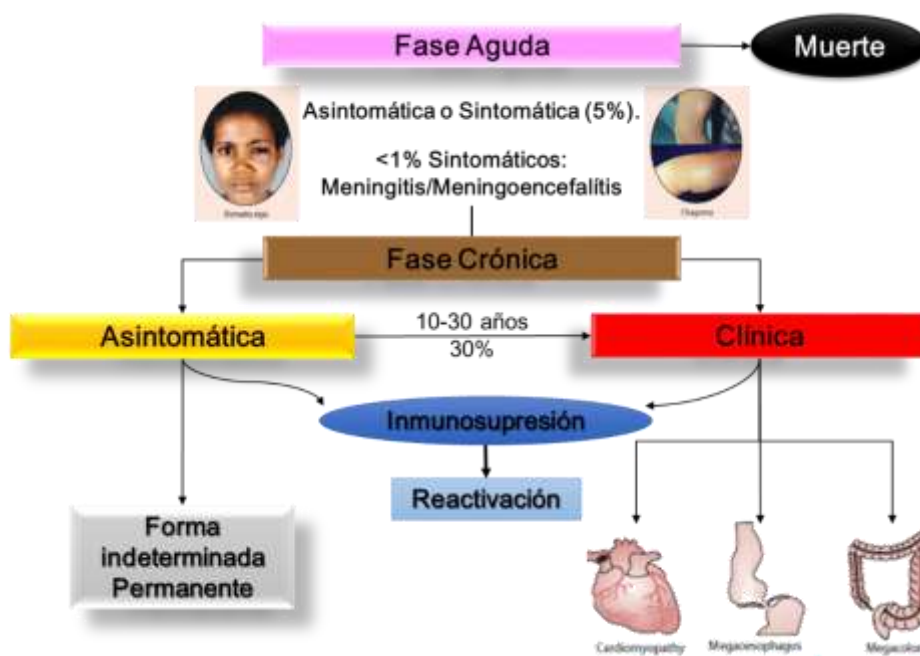


Figura 2. Diagrama de la historia natural de la enfermedad de Chagas. Modificado de (Rassi, Rassi et al. 2010)

1.2.1 Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Hasta el momento no existe vacuna contra *T. cruzi* y se utiliza como primera y segunda línea de tratamiento el Benznidazol y Nifurtimox (NFX), respectivamente.

Estos medicamentos son utilizados desde los años 70's y hasta hoy siguen siendo los únicos medicamentos disponibles para el tratamiento en el mundo, aunque su perfil de eficacia y seguridad están lejos de ser los ideales, por su limitada eficacia en el estado crónico de la enfermedad, su falta de disponibilidad comercial y a los efectos tóxicos secundarios severos que producen (Ferella, Nilsson et al. 2008, Andersson 2011). Desafortunadamente, el número de moléculas investigadas con potencial tripanosomicida es limitado, disminuyendo las posibilidades de tratamientos innovadores (Pinheiro, Brum-Soares et al. 2017, Perez-Molina and Molina 2018). Nifurtimox es el primer medicamento utilizado para combatir a la enfermedad de Chagas, se administra oralmente en 3 o 4 dosis por 60 a 90 días. La tasa de curación en la fase crónica indeterminada es del 86% en niños menores de 14 años y de un 7% al 8% en adultos. La frecuencia de los resultados adversos es del 43% al 97.5% y los signos más comunes son anorexia, pérdida de peso, desórdenes neurológicos (irritabilidad, insomnio, desorientación, cambios de humor, parestesias, neuropatía periférica), manifestaciones digestivas tales como náuseas y vómito, y ocasionalmente fiebre y salpullido. Este tratamiento se discontinúa en un 14.5% al 75% de los casos. Beznidazol presenta un mejor perfil de tolerancia, mejor penetración y posiblemente mejor eficacia, por lo que es preferido en lugar del nifurtimox. Es administrado oralmente en dos o tres dosis usualmente por 60 días. Se ha reportado que 30 días de tratamiento pueden ser útiles para los adultos crónicamente infectados. Benznidazol presenta actividad durante la fase aguda y

las etapas tempranas de la infección con un 100% de cura serológica de pacientes con enfermedad congénita tratados durante los primeros años de vida y en un 76% en los pacientes con enfermedad aguda. En pacientes crónicos la tasa de curación es menor de un 60 al 93% en niños con edad de hasta 13 años y de un 2 al 40% en adultos con enfermedad crónica tardía. Los efectos adversos más comunes presentados son hipersensibilidad, principalmente en forma de erupción cutánea, intolerancia digestiva y síntomas generales tales como anorexia, astenia, dolor de cabeza y desordenes del sueño. Este tratamiento se discontinúa en un 2% al 29% de los casos, se piensa que las reacciones adversas son reversibles y severas en menos del 1 % de los casos. El nifurtimox se ha visto que es seguro como segundo tratamiento después de la interrupción del benznidazol debido a los efectos adversos. Un obstáculo importante para el desarrollo de nuevas terapias es el pobre traslado de los datos *in vitro* a la enfermedad humana, la limitada disponibilidad de modelos animales y del valor predictivo limitado para la evaluación preclínica y nuevas terapias (Perez-Molina and Molina 2018).

1.2.2 Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) estima que cerca de 70 millones de personas viven en áreas de exposición y están en riesgo de infectarse. Esta enfermedad afecta aproximadamente entre 6 y 7 millones de personas y tiene una incidencia de 30,000 nuevos casos anuales por todas las formas de

transmisión, se producen 14,000 muertes anuales y 8,000 recién nacidos se infectan durante la gestación (Figura 3) (OPS 2017). Los recientes flujos de migrantes de países endémicos para la enfermedad de Chagas, ha generado un importante problema de salud en países no endémicos como Estados Unidos, Canadá y muchas partes de Europa y el oeste del pacífico, donde se observa un incremento en el número de individuos infectados (Rassi, Rassi et al. 2010).

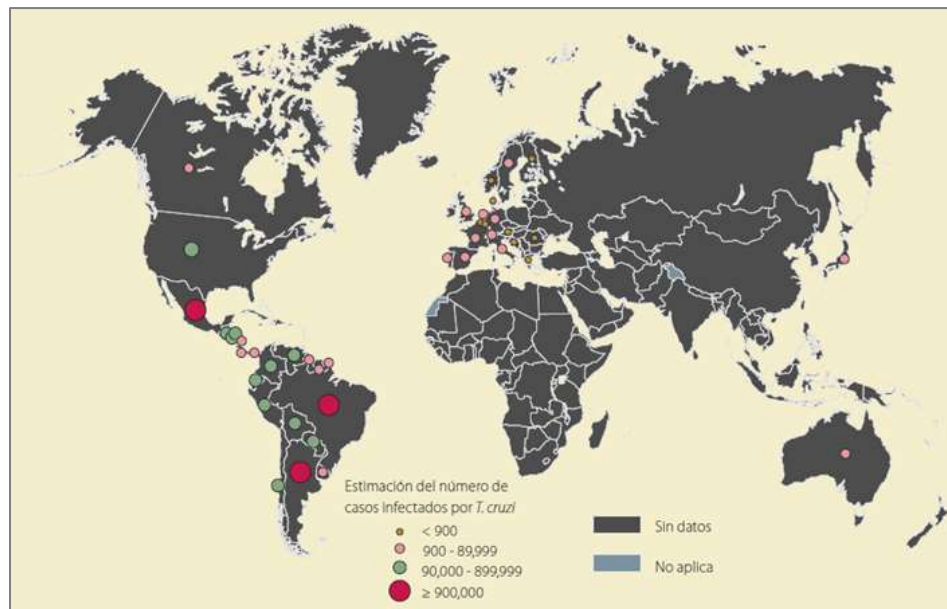


Figura 3. Distribución global de los casos de la enfermedad de Chagas, basados en estimados oficiales, 2006-2010. Revisado en (Salazar-Schettino, Bucio-Torres et al. 2016).

En México una encuesta seroepidemiológica nacional sobre la enfermedad de Chagas en 66,678 muestras en población urbana y rural de todas las edades, indica una seroprevalencia nacional promedio de 1.6% que representa 1, 472, 000

personas infectadas (Velasco-Castrejón *et al.*, 1992). Una segunda encuesta seroepidemiológica realizada en 1994 por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) en colaboración con 18 Centros Estatales de Transfusión Sanguínea (CETS) en 18 estados de la República Mexicana, mostró que el 1.5% de las muestras de donación contienen anticuerpos anti-*T. cruzi* (Guzmán Bracho 1998). Por otra parte, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 2006, estimó que en México existían aproximadamente 1'100,000 individuos infectados y 29'500,000 en riesgo de contraer la infección. El Centro Nacional de Transfusión Sanguínea reporta hasta un 3.5% de bolsas de sangre contaminadas con el parásito. Y en un estudio reciente realizado en el Hospital General de la Ciudad de México se indicó un 17% de las bolsas de sangre contaminadas con el parásito, lo que es alarmante cuando se compara con el 0.08% con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el 0.48% con el virus de hepatitis B (Ramsey and Schofield 2003).

1.3 Mecanismos de Transmisión de *T. cruzi*

La transmisión de *T. cruzi* puede llevarse a cabo de varias maneras. En áreas endémicas de la enfermedad de Chagas, la principal vía de transmisión de *T. cruzi* es a través del contacto con insectos triatominos infectados de la orden Hemiptera, familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae. Los cuales son

hematófagos obligados durante todo su ciclo de vida y de hábitos nocturnos. El triatmino tiene un ciclo selvático en donde transmite a *T. cruzi* a reservorios silvestres y un ciclo doméstico en que coloniza el domicilio y peri-domicilio, transmitiendo al parásito al hombre y animales de corral y domésticos. La mayoría de las infecciones en el hombre se producen en áreas rurales, en donde la infección se transmite (80% de los casos) a través de las heces del insecto cuando los insectos infectados se alimentan de sangre de un mamífero. Los vectores infectados excretan los parásitos en sus heces durante la succión de la sangre y se sabe que los triatominos no diseminan la infección por inoculación del parásito a través de la saliva. La picadura del triatmino induce una reacción alérgica que estimula la dilatación, la cual facilita la succión de la sangre. Adicionalmente, la alergia provoca el rascado de la piel y de esta manera la inoculación de las formas infectivas de *T. cruzi* en el sitio de la picadura del insecto. Existen más de 100 especies de triatominos los cuales potencialmente pueden transmitir a *T. cruzi*, todos ellos distribuidos en el continente Americano. La mayoría de las especies de triatominos son exclusivas de vida silvestre, pero algunas de ellas colonizan casas las cuales son importantes para la transmisión de *T. cruzi* al humano. Las especies con mayor capacidad vectorial, con hábitos domiciliarios y con mayor distribución geográfica son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Pastrongylus megyptus* (Figura 4) (Clayton 2010, Coura and Vinas 2010, OMS 2017).

Otros mecanismos de transmisión no vectorial (20 % de los casos) que tienen un papel importante en países no endémicos y una importancia creciente en áreas endémicas son: transfusión sanguínea, vía congénita, trasplante de órganos. Otras mecanismos de transmisión menos frecuentes son la vía oral (Consumo de comida y agua contaminada) y por accidentes de laboratorio (Rassi, Rassi et al. 2010, Perez-Molina and Molina 2018).



Figura 4. Distribución de algunas especies de Triatominos de importancia epidemiológica. Las áreas rojas indican la distribución de cada uno de los triatominos. Las letras en rojo indican las especies más importantes para la transmisión de *T. cruzi* (Gourbiere, Dorn et al. 2012)

1.4 Ciclo biológico de *T. cruzi*

T. cruzi tiene un ciclo de vida digénico ya que se alterna entre un hospedero vertebrado (los cuales comprenden un amplio rango de mamíferos incluyendo al hombre) y un hospedero invertebrado (insectos que pertenecen a la familia *reduvidae*, subfamilia *triatominae*). Durante este ciclo biológico, el parásito presenta 4 estadios de desarrollo que son distintos morfológica y bioquímicamente. Los epimastigotes y amastigotes que son las formas replicativas del parásito, y los tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos que son las formas infectivas no replicativas. Aunque, hay reportes que han mostrado que los amastigotes también pueden infectar a las células por un mecanismo dependiente de actina y mantener un ciclo replicativo intracelular (Navarro, De Lima et al. 2003, Fernandes and Andrews 2012) y que los epimastigotes producen una infección productiva en fibroblastos en cultivo (Florencio-Martinez, Marquez-Duenas et al. 2010).

Después de que el insecto vector toma sangre que contiene a los tripomastigotes sanguíneos (1), los parásitos se transforman a epimastigotes y se multiplican en su intestino medio (2). Luego de 3 a 4 semanas, los epimastigotes se diferencian a la forma infectiva de tripomastigote metacíclico (metaciclogénesis) en la parte distal del intestino (3). Los tripomastigotes metacíclicos entonces son depositados durante las subsecuentes picaduras y pueden entrar a nuevos hospederos mamíferos mediante las heces u orina contaminadas del insecto vector (4). Los tripomastigotes metacíclicos pueden penetrar a través de la picadura

después de que el hospedero se rasca, o directamente por mucosas en donde son fagocitados por los macrófagos o invaden a las células no fagocíticas a través de una vacuola parasitófora de la cual subsecuentemente escapa al citoplasma de la célula en donde se transforma a amastigotes (amastigogénesis) (5). Después de nueve ciclos de división binaria en el citosol los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos los cuales salen de la célula para infectar nuevas células y propagar la infección (6), o son tomados por un nuevo insecto vector durante la ingesta sanguínea para cerrar así su ciclo de vida (7) (Figura 5) (Tanowitz, Kirchhoff et al. 1992, Ferella, Nilsson et al. 2008).

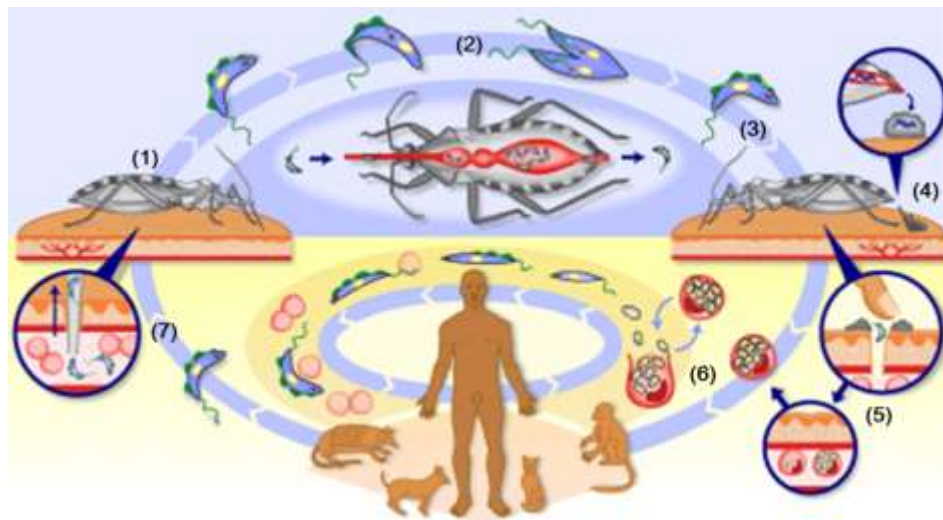


Figura 5. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Ver texto para la descripción ((OPS 2017) <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/en/>).

1.5 Proceso de diferenciación de *T. cruzi*

Durante el ciclo de vida los tripanosomátidos se diferencian como una estrategia para adaptarse a los diversos ambientes entre el hospedero y el vector. Como resultado de esto, existe una serie de cambios integrales en su morfología celular, metabolismo, expresión de genes y vías de señalización (Lopes, T Gomes et al. 2010). Aun cuando se sabe que la diferenciación de los tripanosomátidos es detonada por el micro-ambiente del entorno, es poco lo que se conoce de las moléculas que participan en la regulación del crecimiento y diferenciación del parásito (Contreras, Morel et al. 1985).

Se ha reportado que *T. cruzi* al adaptarse a los cambios del medio ambiente, sufre una transformación morfológica y funcional que involucra la activación de cascadas de señalización de proteínas cinasas y una variedad de señales fisiológicas complejas (Parsons and Ruben 2000). Como muchos de sus procesos fundamentales se ven afectados, es necesario que la diferenciación del parásito sea altamente regulada, lo que involucra cambios en el patrón de expresión de sus genes y la participación coordinada de sus productos, que participan en los diversos procesos celulares implicados (Tyler, Olson et al. 2003).

Mientras que en los organismos eucariotas superiores la diferenciación celular es un fenómeno unidireccional, en tripanosomátidos las características morfológicas de un género dado son intercambiadas a través de su ciclo de vida, ajustándose a los factores del medio ambiente presentes en cada uno de los

hospederos. Diferentes ligandos y/o moléculas estimuladoras que se encuentran presentes en el medio ambiente del entorno del parásito son las que regulan los cambios que se presentan durante la diferenciación. Estos cambios resultan en la producción de distintas formas del parásito que se distinguen por la posición relativa del núcleo y el flagelo. Los estadios extracelulares (epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos) son comparativamente más largos y flagelados que los amastigotes, que son más pequeños y redondeados. Estos cambios estructurales y fisiológicos progresivos resultan en una alteración de la infectividad del parásito que es una característica crítica del mismo (Wanderley De 2002).

Durante el ciclo de vida de *T. cruzi* se han descrito dos procesos de diferenciación: la metaciclogénesis y la amastigogénesis. Durante la metaciclogénesis, el epimastigote se transforma a tripomastigote metacíclico en el intestino medio del insecto vector ((Figueiredo, Rosa et al. 2000)). Mientras que en la amastigogénesis se han descrito dos tipos. En la primera los tripomastigotes metacíclicos que infectan las células del mamífero se diferencian a amastigotes, llamándosele a este proceso amastigogenesis primaria. Una vez que los amastigotes se multiplican dentro de la célula estos se diferencian a tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados al medio extracelular e infectan nuevas células donde se diferenciarán a amastigotes, llamándose a este proceso amastigogenesis secundaria (Navarro, De Lima et al. 2003).

Estudios de morfología comparativa, mostraron que a pesar de que los tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos presentan propiedades morfológicas y biológicas similares, la amastigogenesis primaria y secundaria son dos procesos diferentes, sugiriendo que utilizan mecanismos moleculares de diferenciación distintos (Navarro, De Lima et al. 2003).

Usando condiciones axénicas, varios investigadores han reportado la diferenciación morfológica que ocurre durante la amastigogenesis y los factores que estimulan dicha transformación, tales como la temperatura, condiciones nutricionales y los cambios de pH (Tomlinson, Vandekerckhove et al. 1995, Contreras, Navarro et al. 2002, Navarro, De Lima et al. 2003, Hernandez-Osorio, Marquez-Duenas et al. 2010). La fácil identificación morfológica de los estadios de desarrollo de *T. cruzi*, permite emplear la amastigogénesis *in vitro*, como modelo de estudio de la morfogénesis del parásito e identificar los factores micro-ambientales que disparan el proceso de diferenciación. Así, es posible llevar a cabo la simulación del proceso de diferenciación que ocurren en el ciclo de vida de *T. cruzi* en condiciones axénicas, lo que evita las complicaciones del mantenimiento de hospedadores intermediarios y definitivos en el laboratorio. Además, permite producir cantidad suficiente de los estadios de desarrollo del parásito para estudios bioquímicos, fisiológicos y antigénicos (Contreras, Lima et al. 2006).

Se ha visto que durante la transformación morfológica que sufre *T. cruzi* en el proceso de la amastigogénesis primaria, hay alteraciones en el perfil de sus

glicoproteínas como transialidasas y mucinas (Burleigh and Andrews 1995). También, se ha visto que la activación de vías de señalización tanto en el hospedero como en el parásito, tienen una participación en la diferenciación de *T. cruzi*. Se ha descrito que la regulación de los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y el inositol son determinantes en el control de la diferenciación de *T. cruzi*. Por ejemplo, se ha demostrado en experimentos utilizando análogos lipofílicos de AMPc se induce la metacicloogénesis del parásito, indicando que el AMPc tiene un papel importante en la diferenciación de epimastigotes replicativos a tripomastigotes metacíclicos no replicativos. También, se ha demostrado que los metabolitos de inositol no tienen efectos en la metacicloogénesis del parásito pero si en su proliferación (Tyler, Olson et al. 2003). Tambien se ha demostrado la fosfolipasa C modificada con lípidos (TcPI-PLC) participa en la diferenciación de trypomastigotes hacia amastigotes (Okura, Fang et al. 2005). Además, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un poderoso regulador de la amastigogenesis, promoviendo la diferenciación de tripomastigotes a amastigotes (Ferraó, de Oliveira et al. 2012). Finalmente, un análisis de la expresión de genes utilizando un sistema de microarreglos de ADN después de 2 horas de inducido el proceso de diferenciación de tripomastigotes extracelulares a amastigotes. Describió la expresión de 25 nuevos genes y 14 genes conocidos de *T. cruzi* entre los estadios de tripomastigotes y amastigotes. Sin embargo, no fueron capaces de identificar secuencias específicas de la forma intermedia pues los parásitos diferenciados

estaban compuestos por una mezcla de tripomastigotes (20%), amastigotes (15%) y formas intermedias (65%) (Minning, Bua et al. 2003).

1.6 Tráfico de proteínas en cinetoplastidos

La síntesis de proteínas de membrana y de secreción en cinetoplastidos sigue aproximadamente la misma ruta que otras células eucariotas (Clayton, Häusler et al. 1995). Las proteínas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y pasan al aparato de Golgi, donde son compartimentalizadas en vesículas de transporte para su distribución hacia la membrana o a los compartimentos celulares. Sin embargo, en el caso de los tripanosomátidos estas vesículas son transportadas del aparato de Golgi a la bolsa flagelar, un componente altamente diferenciado de la membrana plasmática que 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 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 (Clayton, Häusler et al. 1995, Landfear, Tran et al. 2015). El sistema de tráfico vesicular comprende a los orgánulos de las rutas de endocitosis y exocitosis que son los responsables de direccionar a las proteínas a los diferentes compartimentos celulares o la secreción de las proteínas, y también para la captación de moléculas que tienen un papel en regular el desarrollo y la

supervivencia celular. Toda esta red sofisticada de tráfico se mantiene por un amplio conjunto de proteínas que organizan la formación de vesículas, la clasificación de las proteínas de carga y su fusión a la membrana. Sin embargo, es poco lo que se sabe de estas proteínas en tripanosomátidos (Araripe, Cunha e Silva et al. 2004). A diferencia de los otros tripanosomátidos (*T. brucei* y *Leishmania*), *T. cruzi* contiene además de la bolsa flagelar una segunda invaginación especializada en su membrana plasmática, llamada citostoma, que constituye un sitio alternativo de endocitosis. En los epimastigotes de *T. cruzi*, se ha observado que el citostoma está localizado cercano a la bolsa flagelar y que se extiende en su citoplasma como un túbulo estrecho y acidificado en su interior (de Souza, de Carvalho et al. 1978, Porto-Carreiro, Attias et al. 2000).

La mayor parte de las investigaciones sobre endocitosis se han realizado en *T. brucei*. En estos parásitos se ha visto que la internalización de nutrientes ocurre a través de su bolsa flagelar en experimentos de endocitosis con ferritina, partículas de lipoproteínas de baja densidad (*LDL*), transferrina y albúmina de suero bovino (*BSA*). Se ha descrito que la transferrina y *LDL* son internalizados de manera dependiente de receptor y que en la bolsa flagelar del parásito se encuentran los receptores correspondientes. El primer reporte de la endocitosis de ligandos en *T. cruzi* fue hecho utilizando peroxidasa de rábano (*HRP*), observándose que ésta se localizó en el citostoma del parásito y dentro de cuerpos multivesiculares. Estudios posteriores en epimastigotes, utilizando proteínas y *LDL* marcadas con oro

mostraron su presencia dentro de la bolsa flagelar y el citostoma a 4°C. Después de 30 minutos a 28°C estos ligandos se encontraron en los reservosomas (Porto-Carreiro, Attias et al. 2000). También, Ferritina, BSA y HRP son captadas por endocitosis en fase fluida no saturable, que es relativamente lenta; mientras que transferrina y LDL son endocitados por un proceso específico de ligando de manera saturable y rápida, similar a la endocitosis mediada por receptor en células mamíferas (Landfear and Ignatushchenko 2001).

Se ha propuesto que la exocitosis y la endocitosis en *T. cruzi* están polarizadas, debido a que estos procesos están confinados a dominios altamente diferenciados de la superficie celular, como la bolsa flagelar y el citostoma, ya que el resto de la membrana plasmática está delineada por un corsé sub-peculiar de microtúbulos que evita la formación de las vesículas y de su fusión. Después de pasar a través de la red de túbulos y vesículas que comprenden los endosomas tempranos, el material endocitado es conducido a los reservosomas, que es el orgánulo propuesto como endosoma tardío en epimastigotes de *T. cruzi*, en donde se mantienen las proteínas y posteriormente son degradadas (Araripe, Cunha e Silva et al. 2004). Hasta el momento, son pocas las proteínas reportadas que participan en el tráfico de proteínas *T. cruzi*.

1.7 Clan de las Arrestinas

El clan de las Arrestinas corresponde a un grupo de proteínas anotadas con el dominio pfamCL0135 (*Arrestin_N-Like*), las cuales están involucradas en procesos de tráfico de proteínas vacuolares, endocitosis de receptores acoplados a proteínas G y la esporulación en *B. subtilis*. Dentro de este clan se agrupan: las Arrestinas, que son proteínas que contienen dominios de Arrestinas (ARRDCs), adaptadores de tráfico relacionado con las Arrestinas (ARTs), Proteína de clasificación vacuolar 26 (Vps26) y Gen 3 de la Región Crítica del Síndrome de Down (DSCR3). La principal característica por lo cual este grupo de proteínas se clasifican dentro de este clan, es debido a que adquieren una estructura terciaria similar con dos dominios de hojas betas anti-paralelas altamente conservada a pesar de estar relacionadas distantemente en términos de conservación de secuencias (alrededor del 10% de identidad) (Figura 6) (Alvarez 2008, Aubry, Guetta et al. 2009, Aubry and Klein 2013). Estas proteínas a su vez pueden ser agrupas en tres grupos: Arrestinas visuales / β -Arrestinas, alfa Arrestinas (ARRDCs / ARTs) y Vps26 / DSCR3 (Kang, Tian et al. 2014).

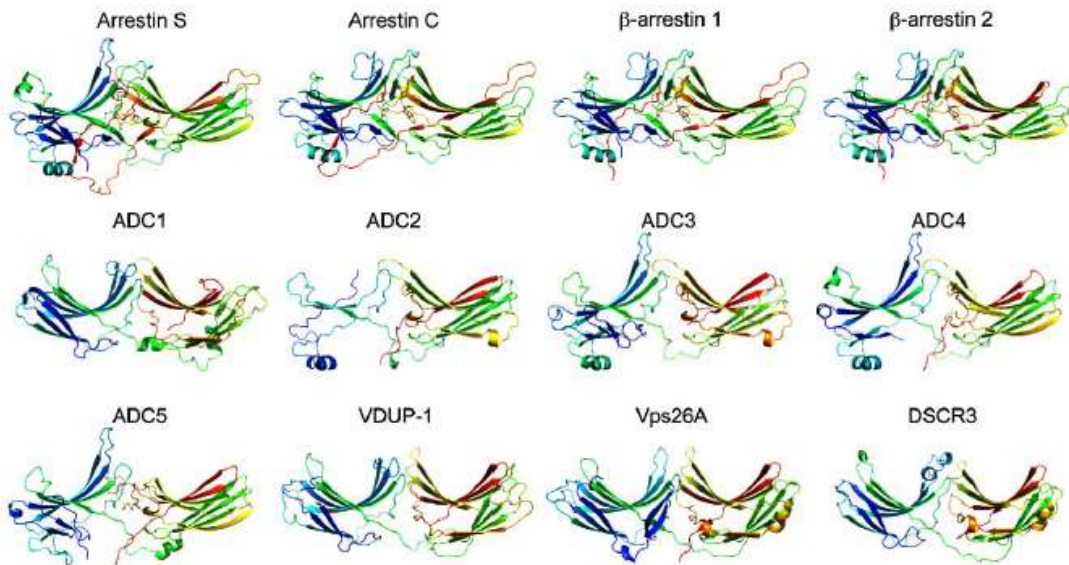


Figura 6. Estructura tridimensional de las proteínas del clan de las Arrestinas humanas (Aubry, Guetta et al. 2009).

1.7.1 Arrestinas

Esta familia de proteínas consiste de dos isoformas retinales: Arrestina visual (Arrestina 1, antígeno S) y Arrestina de conos (Arrestin 4) que se encuentran en los bastones y conos de la retina respectivamente, e interactúan principalmente con la rodopsina y dos Arrestinas no visuales: β -Arrestina 1 (Arrestina 2) y β -Arrestina 2 (Arrestina 3), expresadas ubicuamente. Dependiendo del tipo celular y del estado metabólico de la célula, pueden encontrarse distribuidas difusamente en el citosol, unidas al citoesqueleto, concentradas en el centrosoma, recubriendo endosomas internalizados y dentro del núcleo. La función inicial descrita para estas proteínas fue participar en la internalización, desensibilización, reciclamiento y degradación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Sin embargo también están involucradas en endocitosis, desensibilización de

receptores, traducción de señales y regulación de la expresión de genes entre otras actividades (Shukla, Manglik et al. 2013, Peterson and Luttrell 2017, Skieterska, Rondou et al. 2017).

La estructura cristalina de las Arrestinas visuales y β -Arrestinas fue resulta poco después de su descubrimiento. La estructura de las Arrestinas está compuesta por dos módulos orientados de cabeza a cola, el dominio N-Arrestina (PF00339) y el dominio C-Arrestina (PF02752) conectados por una bisagra flexible. Cada módulo está compuesto por aproximadamente 150 aminoácidos. La estructura tridimensional incluye 20 hojas betas y una hélice alfa, que forman dos sándwiches curvados profundos unidos por un eje de rotación, cada uno compuesto por dos hojas betas anti-paralelas estructuradas de manera similar al módulo de la fibronectina tipo III. El dominio N-Arrestina está compuesto por las hojas betas 1-10, la hoja 20 y la hélice 1, mientras que el dominio C-Arrestina se compone de las hojas 11-19. Una característica distintiva de la conformación de las Arrestinas es la presencia de un núcleo polar embebido entre los dominios N-terminal y C-terminal en el fulcro de la molécula. Esta estructura está formada por residuos cargados en el N-terminal (Asp-30), el cuerpo del dominio N-terminal (Arg-175 y Lys-176), del lazo interfacial del dominio C-terminal (Asp-296 y Asp-303) y el tallo C-terminal (Arg-382). Estos residuos comparten un alto grado de conservación de secuencia, indicando que la estructura de esta región central se conserva entre todas las

Arrestinas y sin duda es crítica para la función, actuando como un sensor de fosfatos y como interruptor de la activación (Figura 7) (Hirsch, Schubert et al. , Aubry and Klein 2013).

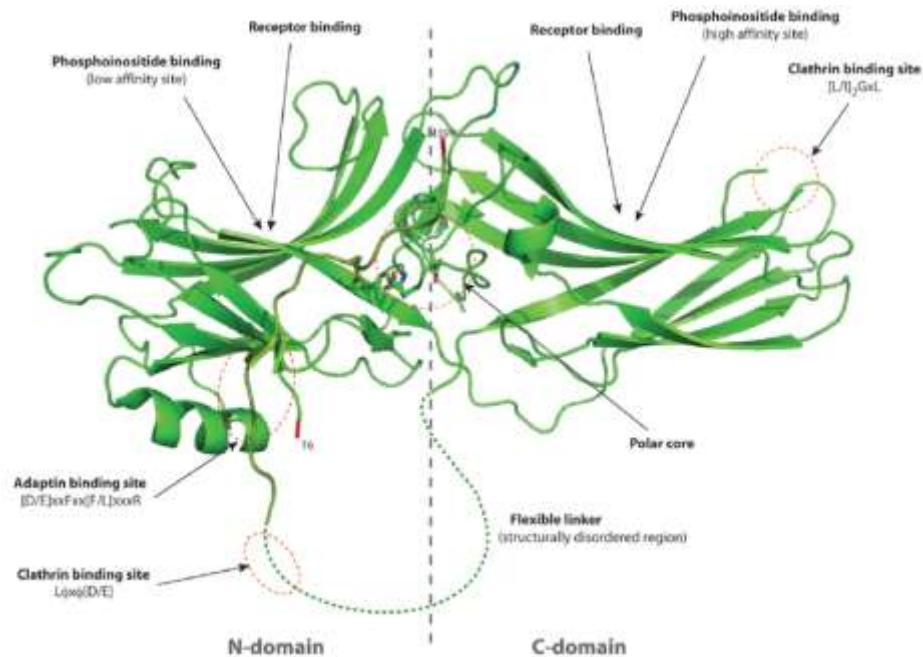


Figura 7. Estructura tridimensional de la β -Arrestina 1, características y sitios de interacción (Modificado de (Kang, Tian et al. 2014)).

1.7.2 Proteínas que contienen dominios de Arrestina (ARRDCs)

Las proteínas relacionadas a las Arrestinas se encuentran en los genomas de protistas hasta mamíferos y se caracterizan por contener los dominios N-terminal y C-terminal con los cuales recubren un núcleo polar presente en la estructura terciaria de estas proteínas. El genoma de mamíferos codifica para 6 proteínas que contienen los dominios N-terminal y C-terminal de las Arrestinas: ARRDC1-5 y la

proteína de interacción con tioredoxina (TXNIP). Parálogos de estas proteínas se encuentran en peces, ranas y aves. En el caso de moscas y gusanos, éstos contienen solo un parálogo de la proteína ARRDC5. Hasta el momento, no existe la estructura cristalina de estas proteínas y debido a su reciente descubrimiento poco se sabe acerca de su función molecular. Los datos disponibles de estas proteínas corresponden a isoformas humanas, las cuales presentan un papel fisiológico en la regulación del metabolismo. TXNIP y todas las ARRDCs excepto la ARRDC5 contienen dos sitios [L, P] PxY que son capaces de interactuar con dominios WW encontrados principalmente en ligasas de ubiquitinas tipo-HECT. En el caso de ARRDC1-4 y TXNIP, éstas son capaces de interactuar con ligasas de ubiquitinas E3 (WWP1, WWP2, Nedd4 e Itch, ARRDC2 y 4 no interactúan con WWP2 e Itch). Las ARRDCs solo actúan como plataforma para la ubiquitinación de otras proteínas diana a excepción de ARRDC1, la cual es ubiquitinada por WWP1 y WWP2. En el caso de ARRDC1-4 y TXNIP también pueden interactuar con las subunidades de maquinaria ESCRT Alix y Tsg101 (Vps23, en levaduras). Por último ARRDC3 y ARRDC 4 tienen un papel importante en la membrana plasmática y también se les asocia con endosomas y lisosomas, mientras que TXNIP y ARRDC2 son esencialmente nucleares (Aubry and Klein 2013).

El genoma de *Dictyostelium discoideum* se ha observado que posee 55 GPCRs, pero que sin embargo no codifica para Arrestinas verdaderas. En su lugar, se encuentran seis genes que codifican para proteínas que contienen dominios de

Arrestina (AdcA-F), así como los genes VPS26 y DSCR3. Estas proteínas se caracterizan por tener extensiones en ambos lados del núcleo polar de la Arrestina y por poseer varios dominios de interacción proteína-proteína o proteína-lípido como: C2, LIM, MIT o FYVE. Se ha observado que la expresión de AdcA-F está regulado en el desarrollo y en el caso de AdcA, Adc-C y Adc-D han sido encontradas en el proteoma de la ruta endocítica vegetativa (Aubry and Klein 2013).

1.7.3 Adaptadores de tráfico relacionadas con las Arrestinas (ARTs)

A pesar de la presencia de pocas GPCRs en levaduras (3 en *Saccharomyces cerevisiae* y nueve para *Schizosaccharomyces pombe*), no se han encontrado genes que codifiquen para β -Arrestinas en estos organismos. En su lugar el genoma de *Saccharomyces* codifica para diez proteínas relacionadas con las Arrestinas también llamadas ARTs. Estas proteínas comparten con las verdaderas Arrestinas un núcleo polar, sin embargo contienen extensiones a veces más largas a cada lado lo cual aumenta su tamaño hasta aproximadamente 1100 aminoácidos en los miembros más largos. Estas proteínas comparten un 10 % de identidad con la Arrestina visual y este porcentaje aumenta hasta un 20 % cuando se considera la identidad y la homología. Al igual que las ARRDCs, muchas de las proteínas ART han mostrado servir como proteínas andamio para la ubiquitina ligasa 3 a través de sitios de unión al dominio WW y en particular participan en la endocitosis de transportadores de la membrana plasmática. El parólogo de ART 9

en *Aspergillus nidulans* llamado PalF, está involucrado en la ruta de señalización de pH. La función de PalF es endocitar al sensor de pH de transmembrana de siete dominios (7TM) PalH, la cual está regulada por la fosforilación y ubiquitinación (Aubry and Klein 2013).

En *S. cerevisiae*, ART9 (conocido anteriormente como Rim8) se une a Rim21 (Paralogo de PalH) y Vps23, una subunidad del sub-complejo ESCRT-1. La unión de Vps23 procede a través del dominio SXP⁵³⁶. Esta interacción es importante para la señalización de Rim8. Además, esta proteína puede ser mono-ubiquitinada en K⁵²¹ cerca del motivo SXP por la ubiquitina ligasa Rs5 y unirse a través del motivo PKY⁵⁰⁸. Las ARTS también han mostrado participación en la ubiquitinación y la endocitosis de transportadores de la membrana plasmática hacia vacuolas para su degradación en respuesta a situaciones de estrés o exceso de sustrato. Hasta el momento no se encuentran datos de la posible participación de las ARTs en el reciclamiento de proteínas cargo (Herrador, Herranz et al. 2010, Aubry and Klein 2013).

1.7.4 Proteína de clasificación vacuolar 26 (Vps26)

Vps26 es una proteína que forma parte del sub-complejo cargo-selectivo del complejo retrómero, que en humanos está presente en dos isoformas Vps26A y Vps26B. Contiene 327 aminoácidos es hidrofílica, soluble y se expresa ubicuamente. Esta proteína muestra un alto grado de identidad de aminoácidos

entre eucariontes superiores y tiene una homología de extremo a extremo con su análogo en *C. elegans*, *D. melanogaster*, *A. thaliana* y *S. cerevisiae* (Haft, Sierra et al. 2000, Aubry, Guetta et al. 2009).

La estructura molecular de Vps26 está compuesta de dos dominios, cada uno de ellos se pliega en una curvatura profunda de β -*Sandwich*. 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) y en el dominio C-terminal (Dominio C), respectivamente. El dominio N se localiza de los residuos 6 al 148 mientras que el dominio C incluye a los residuos 164 al 299. Presenta un *loop* de 15 residuos, que van del residuo 149 al 163, que conecta a los dos dominios. Este *loop* es relativamente móvil, con una mala densidad electrónica de varios residuos los cuales se centran en Asn161. El dominio N-terminal y C-terminal están conectados por un eje de rotación con dos pseudo-pliegues intramoleculares. Vps26 es eléctricamente polarizada y en su superficie contiene un parche básico prominente, cuyos residuos son conservados desde humanos hasta levaduras; y dos parches ácidos, de los que el segundo parche se extiende a ambos lados de la interface entre los dominios y los residuos presentes en este parche son parcialmente conservados en levaduras. También contiene un parche electropositivo en el extremo final del dominio N que consiste de residuos bien conservados: Lys61, Arg62, Arg138 y Arg139. Además varios residuos de Phe sobresalen en solución inmediatamente contigua al parche básico. Esta

combinación de residuos básicos e hidrofóbicos expuestos, es una característica de estructuras que se unen a membrana, lo cual sugiere que Vps26 podría unirse a la membrana vía este motivo (Shi, Rojas et al. 2006).

Debido a la similitud de estructura entre Arrestina y Vps26, se sugiere que ésta última, podría llevar a cabo el reconocimiento de proteínas de carga, debido a que las β -Arrestinas son proteínas adaptadoras endocíticas encargadas de la clasificación del receptor acoplado a proteínas G (GPCR) dentro de vesículas cubiertas de clatrina. Sin embargo, entre estas proteínas no existe similitud a nivel de secuencia. Además, la superposición de Vps26 y la Arrestina visual muestra una desviación de los Cas de las hebras β de 1.4 Å entre los dominios N (63 átomos de C α) y de 1.5 Å entre los dominios C (94 átomos de C α). Una de las características que definen a las proteínas de la familia de las Arrestinas es la existencia de un núcleo polar embebido entre los dos dominios. Vps26 comparte esta característica, en el sentido general ya que el dominio de la interface contiene grupos de interacciones polares ocultas. Las extensiones globales de los núcleos polares son similares, aunque las identidades de los aminoácidos individuales no son conservadas (Shi, Rojas et al. 2006).

1.7.5 Gen 3 de la Región Crítica del Síndrome de Down (DSCR3)

DSCR3 pertenece a un conjunto de aproximadamente 20 genes que se localizan en el locus 21q22 denominado **Región Crítica del Síndrome de Down**. El síndrome de Down es una consecuencia de una trisomía parcial o completa del cromosoma 21 (HSA21), caracterizado por presentar morfológicas faciales características, hipotonía muscular y retraso mental (Pellegrini-Calace and Tramontano 2006, Aubry and Klein 2013). DSCR3 tiene una homología entre un 10-17 % y 17-27 % con las α -Arrestinas / β -Arrestinas, respectivamente. Entre las proteínas más cercanas están Vps26A (identidad 14.8 %) y ARRDC5 (identidad 16.9 %). Interesantemente en DSCR3 de humano se pueden identificar el dominio PFAM PF00339 el cual corresponde al dominio N-Arrestina (Valor $E=1.9 \times 10^{-3}$) y el dominio PFAM PF03643 que pertenece a las proteínas VPS26 ($E=1.1 \times 10^{-155}$). Este mismo fenómeno se observa en los parálogos de algunas especies tales como *Dictyostelium* (Dominio N-Arrestina $E=4.66 \times 10^{-4}$, dominio VPS26 $E=2.91 \times 10^{-43}$). A nivel de secuencia DSCR3 comparte parentesco con las Arrestinas y con Vps26 (considerado como una proteína de la familia que contiene dominio Vps26), además datos filogenéticos muestran que el clado DSCR3 es el primer grupo en escindirse de la rama de las Arrestinas y da lugar a la rama de Vps26, colocando a DSCR3 como un posible vínculo perdido entre la familia de las Arrestinas y Vps26 (Figura 8) (Aubry, Guetta et al. 2009, Aubry and Klein 2013). A nivel filogenético también se pueden identificar varios homólogos de DSCR3 de múltiples linajes, lo que sugiere

un origen antiguo, y un clado monofilético para todos los homólogos de DSCR3 que se origina antes de la diversificación de linajes eucarióticos. Sin embargo, la retención de DSCR3 es limitada, sugiriendo un requerimiento solo a ciertos taxones como Archaeplastida, Amoebozoa, Metazoa y Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria (RAS), a pesar de su origen ancestral (Koumandou, Klute et al. 2011).

Hasta el momento DSCR3 solo ha tenido un interés bioquímico, por lo que su función molecular es desconocida. Esta proteína fue localizada en el núcleo en células HEK293T/17, por lo que se ha propuesto que podría tener un papel como un regulador transcripcional o participar en el mantenimiento de la estructura nuclear (Hu, Warnatz et al. 2006, Aubry, Guetta et al. 2009). Se ha descrito que DSCR3 tiene un 23 % de identidad con H β 58 de ratón, el cual ha mostrado ser esencial para la embriogénesis del ratón, sugiriéndose que DSCR3 podría tener un papel importante en el desarrollo humano. También, se ha reportado que H β 58 es homólogo a PEP8 (Vps26) en levadura y que éste último participa en la clasificación de proteínas del citoplasma a las vacuolas (Nakamura, Hattori et al. 1997).

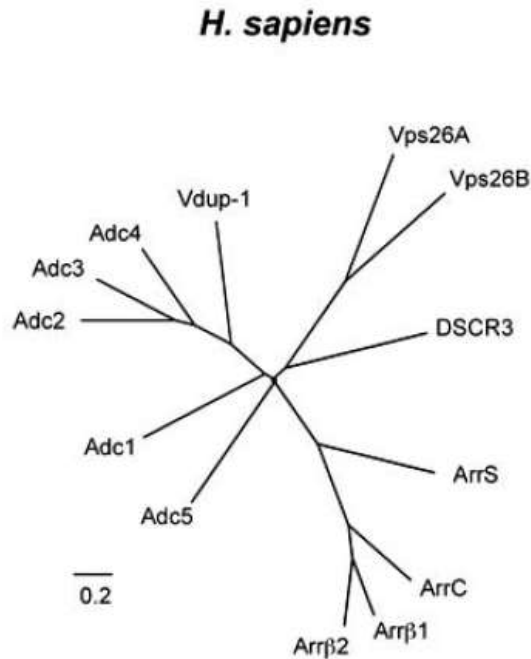


Figura 8. Árbol Filogenético del clan de las Arrestinas presentes en *H. sapiens*. Modificado de (Aubry, Guetta et al. 2009).

Mediante un enfoque computacional utilizando predicciones basadas en homología de secuencias por el modelo oculto de Markov (HMM) y reconocimiento de estructura genómica (mGenTHREADER) se determinó que DSCR3 podría actuar como proteína andamio en una nueva ruta de señalización similar a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) junto a otras proteínas localizadas en el cromosoma 21 (DYRK1A como MAPK, SNF1LK como MKK, RIP4 como MKKK) (Figura 9) (Pellegrini-Calace and Tramontano 2006).

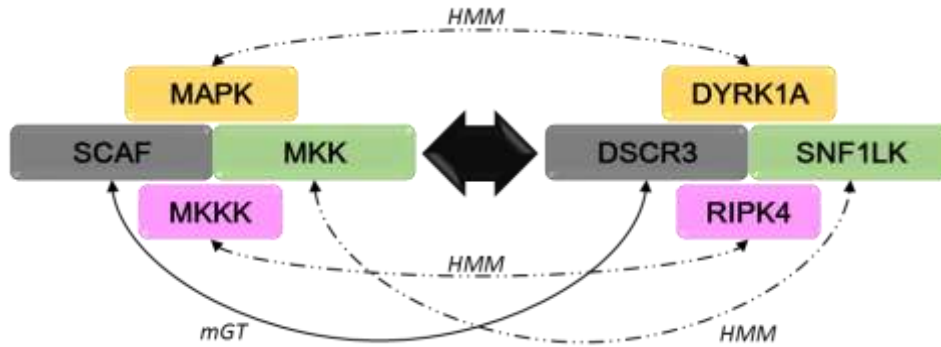


Figura 9. Representación esquemática de la participación de DSCR3 en una ruta de señalización similar a las MAPKs. La línea punteada representa la predicción HMM y la línea continua la predicción de mGenTHREADER (mGT) modificada de (Pellegrini-Calace and Tramontano 2006).

Recientemente, en 2017 se reportó que DSCR3 es parte de un complejo heterotrimérico denominado “*Retriever*” junto con las proteínas Vps29 y C16orf62, un complejo que tiene una similitud sorprendente con el complejo retrómero del cual Vps26 también forma parte. Hasta ahora se propone que el complejo *retriever* se asocia con la nexina adaptadora para la clasificación de cargos 17 (SNX 17) y se acopla a los complejos CCC (CCDC93, CCDC22, COMMD) y WASH. Se localiza en el endosoma, previene la degradación lisosomal y promueve el reciclamiento de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a la superficie celular, entre otras proteínas cargo que contienen un motivo NPxY/NxxY a través del acoplamiento con SNX 17 (y SNX 31), un adaptador esencial para el mantenimiento homeostático de numerosas proteínas de superficie celular, las cuales están asociadas a procesos tales como migración y adhesión celular,

suministro de nutrientes y señalización celular (Figura 10) (McNally, Faulkner et al. 2017).

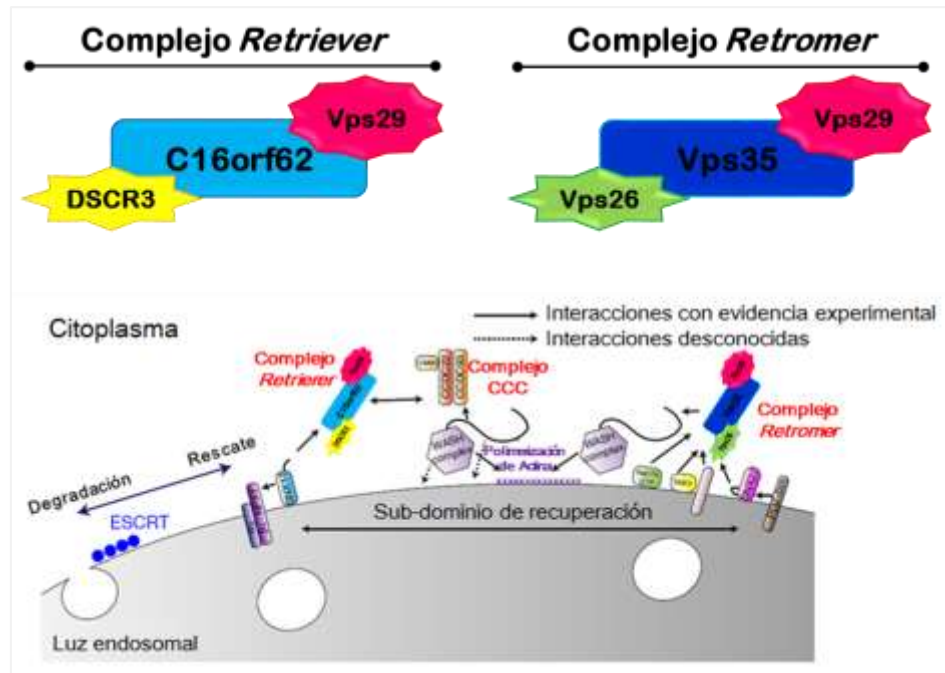


Figura 10. El Complejo *retriever*, modelo funcional y localización endosomal. Comparación con el complejo *retromer*. (Modificado de (McNally, Faulkner et al. 2017)).

1.8 Antecedentes directos

Previamente nuestro grupo de trabajo estableció un sistema de diferenciación *in vitro* que permite llevar a cabo la amastigogénesis secundaria de *T. cruzi* con altos índices de eficiencia y pureza (Hernandez-Osorio, Marquez-Duenas et al. 2010). Con este sistema, se obtuvo una forma intermedia a las 3 horas de diferenciación (FI-3), con la cual se hicieron estudios de expresión diferencial con respecto a tripomastigotes y una biblioteca de sustracción. El análisis de la expresión diferencial del ARNm entre la FI-3, tripomastigotes y amastigotes, identificó 37 secuencias que se expresan diferencialmente en la FI-3. El análisis *in silico* de las 37 secuencias indicó que 14 de éstas corresponden a secuencias reportadas como secuencias hipotéticas y las 13 restantes tienen una homología con proteínas ya reportadas (Sánchez-Cruz. 2009). Posteriormente, utilizando una estrategia de ARNm antisentido (AS) evaluamos la participación funcional de una de las moléculas que se expresa diferencialmente en la FI-3, la cual denominamos TcDSCR3-Like (anteriormente denominada TcArrestina-Like). Esta técnica de genética reversa ha mostrado ser invaluable en la elucidación de la regulación de la expresión de genes y de su función en una gran variedad de sistemas biológicos incluyendo tripanosomátidos (Tovar and Fairlamb 1996, Málaga and Yoshida 2001).

Evaluamos la capacidad de producir infecciones primarias en monocapas de fibroblastos 3T3/NIH de los parásitos transfectantes estables expresando un ARNm antisentido de la secuencia de *TcDSCR3-Like* y cuantificamos el número de

células infectadas y de parásitos liberados al sobrenadante. Esto se hizo con dos finalidades, por un lado es una manera de evaluar *in vivo* el proceso de diferenciación ya que este proceso es un paso indispensable para completar el ciclo infectivo intracelular de parásito; y por el otro, para obtener tripomastigotes derivados de las células infectadas para realizar experimentos de diferenciación *in vitro*. Los resultados mostraron que los parásitos *Knock Down* (KD) de *TcDSCR3-Like*, tienen un efecto deletéreo severo en su capacidad infectiva (97.67 % menor) y en el número de parásitos liberados al sobrenadante de células infectadas (99.7% menos) en comparación con los parásitos control silvestres (WT) y MOCK, parásitos transfectados con el esqueleto del vector. Como este fenotipo podría ser resultado de un defecto en alguno de los pasos del proceso de infección, evaluamos la capacidad de los parásitos KD de *TcDSCR3-Like* de diferenciarse antes de ingresar a la célula blanco, de invadirla y de diferenciarse intracelularmente, en comparación con los parásitos MOCK control. Los parásitos KD de *TcDSCR3-Like* se diferenciaron menos eficientemente (~50 %) e invadieron menos (99 %) que los parásitos MOCK control, sugiriendo que *TcDSCR3-Like* tiene un papel en la diferenciación extracelular de epimastigote a amastigote y tripomastigote y en la capacidad del parásito de invadir a la célula blanco (Rubio-Ortiz 2012).

II. Planteamiento del problema

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* se alterna entre un insecto vector y un hospedero mamífero, que lo expone a diversos cambios microambientales que propician su diferenciación, replicación y el desarrollo de su ciclo infectivo. Para que se lleven a cabo estos procesos es necesario un tráfico activo de proteínas. Al igual que otras células eucariotas, la ingestión de moléculas, el transporte y reciclamiento de proteínas y su degradación, es llevada a cabo a través del sistema endosomal-lisosomal, por lo que es un proceso vital para la sobrevivencia del parásito. La endocitosis / exocitosis en *T. cruzi* está polarizada a la bolsa flagelar (pinocitosis) y al citostoma (endocitosis mediada por receptor), siendo este último el sitio más activo de endocitosis en el parásito. En comparación con lo que se conoce del tráfico de proteínas en *T. brucei* y *Leishmania*, es poco lo que se sabe a este respecto en *T. cruzi*, debido a la ausencia de marcadores moleculares. Hasta el momento, se han descrito los compartimentos endocíticos de epimastigotes, y en donde se almacenan y digieren las proteínas endocitadas, pero poco se sabe de las moléculas que participan y de los mecanismos moleculares involucrados, así como de su relación con los procesos de diferenciación e infección de *T. cruzi*.

III. Justificación

Aun cuando se conocen los pasos esenciales del proceso de la endocitosis/exocitosis de *T. cruzi*, se conoce poco de las proteínas participantes y de los mecanismos moleculares involucrados.

IV. Hipótesis

La secuencia hipotética TcCLB.506941.210 corresponde a TcDSCR3-Like de *T. cruzi*, la cual está involucrada en el tráfico de proteínas, y probablemente participe en el proceso de infección del parásito.

V. Objetivo General

Caracterizar biológicamente a TcDSCR3-Like de *T. cruzi*.

V.I Objetivos específicos

1. Demostrar la obtención de los parásitos KD de *TcDSCR3-Like*.

1.1 Determinar los niveles del ARNm antisentido por PCR.

1.2 Determinar los niveles de ARNm endógeno de *TcDSCR3-Like* en los parásitos control MOCK y KD de *T. cruzi* mediante qRT-PCR.

2. Caracterizar a TcDSCR3-Like de *T. cruzi*.

2.1. Determinar la localización subcelular de TcDSCR3-Like en parásitos transfectantes que expresan a TcDSCR3-Like exógena fusionada a las banderas de HA y GFP.

2.2. Evaluar la localización subcelular de HA-TcDSCR3-Like y TcDSCR3-Like-GFP exógena después de un estímulo de invasión.

2.3 Determinar la co-localización de TcDSCR3-Like con marcadores de endosoma temprano (EEA-1).

2.4. Evaluar la capacidad endocítica de los parásitos que expresan a HA-TcDSCR3-Like y TcDSCR3-Like-GFP exógena.

2.5. Evaluar el interactoma de TcDSCR3-Like en ensayos in vivo (co-IPP).

VI. Materiales y Métodos

VI.I Materiales

Parásitos

Se utilizaron epimastigotes silvestres de la cepa CL Brener, clona obtenida de la cepa CL de *T. cruzi* aislada de *Triatoma infestans* en Rio Grande, Brasil (Brener and Chiari 1963). Se crecieron en 5 mL de medio LIT (Infusión de hígado-Triptosa; NaCl 60mM, KCl 5.36 mM, Na₂HPO₄ 29 mM, C₆H₂O₆ 11 mM, infusión de hígado, triptosa) suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB), 0.5 % de ampicilina-estreptomicina y Hemina 1/200 (partiendo de un stock de 5 mg/mL) en tubos falcón de 15 mL, incubándolos a 28°C. Los parásitos se resebraron cada 5-7 días.

Línea Celular

Se utilizaron fibroblastos 3T3/NIH de embrión de ratón (ATCC Numero CLR-1658TM). Se sembraron 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) alta glucosa suplementado con 10 % SFB y 0.5 % de solución penicilina-estreptomicina (10,000 U/ μ L/mL en solución salina de NaCl al 0.85 %), incubándolos a 37 °C en presencia de dióxido de carbono (CO₂) al 5 % hasta una confluencia del 80 %. Para su resiembra, monocapas al 80 % se lavaron con 2 mL de tampón de fosfatos salino (PBS)-1X con Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M y se adicionó 1 mL de tripsina-EDTA a 37°C durante 5 minutos. Se agitó

ligeramente la caja para desprender las células, se tomó 100 µL de la suspensión celular y se colocaron en una nueva caja con medio DMEM nuevo para mantener el stock. Los cultivos para uso experimental se sembraron en frascos Corning de 225 cm² y se incubaron a 37 °C hasta obtener la confluencia deseada.

Cepas de Bacterias y Medios

Bacterias. Las bacterias se crecieron en medio Luria Bertani o medio *Terrific broth* con los aditivos requeridos.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas

Cepa <i>E. coli</i>	Genotipo	Fuente
DH5α	F- Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Gibco-BRL
BL21 (DE3) pLysS	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB-, mB-), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , · (DE3), pLysS, Cmr	Novagen
Lemo 21 (DE3)	<i>fhuA2 ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> / pLemo(CamR) λ DE3 = λ sBamHI Δ <i>EcoRI</i> -B int::(<i>lacI</i> ::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ <i>nin5</i> pLemo = pACYC184-PrhaBAD-lysY	BioLabs

Medios. La composición del medio está dada para un litro de medio y se esterilizaron en autoclave. El pH de los medios se ajustó a 7.0 con HCl.

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados

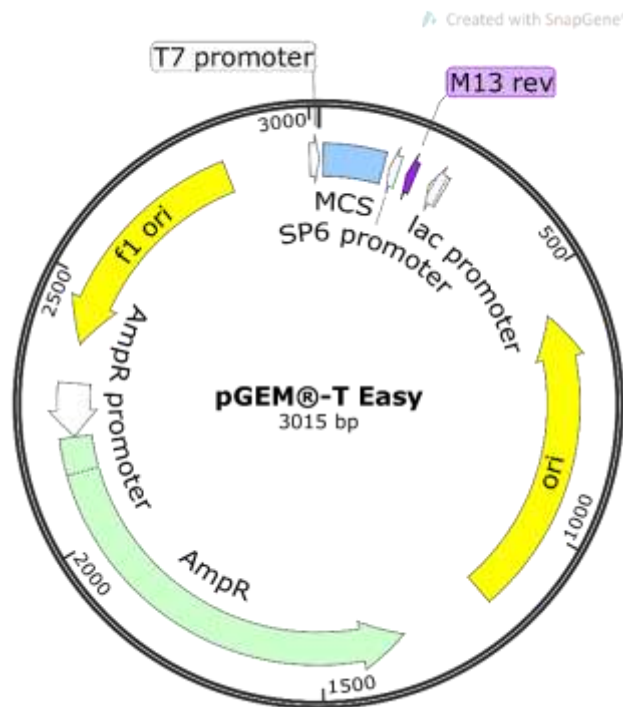
Medio LB:
10 g Tryptona, 5 g Extracto de Levadura, 5 g NaCl
Medio Terrific Broth:
12 g Triptona, 24g Extracto de Levadura, 4 mL Glicerol. Disolver y esterilizar. Enfriar y añadir 100 mL de 0.17 M KH ₂ PO ₄ , 0.72M K ₂ HPO ₄ estéril.

Para la preparación del medio solido se agregó 12.5 g de agar al medio. Se agregó antibiótico u otros suplementos en las siguientes concentraciones cuando

era requerido: 100 µg/mL Ampicilina, 30 µg/mL Cloranfenicol, 0.1-1mM, 50 µg/mL Kanamicina, 20 µg/mL X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido).

Vectores: Se utilizaron los siguientes plásmidos:

pGEM®-T Easy (Promega): Vector de clonación.



- ow Sitio de clonación múltiple (MCS) con secuencias de restricción simétricas.
- ow Secuencias de oligonucleotidos universales T7 y Sp6; pUC y M13 a ambos lados del MCS para secuenciación.
- ow Secuencia codificantes para el gen de la β-galactosidasa (LacZ) interrumpida por el MCS que permite la selección de clones positivos (colonias blancas) en contraposición a los negativos (colonias azules).

Anticuerpos: Los anticuerpos utilizados en los ensayos se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Anticuerpos utilizados

Anticuerpos 1 ^{ro}	Compartimento Celular identificado	Características	Dilución	Fuente
α -EEA1	Endosoma Tardío	IgG ₁ de Ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology
α -Vps26 (A-14)	---	IgG de Cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology sc-69126
α -58k FTCD	Aparato de Golgi	IgG ₁ de Ratón	1:200	Sigma-Aldrich G-2404
α -HA	---	IgG _{2a} de Ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology sc-7392
α -His-Probe (H-15)	---	IgG _{2a} Policlonal de conejo	1:3000	Santa Cruz Biotechnology sc-803
α -GST	---	IgG _{2b} de ratón	1:3000	ZYMED 13-6700
α -GFP	---	IgG _{2a} de Ratón		Santa Cruz Biotechnology sc-9996
α -Tubulina		IgG ₁ de Ratón	1:3000	Sigma-Aldrich T8328
Anticuerpos 2 ^{ros}		Especie que reconoce:		Fuente
α -IgG (H+L) HRP		Anti-Ratón	1:5000	ZYMED 81-6520
α -IgG (H+L) HRP		Anti-Conejo	1:5000	Santa Cruz Biotechnology sc-2012
α -IgG (H+L) HRP		Anti-Cabra	1:5000	Santa Cruz Biotechnology sc-2012
Alexa-488		Anti-cabra	1:6000	

VI.I.II.IV Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos para las amplificaciones por PCR punto final y PCR tiempo real, se adquirieron con Sigma Aldrich®. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra a continuación:

Tabla 4. Oligonucleótidos Sintéticos utilizados

Nombre	Secuencia 5'-3'	Pares de Bases	Sitios de Restricción (Subrayado)	Nucleótido (Nc) de inicio y termino
PCR Tiempo Final:				
Oligonucleotidos utilizados para la síntesis del cADN-cd				
RDE-ME	gcggcggatccacagtttctgtactatattg	32	<i>Bam</i> H I	466 – 485 Secuencia X62674.1
RDE-dT	gcggcggatcctttttttttttttttttt	29	<i>Bam</i> H I	---
Oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia codificante de <i>TcDSCR3-Like</i> (TcCLB.506941.210)				
Amplificación de Secuencia Antisentido:				
Arrest-AS	ccgctcgagatgcaggcaaaagtgcagaaccgc	34	<i>Xho</i> I	1 - 25
INGAPDHRT	cttcggcaggtttctgcag	19	---	1293 – 1275 (pTREXn)
Amplificación de secuencia completa de TcDSCR3-Like:				
GFP-TcVps26A S	gctctagaatgcaggcaaaagtgcag	26	<i>Xba</i> I	1 - 18
GFP-TcVps26A AS	ccaagcttcaactggcagagtac	23	<i>Hind</i> III	926 - 939
HA-TcVps26A S	ccaagcttctgtaccatcagatgtccagattaccgctat gcaggcaaaagtgcagaaccgc	64	<i>Hind</i> III	Secuencia de HA 1 - 25
HA-TcVps26A AS	ccgctcgagtcaactggcagagtac	25	<i>Xho</i> I	942 - 926
qRT-PCR:				
C9ArrS	gtccacaccagcgaccg	19	---	463 - 482
C9ArrAS	gacaatccagccgaaagag	20	---	638 - 618
Oligonucleótidos diseñados para sobre la secuencia codificante de <i>TcGAPDH</i> (TcCLB.506885.413)				
TcGAPDHS	ggatggaggatgttcttgcgg	24	---	1 - 22
GAPDHAS1	gtcactaaagggtccgtg	19	---	99 - 81

VI.II Métodos

Análisis *In silico*

El análisis de la secuencia de TcDSCR3-Like se llevó a cabo usando las bases de datos para información generales TritypDB (<http://tritypdb.org/tritypdb/>) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/71664206>). Los alineamientos y la identificación de secuencias se realizaron utilizando las herramientas de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). El análisis de proteína y anotaciones GO se llevó a cabo en UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>). Clustal Omega fue utilizado para el alineamiento de las secuencias de aminoácidos. El porcentaje de identidad fue calculado usando el programa SIAS (*Secuence Identites and Similarities*) (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>). Las estructuras secundarias fueron predichas usando el programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Los modelos tridimensionales fueron predichos en el software Phyre2, usando el modo Normal (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2>). Finalmente, el análisis de dominios se realizó en CDD/NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

El árbol filogeneico de las secuencias homologas de varias especies de DSCR3 y de los ortólogos en *T. cruzi*, fue inferido con el método Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987) usando MEGA7 (Kumar, Stecher et al. 2016), con *bootstrap* de 1000 replicas y usando el método de distancia-p para calcular las distancias evolutivas. El análisis involucró 14 secuencias de aminoácidos (Anexo 1). Se eliminaron todas

las posiciones que contenían *gaps* y datos faltantes. Hubo un total de 267 posiciones en el conjunto de datos final.

Extracción de ARN total

La extracción del ácido ribonucleico total (ARN) se llevó a cabo por medio del método de Trizol (TRI Reagent®, Sigma-Aldrich: T9424-200ML), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se extrajo el ARN total de epimastigotes silvestres, transfectados estables de pTREXnTcDSCR3-Like-AS, parásitos control pTREXn y pTREXnGFP para evaluar la expresión de la secuencia antisentido mediante PCR punto final. Por otro lado, se obtuvo el ARN total de epimastigotes, tripomastigotes, FI-3 y amastigotes para evaluar la expresión endógena del ARNm de *TcDSCR3-Like* en los diferentes estadios de *T. cruzi*. La pastilla de parásitos se re-suspendió con 3 volúmenes de trizol mezclando cuidadosamente hasta su homogenización. Posteriormente se agregó un quinto del volumen de cloroformo, se mezcló bien en el vórtex durante 15 segundos, se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente (TA) y se centrifugó a 12500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo y se agregó medio volumen de isopropanol, se mezcló y se incubó durante 10 minutos a TA. Después se centrifugó a 12500 rpm durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con un volumen de etanol al 75 % centrifugando a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se

dejó secar parcialmente durante 10 minutos a TA. Posteriormente la pastilla fue re-suspendida en 30-50 μ L agua libre de ADNsas y ARNsas.

La integridad del ARN total fue determinada por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa al 1.2 % (0.6 grs en 50 mL de H₂O- Dietilpirocarbonato [DEPC]) con tiocianato de guanidinio (23.6 gr / 200 μ L H₂O-DEPC). Para la electroforesis 5 μ g de ARN total (4 μ L) de cada una de las muestras se mezclaron volumen a volumen con formamida (Sigma F9037-100ML). Esta mezcla se calentó a 65°C durante 10 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo por 5 minutos. Las muestras se cargaron en el gel y los ARN totales fueron separados electroforéticamente a 60 Volts, 400 mA durante una hora en agitación constante en Amortiguador de corrida Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X en H₂O-DEPC utilizando un agitador magnético y una mosca. La integridad de los RNAs totales fue visualizada en el transiluminador MiniBis Pro DNR Bio-Imaging Systems.

Obtención de ADN de cadena simple (ADN-cs)

Para la síntesis del ADN-cs de cada una de las muestras se realizó utilizando el *kit SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen: 18080-051), siguiendo las indicaciones del fabricante. Primeramente los ARNs totales se trataron para eliminar la posible contaminación de ADN. Para ello, 2 μ g del ARN total (25 μ L) de cada una de las muestras se trataron con 2 μ L de ADNsa turbo (Ambion: AM1907), 2.5 μ L de Amortiguador de reacción 10X en un volumen final de reacción

de 30 μL , incubando a 37°C durante 30 minutos. Para detener la reacción e inactivar la enzima se añadió 2.5 μL de reactivo de inactivación, se mezcló bien y se incubó durante 5 minutos a TA y se mezcló ocasionalmente. Posteriormente se recuperó el ARN recuperando colocando 30 μL del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. El ARN fue precipitado con 1:10 de acetato de sodio (AcNa) 3 M y 2.5 volúmenes de etanol (EtOH) absoluto e incubando durante 30 minutos a -70°C . Luego se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y posteriormente se lavó con un volumen de EtOH al 75 %, centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C . Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar parcialmente durante 10 minutos a TA y luego se re-suspendió en 8 μL de H_2O -DEPC. Una vez eliminado el ADN contaminante la síntesis del ADN-cs se llevó a cabo mezclando lo siguiente: 8 μL de ARN, 1 μL de Amortiguador de alineamiento y 1 μL de oligo-dT, se mezclaron bien e incubaron a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se colocaron las muestras en hielo al menos durante un minuto. Se añadió 10 μL de la mezcla de síntesis de ADN-cs (Amortiguador RT 10X, MgCl_2 25 mM, 0.1 M ditioneitol (DTT), *RNAseOUT*, *SuperScript III RT*) y se incubó a 50°C durante 50 minutos para llevar a cabo la síntesis del ADN-cs. Posteriormente se incubó a 85°C por 5 minutos para terminar la reacción. Se removió el ARN del híbrido (ARN / ADN) añadiendo 1 μL de ARNasa H e incubando a 37°C durante 20 minutos. A partir de este producto se llevó a cabo la síntesis del ADN de cadena doble (ADN-cd).

Síntesis del ADN de cadena doble (ADN-cd)

Para la síntesis del ADN-cd se tomó 2 μL del ADN-cs y se realizó la siguiente mezcla de reacción: 5 μL de Amortiguador PCR de alta fidelidad 10X, 2 μL de sulfato de magnesio (MgSO_4) 50mM, 8 μL de deoxinucleótidos (dNTPs) 1.25 mM, 1 μL de los oligos RDE-dT y RDE-ME 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1 U de Tap Polimerasa (*Platinum taq DNA polymerase High fidelity*, Invitrogen: 11304-011) y se llevó a un volumen final de 50 μL con agua libre de ADN / ARNasas. La reacción se incubó en el termociclador (GeneAmp PCR system 2400, Applied Biosystems): 1 ciclo de 94°C / 5 minutos, 35 ciclos a 94°C / 1 minuto, 60°C / 1 minuto y 72°C / 1 minuto, y 1 ciclo final a 72°C / 5 minutos. Posteriormente se verificó la obtención del amplificado en un gel de agarosa al 1 % en TBE 1X. El ADN-cd de cada una de las muestras se guardó a -20°C para su posterior uso.

Amplificación de la secuencia antisentido *TcDSCR3-Like* mediante PCR punto final

Se llevó a cabo la amplificación de la secuencia antisentido a partir del ADN-cd de epimastigotes silvestres y transfectados estables: pTREXnTcDSCR3-Like-AS, MOCK (pTREXn) y pTREXnGFP en un volumen de reacción final de 50 μL (2 μL MgSO_4 , 8 μL dNTPS 1.25 mM, 5 μL de Amortiguador Taq, 0.2 μL de Taq Polimerasa Recombinante (*Taq DNA Polymerase, recombinant*, Invitrogen: 11615-036) y 1 μL de los oligonucleótidos sentido y antisentido descritos en la tabla 4. Las

reacciones se llevaron a cabo durante 1 ciclo de 94°C / 5 minutos, 30 ciclos a 94°C / 30 segundos, 60°C / 30 segundos y 68°C / 30 segundos, y 1 ciclo final a 68°C / 7 minutos. La amplificación de la secuencia antisentido se verificó en un gel de agarosa al 1 % TBE 1X, visualizado en el transiluminador MiniBis Pro DNR Bio-Imaging Systems.

PCR tiempo Real

Se evaluó la expresión del ARNm endógeno de *TcDSCR3-Like* en cada uno de los estadios de *T. cruzi* mediante PCR tiempo real. Se utilizó el kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems: 4309155) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación del ARNm endógeno de *TcDSCR3-Like* se describen en la tabla 4. Se mezcló en un volumen final de 10 µL: 5 µL de la solución Master Mix SYBER Green, 0.5 µL de cada uno de los oligonucleótidos y 4 µL de ADN-ds de cada uno de las muestras (5 ng Previamente estandarizado). Las condiciones de PCR fueron: 40 ciclos, 5 minutos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 60°C y 2 minutos a 68°C para la extensión. Como controles se utilizaron parásitos MOCK control. Como control endógeno del qPCR se utilizó a la secuencia nucleotídica de *TcGAPDH* (TcCLB.506885.413), los oligonucleótidos utilizados para su amplificación se describen en la tabla 4. El cálculo de la expresión relativa se realizó mediante el método comparativo de Ct.

$$\Delta Ct = Ct \text{ Gen de interés} - Ct \text{ Gen endógeno}$$
$$\Delta\Delta Ct = Ct \text{ Muestra de Interés} - Ct \text{ Calibrador}$$

Los resultados obtenidos se analizaron con la fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$:

2: Eficiencia máxima de la PCR

Ct: Ciclo donde la cantidad de ADN es detectable y sobrepasa el umbral de fluorescencia basal.

Para determinar la localización de TcDSCR3-Like en los estadios de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* se utilizaron dos estrategias con la finalidad de buscar el mejor resultado. Por un lado, se fusionó en el extremo 3' a la secuencia nucleotídica completa que codifica para *TcDSCR3-Like* con la GFP en el vector de expresión para *T. cruzi* pTREXnGFP. Por el otro lado, se unió a la secuencia nucleotídica de la bandera de hemaglutinina (HA) en el extremo 5' de la secuencia nucleotídica de *TcDSCR3-Like*, obteniéndose la secuencia *HA-TcDSCR3-Like*, esta secuencia fue clonada en el vector pTREXn. Las construcciones obtenidas fueron transfectados en epimastigotes silvestres. Para realizar lo anterior procedimos como sigue:

Amplificación de la secuencia completa de *TcDSCR3-Like* a partir del ADN-cd de FI-3 mediante PCR punto final

La secuencia completa de *TcDSCR3-Like* se amplificó a partir del ADN-cd de la FI-3 en un volumen de reacción final de 50 μ L (2 μ L MgSO₄, 8 μ L dNTPS 1.25

mM, 5 μ L de Amortiguador Taq, 0.5 μ L de Taq. Pol. Platinum y 1 μ L de los oligonucleótidos sentido y antisentido descritos en la tabla 4 (Oligonucleótidos para GFP y HA). La reacción se llevó a cabo durante 1 ciclo de 94°C / 5 minutos, 30 ciclos a 94°C / 15 segundos, 80°C / 15 segundos y 68°C / 1:00 minuto y 1 ciclo final a 68°C / 5 minutos. Posteriormente se verificó en un gel de agarosa al 1 % TBE 1X la integridad del fragmento amplificado en el transiluminador MiniBis Pro DNR Bio-Imaging Systems.

Purificación de los fragmentos amplificados por PCR punto final

Cada uno de los fragmentos amplificados por PCR se purificó utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean up siguiendo las especificaciones del fabricante. Los 50 μ L de reacción se mezclaron con 50 μ L de Amortiguador NTI, se mezcló bien y se colocó en una columna para unir el ADN a la sílica de la membrana. Se centrifugó a 13000 rpm, 1 minuto a TA. Se descartó el sobrenadante. Se lavó dos veces la membrana de sílica de la columna con 700 μ L de Amortiguador NT3 centrifugando a 13000 rpm durante 1 minuto a TA y se desechó el sobrenadante. Se secó la membrana de sílica de la columna centrifugando a 13000 rpm, 1 minuto a TA. La columna se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo y se eluyó el ADN colocando 30-50 μ L de Amortiguador NE en el centro de la membrana e incubando al menos 1 minuto a TA y luego se centrifugó a 13000 rpm durante un minuto a TA.

Se tomó 1/10 del eluido para correr en un gel de agarosa al 1 % TBE 1X y visualizando en el transiluminador MiniBis Pro DNR Bio-Imaging Systems.

Los fragmentos purificados se insertaron en el vector de clonación pGEM®-T Easy (Promega: A1360) y posteriormente se sub-clonaron en el vector de expresión para *T. cruzi* pTREXnGFP como a continuación se describe.

Clonación en pGEM®-T Easy

Las clonaciones en pGEM®-T Easy se realizaron siguiendo las especificaciones del fabricante (Promega: A1360). Primeramente se procedió a colocar desoxiadenosina trifosfato (dATP's) en los extremos de los fragmentos purificados. Para ello, 10 µL del ADN purificado se colocó en la siguiente reacción: 0.8 µL MgCl₂ 50 mM, 3.2 µL dATPS 1.25 mM, 2 µL de Amortiguador PCR-MgCl₂ 10X, 0.2 µL de Taq Polimerasa Recombinante. En un volumen de reacción de 20 µL. La reacción se incubó durante 30 minutos a 70°C en el termociclador (Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler, Applied Biosystem: 4375305). Posteriormente se procedió a realizar la reacción de ligación mezclando en un volumen final de 10 µL: 3 µL de ADN (obtenido en la reacción anterior), 1 µL de ADN de pGEM®-T Easy, 5 µL de Amortiguador de ligación rápida y 1 µL de T4 Ligasa. La mezcla se incubó en el termociclador a 4°C durante toda la noche.

Transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5α por choque térmico

10 µL de la reacción de ligación se colocó en tubo de vidrio previamente enfriado, se añadió 50 µL de bacterias calcio (Ca²⁺) competentes *E. coli* DH5α (previamente descongeladas durante 5 minutos en hielo) y se incubaron por 20 minutos en hielo. Posteriormente se les dio un choque térmico a 42°C por exactamente 1:30 minutos e inmediatamente después se colocaron en hielo por 2-5 minutos. Luego se adicionó 1 mL de medio de cultivo LB y se dejaron crecer las bacterias por 1 hora a 37°C en agitación a 250 rpm. Finalmente se tomaron 300 µL del cultivo y se sembraron en placas con agar LB más el agente de selección (Ampicilina 100 mg/mL) y se incubaron toda la noche a 37°C.

PCR de colonia

Para evaluar la correcta clonación de los fragmentos de *TcDSCR3-Like* y *HA-TcDSCR3-Like* en pGEM®-T Easy, se realizó la amplificación de la secuencia nucleotídica de *TcDSCR3-Like* a partir de las colonias blancas crecidas en el medio agar LB-Ampicilina (100 mg/mL) por PCR de colonia. Cada colonia se colocó en un volumen final de 15 µL de reacción: Amortiguador PCR-MgCl₂ 1.5 µL, MgCl₂ 0.5 µL, dNTPs 1.8 µL, Oligonucleótido sentido y antisentido 1 µL (Oligos para clonar con HA y GFP, descritos en la tabla 4), Taq polimerasa recombinante 0.1 µL (*Taq DNA Polymerase, recombinant*, Invitrogen: 11615-036) y agua inyectable c.b.p. 15 µL. La reacción se incubó en el termociclador con los siguientes ciclos: 1 ciclo de 95° / 5

minutos; seguido de 35 ciclos de 95° C / 15 segundos, 55° C / 15 segundos y 72° C / 1 minuto; y finalmente 1 ciclo de 72° C / 5 minutos. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1 % TBE 0.5X para corroborar la amplificación de la secuencia nucleotídica completa de *TcDSCR3-Like* (banda de ~942 pb) mediante la visualización en el transiluminador DNR minibispro Bio-Imaging Systems.

Obtención de ADN de plásmido por Lisis Alcalina

La colonia bacteriana positiva al PCR de colonia se colocó en un cultivo de 20 mL de medio LB suplementado con 20 µL de ampicilina y se incubó toda la noche a 37° C a 250 rpm. Después de 16 horas de crecimiento se recuperaron las bacterias centrifugando a 8500 rpm por 10 min a TA, se descartó el sobrenadante y la pastilla se homogenizó en 200 µL en solución 1 para lisis alcalina (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) mezclando en el vórtex. Luego se adicionó 400 µL de solución de lisis 2 (hidróxido de sodio (NaOH) 0.2 N, dodecilsulfato sódico (SDS) 1%, H₂O) que se prepara al instante, se mezcló 5 veces por inversión y se adicionó inmediatamente 300 µL de solución de lisis 3 (1/10 de acetato de potasio (CH₃CO₂K) 3 M, 11.5 mL de ácido acético glacial, 28.5 mL de H₂O). La muestra se mezcló 5 veces por inversión y se dejó 5 minutos a TA y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó 3 µL de ARNsa, se incubó durante 2 hrs a 37° C. Luego se adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo isoamílico 25:24:1 y se mezcló en vórtex, se centrifugó a 12000

rpm por 10 min a TA, se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo, se adicionó 600 µL de isopropanol y se incubó 10 min a TA. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante, se adicionó a la pastilla 500 µL de EtOH al 70 % y se mezcló en vórtex, se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla para luego re-suspenderla en agua des-ionizada o TE. La integridad del ADN de plásmido obtenido se evaluó mediante la visualización en el transiluminador DNR minibispro Bio-Imaging Systems, en un gel de agarosa al 1 % TBE 1X.

Liberación de las secuencias completas a partir de pGEM®-T Easy y linearización del vector de expresión para *T. cruzi* pTREXnGFP

Se realizaron clonaciones sitio dirigidas en el vector de expresión pTREXnGFP utilizando los sitios de restricción para las enzimas *Xba* I / *Hind* III en el caso de la fusión con GFP y las enzimas *Hind* III / *Xho* I para la inserción de *HA-TcDSCR3-Like*. Primeramente liberamos las secuencias completas a partir del ADN de plásmido pGEM®-TEasy-TcDSCR3-Like y pGEM®-TEasy-HA-TcDSCR3-Like en una reacción de doble digestión en un volumen final de 20 µL para verificar la inserción de las secuencias en pGEM®-T Easy. Una vez verificado la inserción se procedió a realizar las maxi digestiones, en un volumen final de 50 µL. El ADN de plásmido (1µg) se digirió con 1 µL de las enzimas de restricción en presencia de 5 µL del Amortiguador 10X de enzima de restricción y la cantidad necesaria de agua

para ajustar a 50 μ L volumen final. La reacción se incubó durante dos horas a 37°C. La linearización del vector de expresión pTREXnGFP se realizó siguiendo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Purificación de los fragmentos liberados y el vector pTREXnGFP linearizado en gel de agarosa 1 % / TBE 0.5 %

Después de digerir el ADN de plásmido, se tomó una alícuota (1/10) de la reacción y se evaluó la integridad del ADN digerido en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5 % a 100 Vols por 25 minutos. Una vez corroborada las digestiones el resto de la reacción de digestión se corrió en un gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5 % a 100 Vols por 25 minutos. Posteriormente las bandas de interés (Insertos: TcDSCR3-Like: 942 pb, HA-TcDSCR3-Like: 990 pb y vector: pTREXnGFP lineal: 7 kb ó pTREXn: ~6.3 pares de bases (pb)) se cortaron del gel, se colocaron en un tubo eppendorf y se procedió a la purificación del ADN utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean up siguiendo las indicaciones del fabricante. Para esto, cada una de las fragmentos de agarosa se pesaron y por cada 100 mg de agarosa se agregó 200 μ L de Amortiguador NT1 y se incubó de 5 a 10 minutos a 50°C en el termoblot (Echotherm: Torrey Pines Scientific) hasta disolver la agarosa. Luego la agarosa disuelta se colocó en una columna y se centrifugo a 13000 rpm durante 1 minuto a TA. Se decantó y se lavó dos veces la membrana con 700 μ L de Amortiguador NT3, centrifugando a 13000 rpm por 1 min a TA. Posteriormente se precedió a eluir el

ADN, colocando de 15 a 30 μL de Amortiguador NE ó agua inyectable en el centro de la membrana y se incubó 1 minuto a TA. Finalmente se centrifugo a 13000 rpm a TA por 1 minuto. Los fragmentos purificados recuperados se corrieron en un gel de agarosa al 1 % TBE 1X, se tiñeron con bromuro de etidio y se revisaron en el transiluminador, la cuantificación del ADN obtenido se realizó en el equipo NanoDrop™ One technology: Thermo Scientific™.

Reacciones de Ligación

Una vez purificados los ADN de los insertos y el vector, se colocaron ambos ADNs en una reacción de ligación en un volumen final de 10 μL como sigue: 1 μL de enzima T4 ADN Ligasa (Promega: M1804), 1 μL de Amortiguador de T4 ADN Ligasa y 8 μL del ADN inserto-vector (Precipitado con 1/10 de AcNa 3M y EtOH Absoluto). Las reacciones se incubaran toda la noche a 4°C en el termociclador. La proporción inserto vector fue calculada de acuerdo a la formula descrita en Promega Protocols & Applications Guide (1991), teniendo como base la adición de 100 ng de vector en la reacción de ligación.

$$\frac{(ng\ Vector * Kb\ del\ Inserto)}{(Kb\ Vector)} * (Inserto) / Vector = ng\ del\ Inserto$$

Reacciones de digestión

Con el objetivo de corroborar la inserción de las secuencias nucleotídicas de *TcDSCR3-Like* y *HA-TcVps26-Like* en el vector de expresión para *T. cruzi* pTREXnGFP, se colocaron reacciones de doble digestión utilizando las enzimas de restricción *Xba* I / *Hind* III y *Hind* III / *Xho* I, respectivamente. Se colocaron en los tubos eppendorf de 600 μ L: 1 μ g de ADN de cada una de las construcciones: pTREXnTcVps26-Like-GFP y pTREXn-HA-TcDSCR3-Like, 1 unidad de las enzimas de restricción (1 μ L), 2.5 μ L de Amortiguador de enzima de restricción 10X y la cantidad necesaria de agua inyectable para un volumen final de 25 μ L. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 horas. La liberación del inserto se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 1 %-TBE 0.5X y la visualización de las bandas en el transiluminador DNR minibispro Bio-Imaging Systems.

Secuenciación del ADN de las construcciones pTREXnTcDSCR3-Like-GFP y pTREXn-HA-TcDSCR3-Like

Para corroborar la exitosa clonación del fragmento de 942 pb de la secuencia nucleotídica de *TcDSCR3-Like* unida a las etiquetas GFP o HA, primeramente se procedió a extraer ADN mediante la utilización del kit QIAprep® Spin Miniprep 250 (QIAGEN: 27106). Se siguió el protocolo establecido por el fabricante, en donde todas las centrifugaciones se realizaron a 13000 rpm a TA. Para ello se colocó un cultivo de 5 mL suplementado con 5 μ L de Ampicilina (100

mg/mL) con una colonia de bacterias DH5 α transformadas con cada una de las construcciones. El cultivo se incubó a 30°C durante 16 horas a 250 rpm. Al día siguiente se recuperaron las bacterias centrifugando a 8500 rpm durante 10 minutos a TA. Se decantó y la pastilla se dejó escurrir bien. Posteriormente la pastilla se homogenizó con 250 μ L de Amortiguador P1, se mezcló bien y se mezcló en vórtex para disolver bien la pastilla. Luego se añadió 250 μ L de Amortiguador P2 y se mezcló por inversión de 5-6 veces, posteriormente se añadió 350 μ L de amortiguador N3 a la muestra y se mezcló por inversión de 5-6 veces. Después de centrifugarse la muestra durante 10 minutos a 13000 rpm a TA, el sobrenadante se pasó a una de las columnas del *kit* y se centrifugó durante un minuto. Se descartó el sobrenadante y la columna se lavó con 500 μ L de Amortiguador PB y se centrifugó 1 minuto. Posteriormente la columna se lavó con 700 μ L de Amortiguador PE centrifugando un minuto y se desechó el sobrenadante. Se repitió el proceso de centrifugación para quitar las trazas de Amortiguador de la columna. Posteriormente la columna se pasó a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregó en el centro de la membrana 30-50 μ L de agua des-ionizada, se incubó por un minuto a TA y finalmente se centrifugó un minuto para obtener el ADN en el eluido. El ADN fue cuantificado en el Nanodrop y una alícuota se tiñó con BrEt después de ser corrida en un gel de agarosa al 1 % TBE 0.5X. Los ADNs se enviaron secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se enviaron 200 ng/ μ L de ADN plasmidico y 10 mM de oligonucleótidos sentido y antisentido en

agua des-ionizada. Los resultados se analizaron utilizando los programas Chromas Lite y Custal Omega.

Transfección de epimastigotes silvestres con la construcción pTREXnTcDSCR3-Like-GFP y pTREXn-HA-TcDSCR3-Like

Epimastigotes silvestres se transfectaron por electroporación con 100 µg de ADN de la construcción pTREXnTcDSCR3-Like-GFP y pTREXn-HA-TcDSCR3-Like. Para esto se utilizaron 3×10^8 epimastigotes silvestres cepa CL Brener los cuales se lavaron con 5 mL de medio LIT sin complementar. La pastilla se re-suspendió en 350 µL de medio LIT sin complementar por cada una de las muestras. Posteriormente se colocaron en celdas BTX (2 mm, Modelo No. 620) previamente enfriadas en hielo y se añadió 40 µL del ADN de plásmido (100 µg de ADN previamente precipitado con 1/10 de AcNa 3 M y 2.5 volúmenes de EtOH absoluto), se dejaron incubando durante 5 minutos en hielo y en seguida se electroporaron los parásitos a 300 Vols, 1 pulso durante 12 milisegundos. Se dejaron reposar durante 10 minutos a TA y se pasaron a 5 mL de medio LIT complementado con 10 % de SFB, 0.5 % de penicilina-estreptomicina 5 mg/mL y 1/200 de hemina 5 mg/mL en tubos falcón de 15 mL y se incubaron a 28°C. Para llevar a cabo la selección de los parásitos transfectados, a las 24 hrs después de la transfección se les agregó 500 µg/mL de geneticina (G418) y se dejaron con la droga durante 7 días incubados a 28°C. Posteriormente se les quitó la droga durante 2 días y se realizó una segunda

selección con 300 µg/mL de G418 incubando a los parásitos durante 5 días. A continuación se llevó a cabo la expansión de los parásitos transfectantes estables en la cantidad necesaria de medio LIT complementado para llevar a cabo los experimentos posteriores.

Ensayo de Inmunofluorescencia

Los epimastigotes (1×10^6) se cosecharon y se lavaron con PBS 1X centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos a TA. Posteriormente se fijaron con 1 mL de 4 % de paraformaldehído (PFA) en PBS 1X y se repitió el proceso de lavado. 1×10^5 parásitos / 100 µL se goteó sobre portaobjetos tratados con poly-L-Lisina (*Silane-Prep slides* SIGMA DIAGNOSTICS: S4651) y se incubaron los portaobjetos en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche, para permitir la unión de los parásitos al portaobjetos. Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos. Se permeabilizaron los parásitos con 100 µL / círculo de Tritón X-100 al 0.5 % en PBS 1X estéril en cámara húmeda a TA durante 15 minutos y se lavó el portaobjetos 3 veces con PBS 1X por 5 minutos. Se bloqueó la muestra con BSA (*Research Organics*: 1328A) al 2 % en PBS 1X estéril (solución de bloqueo) a 37° C por 1 hora y se lavó con PBS 1X. Se agregó 100 µL de una dilución del anticuerpo primario: anti-Vps26 (1:200) anti-HA (1:100), anti-EEA-1 (1:200) diluido en solución de bloqueo a 4° C durante toda la noche en cámara húmeda. Se lavó la muestra 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos, se incubó con 100 µL de una

dilución 1:600 del anticuerpo secundario: Alexa-488 anti-cabra (Vps26), Alexa-488 anti-ratón ó Alexa-546 anti ratón (HA), Alexa-546 anti-ratón (EEA-1), toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron las muestras tres veces con PBS 1X. Se tiñó el núcleo y cinetoplasto con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) con una solución 1:10,000 (5mg/mL) durante 10 minutos a TA. Posteriormente se lavó tres veces con PBS 1X y una vez con agua MiliQ durante 5 minutos. Finalmente se montaron las laminillas con *vectashield® Mounting Medium* (Vector Laboratories: H-1000) y se sellaron con esmalte. Las muestras fueron analizadas en el microscopio de epifluorescencia Olympus modelo BX41 (Epifluorescencia) ó en el microscopio confocal Leica TCS SPE. Para el caso de los parásitos que expresan a TcDSCR3-Like-GFP, se siguió la misma metodología pero estos solo fueron fijados, teñido su núcleo y cinetoplasto y montados como se indica anteriormente.

Ensayo de Endocitosis

Los epimastigotes (1×10^7) fueron centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a TA. Luego los parásitos se decantaron y lavaron dos veces con PBS 1X, repitiendo el proceso de centrifugación. La pastilla se re-suspendió en 1 mL de PBS 1X a TA. Se incubó durante 15 minutos a 28°C y posteriormente se adicionó transferrina conjugada con Alexa 594 a una concentración final de 20 µg/mL y se mezcló e incubó por 30 minutos a 28°C. Posteriormente se recuperaron los parásitos centrifugando como se describe anteriormente. Se lavó con 1 mL de PBS

1X y se centrifugó. Luego se procedió a fijar a los parásitos, por lo que la pastilla se re-suspendió en 500 μ L de PFA al 4 % por 15 minutos en hielo. Finalmente los parásitos fueron tratados para inmunofluorescencia, como se indica anteriormente.

En el caso de los controles, los epimastigotes fueron incubados con el marcador de endocitosis pero todo el procedimiento se realizó en frío a 4°C.

Infecciones primarias de fibroblastos 3T3/NIH con parásitos transfectantes estables

Para evaluar la capacidad de infección de los parásitos transfectantes estables pTREXn-HA-TcDSCR3-Like y control MOCK, monocapas de fibroblastos 3T3/NIH fueron crecidas hasta un 60 % de confluencia en cajas Corning de 25 cm² en medio DMEM alto en glucosa complementado con 10 % SFB y 0.5 % de solución penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL en solución salina de NaCl al 0.85 %), incubándolas a 37 °C en atmosfera del 5 % de CO₂. Para llevar a cabo la infección, se utilizó una relación 1:10 célula / parásitos. Para ello, a los parásitos crecidos en medio LIT (como se describe anteriormente, y a los cuales un día antes de la infección se les agregó 300 mg/mL de G418) fueron contados en una cámara de Neubauer. Los parásitos fueron recuperados del medio de cultivo centrifugándolos a 3000 rpm durante 10 minutos a TA, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 5 mL de medio DMEM sin complementar centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos a TA. Posteriormente la pastilla fue re-suspendida en 1 mL de medio DMEM al 2 % de SFB y se agregó al sobrenadante de las células a las cuales

previamente se les cambio el medio DMEM al 10 % de SFB por medio DMEM al 2 % de SFB. Las infecciones fueron incubadas a 37 °C en atmosfera de CO₂ al 5 % durante 48 horas. Una vez transcurridas las 48 horas, las monocapas fueron lavadas diariamente cambiando el medio de cultivo. El conteo del número de células infectadas se inició al quinto post-infección y se monitorio durante toda la cinética de infección.

Evaluación de la eficiencia de diferenciación extracelular y ensayo de invasión de los parásitos transfectantes estables

Monocapas de fibroblastos 3T3/NIH sembradas hasta un 60 % de confluencia sobre cubreobjetos de 13 mm dentro de cajas Corning de 65 cm² en medio DMEM alto en glucosa complementado con 10 % SFB y 0.5 % de solución penicilina-estreptomina (10,000 U/mL en solución salina de NaCl al 0.85 %) e incubadas a 37 °C en atmosfera del 5 % de CO₂, fueron infectados siguiendo una relación 1:10 célula / parásitos con epimastigotes transfectantes estables que expresan ectópicamente a HA-TcDSCR3-Like o pTREN como control. Para ello, las monocapas al 60 % de confluencia fueron cambiadas a medio DMEM alto en glucosa suplementado con el 2 % de SFB y 0.5 % de solución penicilina-estreptomina (10,000 U/mL en solución salina de NaCl al 0.85%). Los parásitos crecidos en medio LIT (como se describe anteriormente) fueron contados en la cámara de Neubauer (1X10⁷ parásitos) y centrifugados a 3000 rpm durante 10

minutos a TA, para quitar el medio de cultivo. Posteriormente, fueron lavados con 5 mL de medio DMEM sin complementar centrifugándolos a 3000 rpm durante 10 minutos a TA. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue re-suspendida en 1 mL de medio DMEM complementado con el 2 % de SFB y 0.5 % de solución penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL en solución salina de NaCl al 0.85 %), y fueron agregados al sobrenadante de las monocapas al 60 % de confluencia. Las infecciones se incubaron durante 2 o 48 horas a 37 °C en atmósfera del 5 % de CO₂. Transcurridas las 48 horas se contó el porcentaje de transformación de los parásitos en el sobrenadante contando el número de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes presentes en el sobrenadante. Para evaluar el proceso de invasión de los parásitos sobre los fibroblastos 3T3/NIH, las células adheridas en los cubreobjetos fueron lavadas con PBS 1X para quitar los parásitos unidos a la monocapa, fijadas con PFA al 4 % durante 20 minutos a TA. Se lavó la monocapa con PBS 1X frío y se tiñó el núcleo de los parásitos intra y extracelulares así como el núcleo de las células con 100 µL de una dilución 1:10000 de DAPI (5mg/mL) durante cinco minutos. Se lavaron las muestras con PBS 1X frío, se escurrieron bien y los cubreobjetos se colocaron sobre una gota de *Vecta Shield* encima de un portaobjetos y sellados con esmalte. La tinción de los parásitos así como la tinción de los núcleos de los parásitos y células fue evaluada en el microscopio de fluorescencia Olympus modelo BX41TF, la infección se revisó en el campo claro y

con el láser ultravioleta para corroborar que la cuantificación de los parásitos intracelulares fuera la correcta.

ETP para Western Blot (WB)

2 x 10⁸ epimastigotes transfectados establemente con las diferentes construcciones obtenidas (pTREXn-HA-TcDSCR3-Like, pTREXn-TcDSCR3-Like-GFP, pTREXn y pTREXnGFP) se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos a TA. Luego las pastillas se lavaron con 10 mL de PBS pH 7.2 a TA. Posteriormente se homogenizaron en 500 µL de amortiguador de lisis de radioinmunoprecipitación (RIPA: Tris-HCl 50 mM pH 7.8, NaCl 150 mM, Nonidet 40 [Np40] 1 %, Deoxicolato de sodio 0.5 % y SDS 0.1 %) y 50µL (5X) de la mezcla de inhibidores de proteasas Complete® (ROCHE: 11697498001). Se incubaron en agitación durante 30 minutos sobre hielo. Luego se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó por el método ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific: 23225). La integridad de los ETP se verificó en geles de SDS-PAGE al 12 % teñidos con azul de Coomassie. Luego fueron usados para llevar a cabo los ensayos de WB.

SDS PAGE

Se realizó en cámaras mini-protean III Cell (Bio-Rad: 165-3301) utilizando un gel separador al 12 % y un concentrador al 5 % y utilizando amortiguador de

carga SDS 2X (Tris 100 mM pH 8, SDS 4 %, Glicerol 20 %, Azul de bromofenol 0.2 %, DTT 200 mM). Se utilizó como marcador de peso molecular el Standard Precision Plus (BIO-RAD: 161-0374). Todas las soluciones y los geles se prepararon de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook (Sambrook and Russell 2001).

Western Blot

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook (Sambrook y Rusell 2001). Una vez separadas las muestras en geles SDS-PAGE, éstos se electro-transferieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad: 162-0115) primeramente a 80 vols durante 30 minutos y luego a 100 vols durante una hora. Terminado este tiempo se verificó la eficiencia de 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 transferencia, la membrana fue bloqueada con leche Svelty al 6 % en PBS 1X (solución de bloqueo) durante dos horas. Posteriormente se descartó la solución de bloqueo y la membrana se incubó con el anticuerpo primario: anti-Vps26 (1:100), anti-HA (1:100), anti-58k FTCD (1:200), preparados en solución de bloqueo e incubados durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados a la membrana con 5 mL de PBS 1X, 5 mL de PBS 1X - Tween-20 al 0.05 % y 5 mL de PBS 1X por 10 minutos cada uno. Luego se incubó la membrana con el

anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) HRP anti-cabra (Vps26) y anti-ratón (HA y 58k FTCD) usado a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo durante dos horas. Posteriormente se realizaron 3 lavados a la membrana con 5 mL de PBS 1X, 5 mL de PBS 1X - Tween-20 0.05 % y 5 mL de PBS 1X por 10 minutos cada uno. Finalmente la membrana se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo de quimioluminiscencia *Super signal west pico o femto* (Thermo scientific: 34080) como sustrato de la peroxidasa en el equipo para revelado ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad: 1708280).

EPT para co-inmunoprecipitación:

Se cosecharon 2×10^8 epimastigotes (20 mL de cultivo LIT) transfectados establemente con las diferentes construcciones obtenidas (pTREXn-HA-TcDSCR3-Like y pTREXn) por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos a TA. Se lavaron las pastillas con 10 mL de PBS pH 7.2 a TA. Posteriormente se homogenizaron en 500 μ L de amortiguador de lisis (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 5 % glicerol) y 50 μ L (5X) de la mezcla de inhibidores de proteasas Complete® (ROCHE: 11697498001). Se incubaron durante 30 minutos a 4°C en agitación. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó por el método BCA (Thermo Scientific: 23225). La integridad de los ETP se verificó en geles de SDS-PAGE al 12 % teñidos con azul de Coomassie. Posteriormente los ETP fueron usados para realizar los ensayos posteriores.

Ensayos de co-inmunoprecipitación

Preparación de la resina:

Estos ensayos se realizaron utilizando el kit comercial *Pierce Co-Immunoprecipitation (CO-IP)*, el cual permite la unión covalente del anticuerpo a una resina con aminas reactivas. Estos son estabilizados por el catalizador ciano-borohidrido de sodio (NaCNBH_3) el cual los reduce para formar enlaces peptídicos secundarios irreversibles, en una reacción de aminación reductiva (Thermo Scientific™: 26149). Se siguieron las instrucciones establecidas por el fabricante, todas las centrifugaciones se realizaron a 1000 g durante 1 minuto a 4°C. Inicialmente se llevó a cabo la inmovilización del anticuerpo anti-HA (Santa cruz: F-7 SC-7392) a la resina (*AminoLink Plus Coupling Resin*). Para ello se tomó 50 µL de la suspensión de la resina y se coló en una columna. Se centrifugo y se desechó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con amortiguador de acoplamiento 1X (NaCl 150 mM, Na_2HPO_4 monobásico 10 mM, pH 7.2) centrifugando y desechando el sobrenadante. Luego se quitó el exceso de la columna y se colocó el tapón inferior. Se agregó a la resina 150 µL de amortiguador de acoplamiento y 50 µL del anticuerpo anti-HA, se añadió en campana de extracción 3 µL de la solución de ciano-borohidrido de sodio. Se colocó el tapón superior y se incubo durante 2 horas a TA en el mezclador HulaMixer® (Applied Biosystem: 15920D). Posteriormente se quitó el tapón inferior y la columna se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL. Se centrifugó y el sobrenadante se guardó para analizarlo posteriormente

mediante WB (Anticuerpo No Unido). Se retiró el tapón superior y se lavó dos veces con 200 μ L de Amortiguador de acoplamiento 1X centrifugando y desechando el sobrenadante. Se agregó a la columna 200 μ L de Amortiguador de *quenching*, se centrifugó y desechó el sobrenadante. Luego se quitó el exceso de amortiguador y se colocó el tapón inferior, se añadió 200 μ L de amortiguador de *quenching* a la resina y en campana de extracción se agregó 3 μ L de la solución de cianoborohidrido de sodio, se colocó el tapón superior y se incubó 15 minutos en el Hulamixer mezclando de extremo a extremo. Posteriormente se quitó el tapón inferior, se centrifugó y desechó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con amortiguador de acoplamiento 1X centrifugando en cada lavado. Luego se realizaron seis lavados a la resina con 150 μ L Amortiguador de lavado, centrifugando y desechando el sobrenadante. Posteriormente se procedió al ensayo de CO-IP. De manera paralela al acoplamiento de las columnas para las muestras, 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 (anti-Glutation S-transferasa [GST] de ZYMED, IgG_{2b} producido en ratón) y la columna conteniendo resina sin anticuerpo. De modo, que se prepararon 1 columna problema (para HA, TcDSCR3-Like) y 2 columnas de controles negativos correspondientes a anticuerpo no relacionado (GST) y resina sola.

Pre-aclaramiento de los ETP

Se llevó a cabo el pre-aclaramiento de los extractos totales siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. En una columna se colocó 80 μ L de resina de agarosa control por cada 1 mg de lisado. Se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto a 4 °C para quitar el amortiguador de almacenamiento. Se agregó a la columna 100 μ L de amortiguador de acoplamiento 1X, se centrifugó y descartó el sobrenadante. Se colocó el tapón inferior de la columna, se agregó 500 μ L de ETP y se incubó durante 2 horas a 4 °C mezclando de extremo a extremo en un agitador. Finalmente la columna se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugo a 1000 g por un minuto a 4°C. Se desechó la columna y el sobrenadante se guardó a 4°C hasta realizar el ensayo de Co-IP.

Ensayo de Co-IP

Todos los pasos se realizaron a 4 °C. Después de realizar los 6 lavados con amortiguador de lavado, se realizaron 2 lavados más con amortiguador de lisis centrifugando y desechando el sobrenadante. Se removió el exceso de líquido de la columna dando pequeños golpes sobre una sanita y se colocó el tapón inferior. Se agregaron los 500 μ L del lisado pre-aclarado a la columna y se colocó el tapón superior. Las columnas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en el agitador Hulamixer.

Al día siguiente, se le quitó el tapón inferior a la columna y se colocó en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó y el sobrenadante se guardó como extracto no unido para examinarlo posteriormente. Luego se colocó a la columna en un tubo colector y se realizaron 3 lavados con 200 μ L amortiguador de lisis, centrifugando y desechando el sobrenadante. Posteriormente se realizó un lavado más con 100 μ L amortiguador de acondicionamiento 1X, centrifugando y desechando el sobrenadante. Finalmente se procedió a realizar la elusión de las proteínas. La columna se colocó en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL, se añadió 10 μ L de amortiguador de elusión y se centrifugó. Se mantuvo la columna en el tubo y se agregó 40 μ L de amortiguador de elusión a la resina, se incubó 5 minutos a TA y se centrifugó. Se realizaron dos elusiones más con 50 μ L de amortiguador de elusión, incubando 5 minutos y centrifugando. Las elusiones se guardaron a -20°C para examinarlos posteriormente mediante tinción con plata y/o WB.

Tinción con plata

Los productos obtenidos del ensayo de Co-IP se separaron en geles SDS-PAGE al 12 % y posteriormente fueron teñidos con plata utilizando el *kit* SILVER QUEST (Invitrogen: LC6070), siguiendo las instrucciones del proveedor.

La tinción se realizó a TA. Después de correr el gel se lavó con agua miliQ estéril tres veces. Luego se le agregó 100 mL de solución fijadora (etanol 40 %, Ác. Acético 10 %, Agua ultrapura c.b.p.) y se incubó durante toda la noche en agitación.

Posteriormente se realizó un lavado con 100 mL de etanol al 30 % durante 10 minutos en agitación. Se decantó y agregó 100 mL de solución sensibilizadora (EtOH 30 %, Solución sensibilizador 10 %, H₂O ultrapura c.b.p), se incubo por 10 minutos en agitación y se decantó. Luego se lavó con 100 mL de etanol al 30 % agitando durante 10 minutos, se decantó y lavó con 100 mL de agua miliQ estéril durante 10 minutos en agitación y se decantó. Se incubó con 100 mL de solución de tinción al 1 % en agua ultrapura en agitación durante 15 minutos. Se decantó y lavó con agua miliQ estéril durante 1 minuto. Luego se agregó 100 mL de solución reveladora (revelador 10 %, potenciador de revelador 1 %, agua ultrapura c.b.p.) se agitó de 10-30 minutos hasta observar la tinción de las bandas. Luego se detuvo la tinción agregando 10 mL de solución de paró. Se lavó con 100 mL de agua miliQ estéril durante 10 min, se desechó y se cambió por otros 100 mL de agua miliQ. Posteriormente las bandas teñidas fueron cortadas para mandarlas secuenciar. Para esto el carril completo se dividió en 7-8 partes iguales y se cortaron, luego cada uno de los fragmentos fueron cortados en cuadros de 1 mm y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL etiquetados adecuadamente (pTREXn 1-7 y HA-TcDSCR3-Like 1-7). Para mantener las muestras se les agregó 200 µL de solución de mantenimiento (metanol 10 %, ácido fórmico 7 %, agua ultrapura c.b.p) y se guardaron a 4°C hasta su tratamiento para digerir los péptidos.

Como control interno para verificar la integridad de las muestras después del proceso, se realizó un WB de los productos de la Co-IP de cada línea de

parásitos, utilizando el anticuerpo anti-HA ya mencionado y se reveló el resultado mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific: 34080) como sustrato de la peroxidasa, en el equipo ChemiDoc™ MP System (Biorad: 1708280).

Espectrometría de masas en tándem (MS-MS)

Primeramente se llevó a cabo el tratamiento de las muestras para posteriormente procesarlas en el espectrómetro de masas. Para ello a las muestras de los cuadrillos de 1 mm de acrilamida teñidos con plata guardados a -20°C, se les quitó la solución de almacenamiento. Se lavaron con agua ultrapura y posteriormente se destiñeron agregando 100 µL de solución desteñidora (kit *SILVER QUEST*: 50 µL de solución A más 50 µL de solución B) incubándose durante 15 minutos a TA. Se retiró la solución desteñidora y se lavaron las muestras tres veces con 200 µL de agua ultrapura, incubándose por 10 minutos a TA. Se deshidrataron los cuadrillos de acrilamida agregando 200 µL de metanol al 100 % durante 5 minutos a TA. Se removió el metanol y se rehidrató agregando 200 µL de metanol al 30 % por 5 minutos a TA. Se quitó el metanol al 30 % y se agregó de nuevo 200 µL de metanol al 100 %, se incubaron las muestras 5 minutos a TA y este paso se repitió una vez más para terminar de deshidratar las muestras. Se quitó el metanol y se secaron las muestras en el *SpeedVac* (Thermo Scientific: EW-13045-05) durante 10 minutos. Posteriormente se agregó 50 µL de DTT (10 mM en bicarbonato de sodio 100 mM)

para llevar a cabo el rompimiento de los puentes disulfuro, durante 35 minutos a 56 °C. Se quitó el DTT y se añadió 70 µL de iodoacetamina (50 mM en bicarbonato de sodio 100 mM) para alquilar los grupos tioles y evitar que se vuelvan a formar los enlaces disulfuro, incubando las muestras por 30 minutos a TA. Posteriormente se lavaron las muestras durante 10 minutos a TA con 200 µL de bicarbonato de sodio 100 mM para quitar las sales que pudieran interferir con el equipo. Se removió el amortiguador, se agregaron 200 µL de acetonitrilo 100 % y se incubaron las muestras 5 minutos a TA. Se repitió el lavado con bicarbonato de sodio 100 mM y se incubó con acetonitrilo 100 % dos veces más. Luego se secaron las muestras en el *SpeedVac* durante 10 minutos. Se agregó 50 µL de tripsina 20 ng/ µL disuelta en bicarbonato de sodio 50 mM a las muestras y se incubó a 4°C durante 40 minutos. Se centrifugó para bajar lo evaporado y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 50 µL de bicarbonato de sodio 50 mM a las muestras y se incubó a 37°C toda la noche. Se centrifugó para bajar el condensado y se agregó 40 µL de ácido fórmico 5 % y se incubó 10 minutos a TA. Se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf de 600 µL (Aquí vienen los péptidos) y se agregó a los cuadritos de acrilamida 40 µL de una solución de ácido fórmico al 5 % con acetonitrilo al 50 % (en agua ultrapura c.b.p.) y se incubó 10 minutos a TA mezclando en el vórtex ocasionalmente. El sobrenadante se recuperó en el mismo tubo eppendorf de 600 µL y este paso se repitió una vez más. Se centrifugaron los tubos para bajar todo el sobrenadante y

se concentraron en el *SpeedVac* durante 4 horas, hasta obtener un volumen de 20 μL aproximadamente. Luego se procedió al desalar las muestras.

Eliminación de sales y concentración de péptidos para MS-MS

Para llevar a cabo el desalado y concentración de los péptidos, se utilizaron columnas *ZipTip-C₁₈ pipette tips* (Millipore: ZTC18S960). El procedimiento se repitió dos veces para cada una de las muestras, recuperando un volumen final de 60 μL . Para ello, primeramente se equilibró la columna lavando y desechando 10 veces con 10 μL de cada una de las siguientes soluciones: acetonitrilo al 100 %, acetonitrilo al 50 % y H_2O ultrapura, todas éstas con 0.1 % de ácido fórmico. Posteriormente se pasó tres veces la muestra por la columna, las proteínas unidas a la columna fueron lavadas tres veces con H_2O ultrapura con 0.1 % ácido fórmico, desechando el líquido en cada ocasión. Luego se eluyó a las proteínas dos veces con 10 μL de acetonitrilo 50 % con 0.1 % ácido fórmico y una vez con acetonitrilo al 75 % con ácido fórmico 0.1 % y el sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf de 200 μL . Las muestras se guardaron a -20°C hasta su lectura en el equipo.

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). El análisis de las secuencias obtenidas se realizó utilizando el software en línea MASCOT, así como en las bases de datos en línea: Uniprot, NCBI-Blast y TriTrypDB.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el paquete estadístico GraphPad Prism 5.00v para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. Los datos se representan por la media \pm la desviación estándar.

Vps26, respectivamente. El análisis de dominios conservados utilizando la base de datos CDD-NCBI y en Trityp, identificó dos dominios superpuestos: un dominio PF03643 (Vps26, del aminoácido 20 al 292, $E= 4.3 \times 10^{-18}$) y al dominio SUPERFAMILY SSF81296 (dominio E-set el cual contiene una estructura tipo sándwich de hojas betas similar al de las inmunoglobulinas, aminoácido 8 al 156, $E= 6.2 \times 10^{-7}$), por otro lado en la base de datos KEGG identifica al dominio PF00339 (N-Arrestina) del aminoácido 10 al 128, con un valor de $e= E= 8.4 \times 10^{-05}$ (Figura 12).

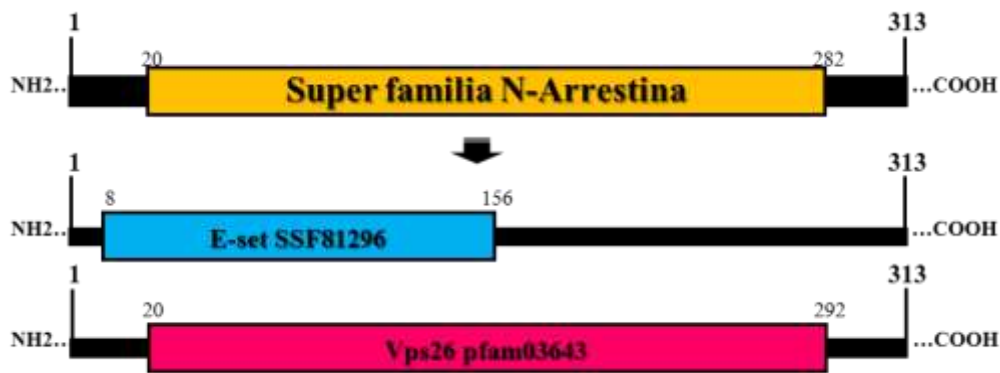


Figura 12. Representación esquemática de los dominios presentes en la secuencia hipotética TcCLB.506941.210.

Además una vez que identificamos un probable ortólogo para esta secuencia en humano, realizamos un alineamiento entre la secuencia hipotética de *T. cruzi* (TcCLB.506941.210) y otras secuencias Vps26 de otras especies utilizando tres programas bioinformáticos (COBALT, CLUSTAL W, UniProt), dando como resultado una identidad entre ellas de un 14-20 % (Figura 13, Anexo 2).

```

TcCLB.506941.210 -----MQAKVQNPLTVQ--LDRVGGTYFAGEEVTGCVVVNYATSS
HsVps26A      MSFLGGFFGPICEIDIVLNDGETRKMAEMKTEDGKVEKHLYFYDGESVSGKVNLAFKQPG
HsVps26B      MSFFG--FGQSVEVEILLNDAESRKRAEHKTEDGKKEKYFLFYDGETVSGKVSIALKNPN

TcCLB.506941.210 SFV---DINLTLVIGVVAIQFPYGENASVFRRVGNIKPLKVMSLQIPLCRRGTQIPAGKTE
HsVps26A      KRLEHQGIRIEFVGQIEL-----FNDKSNTHEF--VNLVKELALPGELTQS----
HsVps26B      KRLEHQGIKIEFIGQIEL-----YYDRGNHHEF--VSLVKDLARPGEITQS----

TcCLB.506941.210 VPFTFEIRASHPDPVLPVOTYTGTVHVTCTNYTIVAISTGIMSSDVSEVPIYVIVPGQGQPP
HsVps26A      RSYDFEF--MOVEKP-YESYIGANVRLRYFLKVTIVR----RLTDLVKEYDLIVHQ----
HsVps26B      QAEDFEF--THVEKP-YESYTGQNVKLRFLRATISR----RLNDVVKEMDIVVHT----

TcCLB.506941.210 PHVLKEDTGVRFELNEESLEVLCDRPTPSDRVNPFLLEGCFDRY--YNDIDIP----LS
HsVps26A      -----LATYPDVNNSIKMEVGIEDCLHIEFEYNKSKYHLKDVIV
HsVps26B      -----LSTYPELNSSIKMEVGIEDCLHIEFEYNKSKYHLKDVIV

TcCLB.506941.210 GWIVVRRCSAKILSIELQMORVEQAATPGKIVREVTTELQTIQIADGNVLRNLEIPIYMIFF
HsVps26A      GKIYFLLVRIKIQHMEIQLIKKEITGIGPSTTTETETIAYEIMDGAPVKGESIPIRLFL
HsVps26B      GKIYFLLVRIKIKHMEIDI IKRETTGTGPNVYHENDTIAYEIMDGAPVKGESIPIRLFL

TcCLB.506941.210 PRWYTCPSLKTTPNIRVVEDA---NVLVKLQGRQLLRK-----VVPIHLYSAS-----
HsVps26A      AGYDPTPTMRDVNKKFSVRYFLNLVLVDEEDRSSEFKQOEIILWRKAPEKLR---KQRTNF
HsVps26B      AGYELTPTMRDINKKFSVRYFLNLVLVDEEERYFKQOEIVLWRKGDIVRKSMSHQAAIA

TcCLB.506941.210 -----
HsVps26A      HQRFESPESQASAEQPEM-----
HsVps26B      SQRFEGETTSLGEVTRTPSQLSDNNCRQ

```

Figura 13. Alineamiento de la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 y las secuencias de Vps26 de humano (Hs) isoformas A y B. El alineamiento se realizó usando el programa bioinformático Clustal Omega, mostrando un porcentaje de identidad de un 18.99 y 20.54 con las isoformas de Vps26 A y B respectivamente. La identidad de una posición determinada está indicada por: Identidad/Amarillo, Sustitución conservativa/Azul claro y Sustitución semiconservativa/Gris.

Utilizando el programa bioinformático Phyre2 realizamos un modelado tridimensional de la secuencia de aminoácidos de TcCLB.506941.210. El programa bioinformático arrojó un plegamiento con una confianza del 100 % con la estructura cristalina de Vps26B de ratón y de humano con un porcentaje de identidad del 21 y 19 %, respectivamente (Figura 14). Además encontramos que TcCLB.506941.210 presenta un plegamiento con una confianza del 100 % con las

estructuras cristalinas de otras proteínas del clan de las Arrestinas con un porcentaje de identidad que va del 12 al 17 % (Anexo 3).

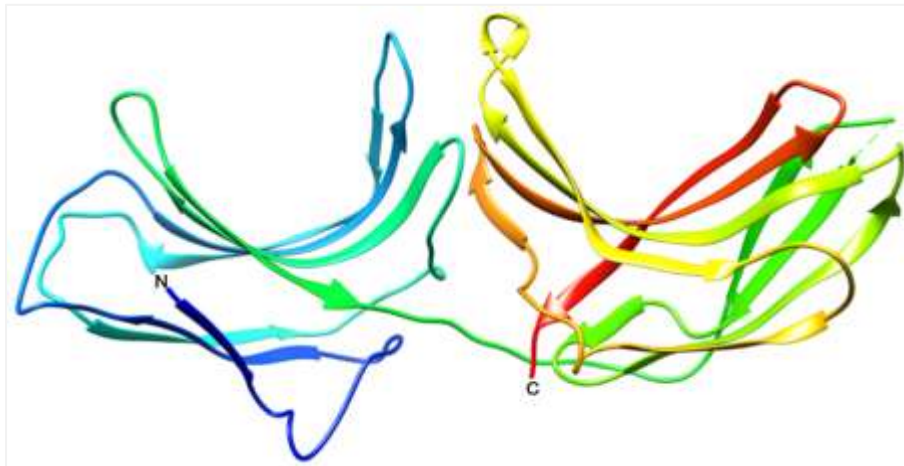


Figura 14. Estructura tridimensional predicha de TcCLB.506941.210 en Phyre2. La estructura fue modelada utilizando como plantilla c2FauA.

Con los resultados obtenidos hasta este momento, la presencia del dominio pfam03640 y el modelado al 100 % con la estructura cristalina de Vps26B de ratón y humano sugerían que la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 podría corresponder a Vps26 de *T. cruzi*. Sin embargo, el porcentaje de identidad entre la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 y las isoformas A y B de Vps26 de humano, así como de otras especies fue menor del 20 %, poniendo en duda que la secuencia en estudio correspondiera a Vps26 del parásito. Por ello, continuamos con la búsqueda bibliográfica más profunda en donde encontramos que Vps26 se clasifica dentro del clan de las Arrestinas, dentro de esta familia también se encuentra clasificada a la proteína DSCR3 (considerado un parálogo de Vps26), la cual se

caracteriza por presentar dos dominios superpuestos: el dominio PF03643 (Vps26, $E= 1.1 \times 10^{-155}$) y el dominio PF00339 (N-Arrestina, $E= 1.9 \times 10^{-3}$ un dominio con una estructura tipo sándwich de hojas betas similar al de las inmunoglobulinas) (Figura 15, panel A), adquiere una estructura tridimensional similar a Vps26, usando el templado c2FauA, mediante un modelado 3D en Phyre2 (Figura 15, panel B). Debido a que estas características son muy similares a las observadas en la proteína hipotética TcCLB.506941.210, procedimos a realizar un alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de TcCLB.506941.210 y DSCR3, el alineamiento mostró un porcentaje de identidad del 30.76 % y una similitud del 66.61 %. La comparación entre sus estructuras secundarias y tridimensionales muestra una organización y plegamiento muy similar (Figura 15, panel B). Estos resultados en conjunto sugieren que nuestra secuencia hipotética TcCLB.506941.210 podría corresponder a DSCR3 de *T. cruzi* más que a Vps26. Por lo que de ahora en adelante denominaremos a la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 como TcDSCR3-Like. Con el fin de analizar la relación de los ortólogos de DSCR3 se creó un árbol filogenético utilizando MEGA7. Aunque comparten un ancestro común, TcDSCR3-Like diverge como un grupo monofilético de las otras especies, agrupándose (marcada en negritas) con un valor *Bootstrap* del 100 % dentro del género *Trypanosoma* y con 90-100 % dentro del clado de las diferentes cepas de *T. cruzi* (Figura 16).

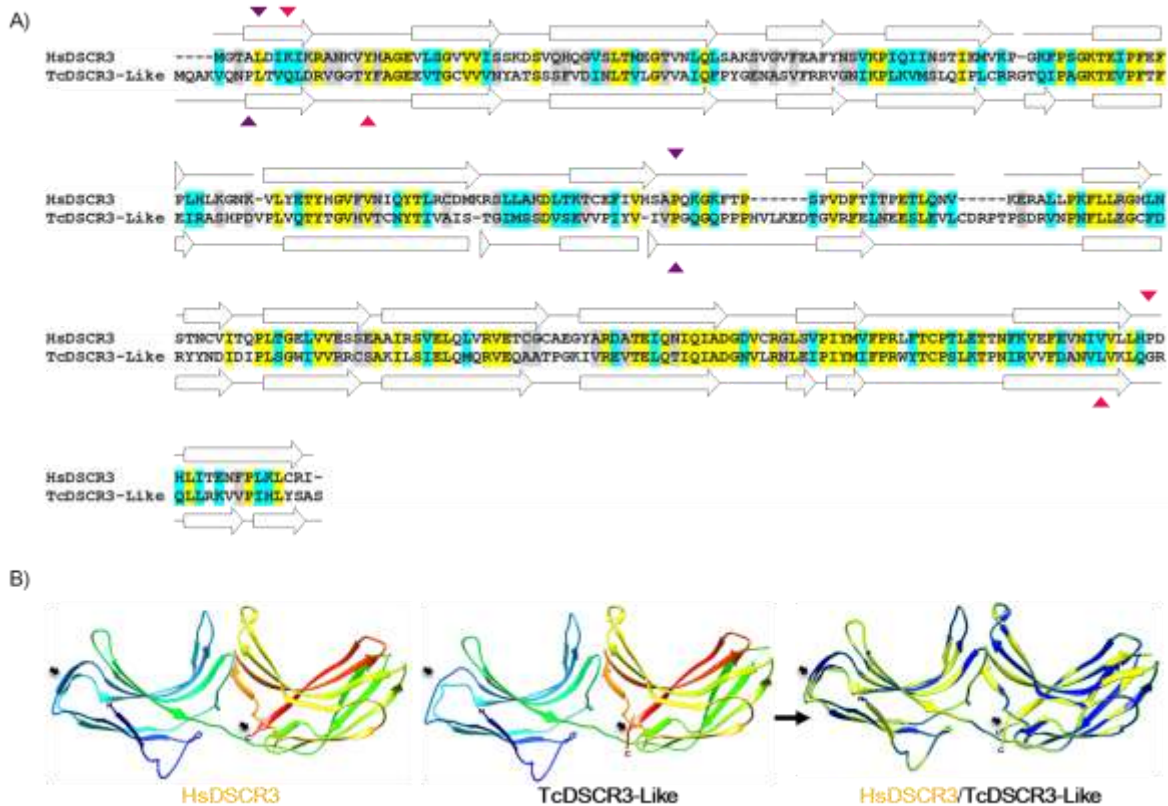


Figura 15. Comparación entre la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 (*TcDSCR3-Like*) y la secuencia de *DSCR3* de humano (Hs). A) Alineamiento de la secuencias aminoacídica de TcCLB.506941.210 (*TcDSCR3-Like*) y la secuencia de *HsDSCR3*. La identidad de una posición determinada está indicada por: Identidad/Amarillo, Sustitución conservativa/Azul claro y Sustitución semiconservativa/Gris. La identidad entre las secuencias fue de 30.76%. La estructura secundaria de cada proteína fue predicha usando Psipred, la cual está indicada arriba o debajo de cada secuencia. Las flechas moradas indican el inicio y termino del dominio pfam00339 (N-Arestina)/SSF81296 (E-set), respectivamente, las flechas rosas al dominio pfam03643 (Vps26). B) Modelos tridimensionales y comparación entre TcCLB.506941.210 (*TcDSCR3-Like*) y *HsDSCR3*.

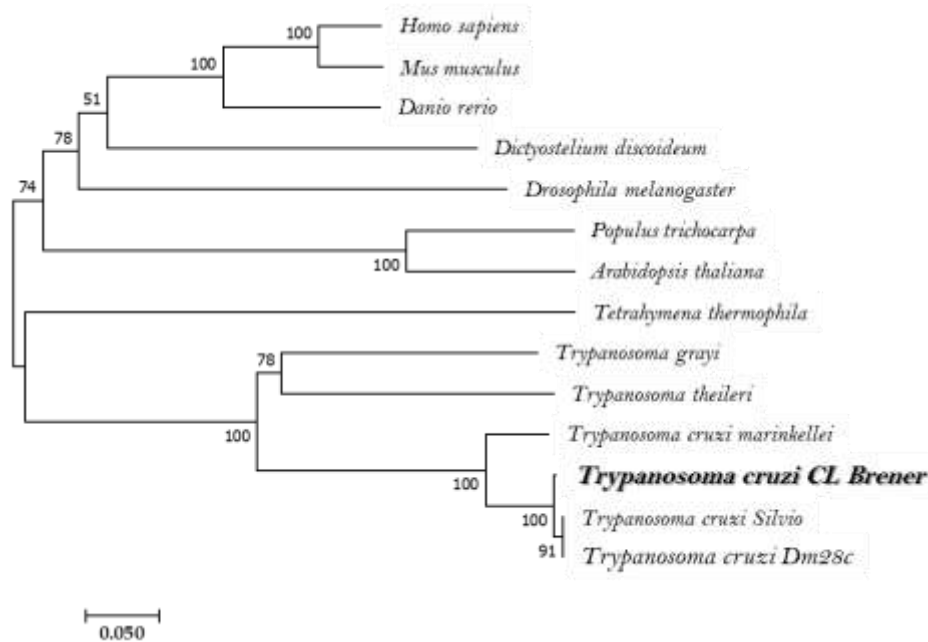


Figura 16. Árbol Filogenético de DSCR3 entre el género *Trypanosoma* y otras especies. La suma de la longitud de la ramificación = 2.58860019. El porcentaje de los árboles replicados en los cuales los taxose asociados se agruparon con un valor de *Bootstrap* (1000 replicas) se muestra junto a las ramas. El árbol esta dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. En rojo se muestra a la especie a la cual pertenece TcDSCR3-Like.

Evaluación de la disminución de la expresión del ARNm de *TcDSCR3-Like*

Durante el desarrollo del trabajo previo de maestría se obtuvieron parásitos transfectantes estables con la construcción pTREN-TcDSCR3-Like-AS. Los cuales se caracterizan por expresar un ARNm antisentido dirigido contra los primeros 57 nt del extremo 5' de la secuencia endógena de *TcDSCR3-Like* y de esta manera disminuir la expresión del mensajero endógeno de *TcDSCR3-Like*. Para continuar con la caracterización de TcDSCR3-Like se evaluó la obtención de parásitos KD

analizando la expresión ectópica del ARNm antisentido en los parásitos transfectantes estables, mediante PCR punto final y la consecuente disminución del mensajero endógeno de *TcDSCR3-Like*, mediante qRT-PCR. Para esto, se obtuvo el ARN total de los parásitos transfectantes estables de pTREXnTcDSCR3-Like-AS y parásitos control silvestres y MOCK (Figura 17, panel A), el cual fue tratado con ADNasaI para eliminar los restos de ADN genómico (Figura 16, panel B) y con el cual se sintetizó el cADN-cd (Figura 17, C). Como control de síntesis de cADN-cd se amplificó por PCR punto final al gen endógeno *TcGAPDH* (Figura 17, panel D). Finalmente se amplificó mediante PCR punto final una secuencia de 120 pb (57 nt de la secuencia antisentido de *TcDSCR3-Like* más 63 nt del esqueleto del vector pTREXn), utilizando un juego de oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente a la secuencia antisentido. Como muestran los resultados, el ARN total se obtuvo íntegramente y la síntesis del cADN-cd fue realizada con éxito, ya que el gen de *TcGAPDH* (1044 pb) se amplifica en todas las muestras en el tamaño esperado. Los resultados del PCR punto final mostraron un producto de amplificación con un peso molecular de ~120 pb únicamente en los parásitos transfectantes estables de pTREXnTcDSCR3-LikeAS (Figura 17, panel E). Con este resultado corroboramos que los parásitos transfectantes estables de pTREXnTcDSCR3-Like-AS expresan a la secuencia antisentido que está dirigida contra la porción 5' del mensajero de *TcDSCR3-Like*.

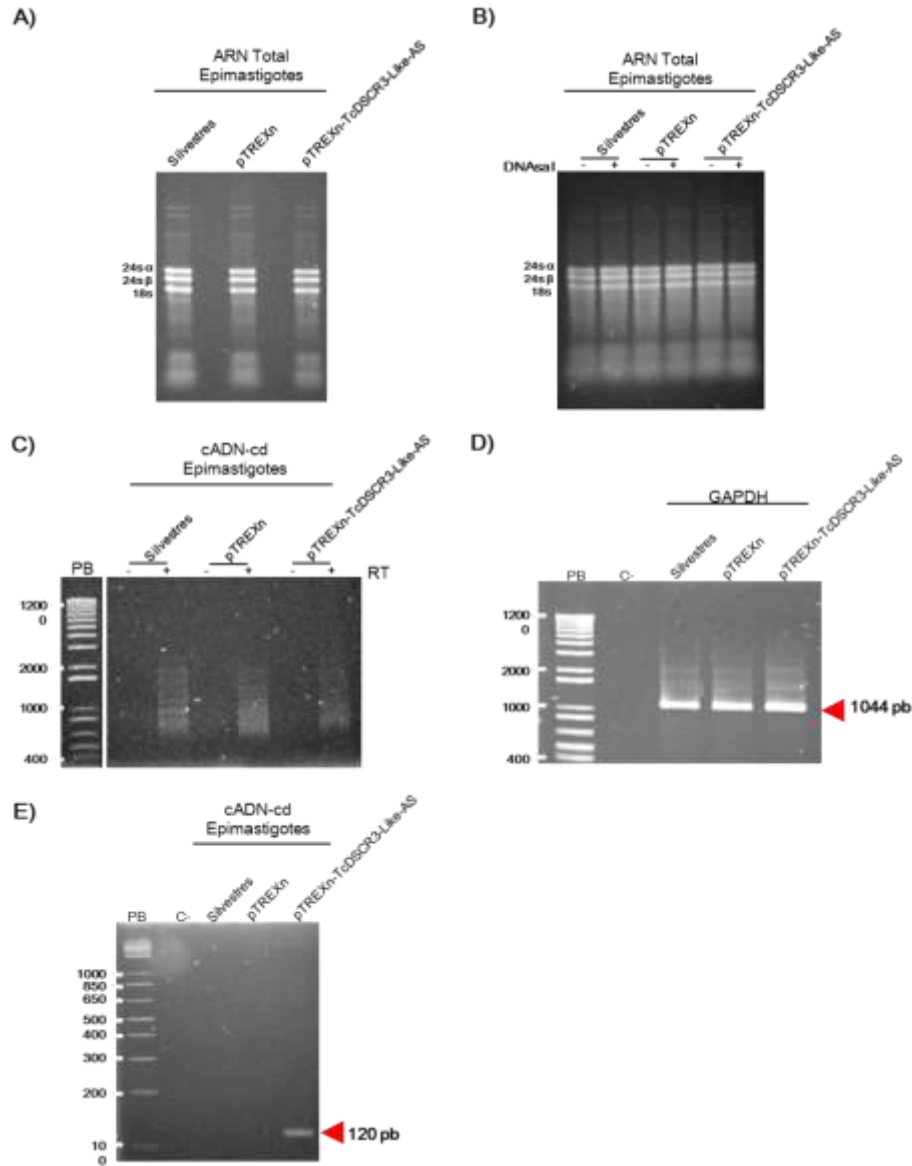


Figura 17. Evaluación de la expresión del ARNm antisense en los parásitos transfectantes estables de pTREXn-TcDSCR3-LikeAS. A) Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante de la extracción de ARN total de los parásitos transfectantes estables pTREXnTcDSCR3-LikeAS y controles. El gel fue teñido con BrEt. B) Resultado de la digestión de ADNsa I de los ARN totales. C) Síntesis de la cadena doble de ADN (cADN-cd) utilizando como molde el ARN total digerido con ADNsa I en presencia (+) ó ausencia (-) de retro-transcriptasa reversa. D) La integridad del cADN-cd fue evaluado mediante la amplificación del gen endógeno GAPDH. E) Amplificación por PCR punto final del ARNm antisense. Se observa la banda esperada de ~120 pb en los parásitos transfectados establemente. C-: control negativo de reacción. 1: cADN-cd silvestres, 2: cADN-cd pTREXn y 3: cADN-cd pTREXnTcDSCR3-LikeAS.

Posteriormente, evaluamos la expresión relativa del ARNm de *TcDSCR3-Like* mediante PCR tiempo real en epimastigotes transfectantes estables de pTREXnTcDSCR3-Like-AS y control MOCK. Se utilizó como control endógeno a *TcGAPDH*. El análisis de la expresión relativa se cuantificó mediante el método del $\Delta\Delta CT$ comparativo. Los resultados mostraron una disminución de un 94.05 % en la expresión relativa del ARNm de *TcDSCR3-Like* en parásitos transfectantes estables (normalizado como un valor arbitrario de 1) versus los parásitos control MOCK (18.30 ± 4.3). Estos resultados en conjunto demuestran que el ARNm antisentido se expresa en los parásitos transfectantes estables, la disminución de la expresión del ARNm endógeno de *TcDSCR3-Like* en los epimastigotes transfectantes estables y la exitosa obtención de los parásitos KD de *TcDSCR3-Like* (Figura 18).

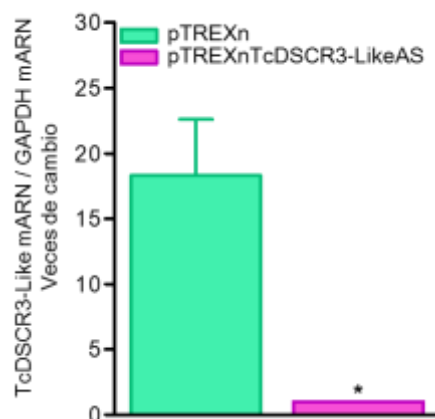


Figura 18. Análisis de la expresión del ARNm endógeno *TcDSCR3-Like* en los parásitos transfectantes estables de pTREXnTcDSCR3-LikeAS mediante PCR tiempo real. *TcDSCR3-Like* se normalizo con el valor arbitrario de 1. Como gen endógeno se utilizó a *TcGAPDH*. El análisis de los resultados se realizó utilizando el método $\Delta\Delta CT$ comparativo. Media \pm SD, n=3. *t-studet* p<0.02.

Expresión del ARNm de *TcDSCR3-Like* en los diferentes estadios de *T. cruzi*

Evaluamos el nivel de expresión del transcrito de *TcDSCR3-Like* en los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi*, mediante PCR en tiempo real. El análisis de los resultados se realizó mediante el método $\Delta\Delta\text{CT}$ comparativo y la intensidad de la señal relativa se normalizó con respecto al gen endógeno *TcGAPDH*. Como se muestra en la Figura 18, se observó una mayor expresión del ARNm de *TcDSCR3-Like* en la FI-3 (normalizado con el valor arbitrario de 1) en comparación con epimastigotes (0.17 ± 0.03), tripomastigotes (0.33 ± 0.11) y amastigotes (0.63 ± 0.18). Observándose una diferencia significativa de 5.66, 3 y 1.77 veces más en el nivel de transcrito en la forma intermedia con respecto a epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes, respectivamente. Estos resultados muestran que *TcDSCR3-Like* tiene una expresión diferencial entre los estadios de desarrollo de *T. cruzi*, presentando una mayor expresión en la FI-3 en la cual fue identificada la expresión diferencial de la secuencia en estudio en los primeros análisis (Sánchez-Cruz. 2009).

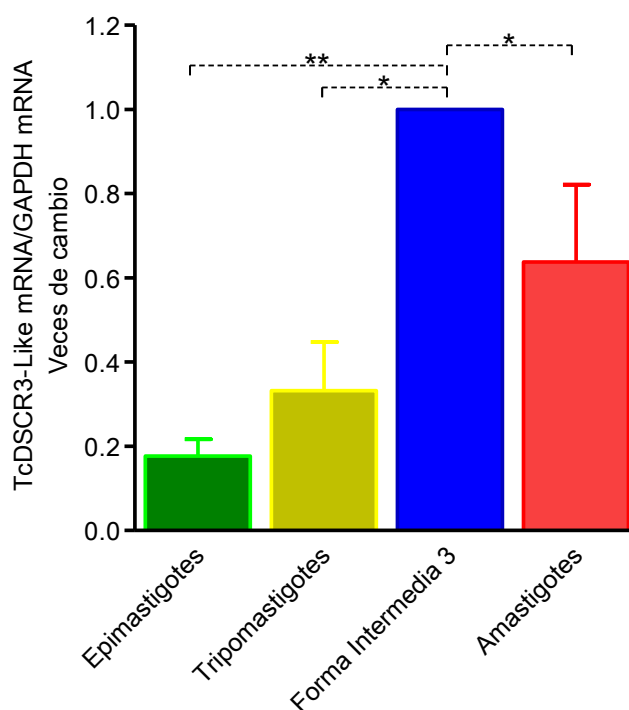


Figura 19. PCR Tiempo real cuantitativo de la expresión relativa de *TcDSCR3-Like* en los diferentes estadios de *T. cruzi*. El cADN-cd de la FI-3 se normalizo con el valor arbitrario de 1. Como gen endógeno se utilizó a *TcGAPDH*. El análisis de los resultados se realizó utilizando el método $\Delta\Delta CT$ comparativo. Los datos representan la media \pm SD, N=2. Análisis de varianza de una cola, "Newman-Keuls *Multiple Comparison Test*" * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

Análisis del reconocimiento de TcDSCR3-Like con el anticuerpo heterólogo Vps26

en extractos de *T. cruzi*

Nuestra primera hipótesis al iniciar este trabajo y por los datos *in silico* obtenidos hasta ese momento, era que la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 identificada en la biblioteca de sustracción podría corresponder a Vps26 de *T. cruzi*. Para evaluar esta posibilidad llevamos a cabo experimentos de WB y ensayos

de inmunofluorescencia (IFI) utilizando un anticuerpo heterólogo de Vps26 de ratón. Primeramente probamos el reconocimiento del anticuerpo anti-Vps26 utilizando un extracto total de células HeLa, observándose la banda esperada de ~39 kDa. Como control del experimento utilizamos el reconocimiento del anticuerpo secundario, en donde no se observó ningún reconocimiento (Figura 20, panel A). Posteriormente procedimos a realizar el ensayo de WB utilizando extracto de epimastigotes MOCK con el objetivo de detectar a la proteína endógena de Vps26 y extracto de parásitos que expresan ectópicamente a HA-TcDSCR3-Like (nombre dado por datos mostrados posteriormente). Como control se evaluó la expresión de la proteína ectópica HA-TcDSCR3-Like utilizando el anticuerpo anti-HA. El resultado de WB utilizando un anticuerpo primario heterólogo dirigido contra Vps26 mostró en ambos extractos un reconocimiento de varias bandas con diferentes pesos moleculares, sin embargo la banda esperada de ~34 kDa no se observó. En el caso del extracto de la proteína ectópica HA-TcDSCR3-Like la cual se detectó utilizando un anticuerpo primario anti-HA se observó reconocimiento de la banda esperada de ~35 kDa, peso molecular esperado para la proteína ectópica HA-TcDSCR3-Like. Como control de carga se utilizó la detección de la β -tubulina (~55 kDa) (Figura 20, panel B). Los resultados del IFI (Figura 20, panel C) mostraron una localización por todo el cuerpo del parásito en forma difusa y en forma de puntos en los estadios de epimastigotes (E) y amastigotes (A), mientras que en el caso de tripomastigotes (T) no se observó ningún reconocimiento. Sin embargo, debido a los resultados del WB

no estamos seguros de que este reconocimiento corresponda a nuestra proteína de interés. Estos datos en conjunto nos sugieren dos posibilidades: 1) que la proteína hipotética en estudio no corresponde a Vps26 de *T. cruzi* o 2) que el anticuerpo heterólogo no es útil para estos estudios, característica que se hemos visto cuando se utilizan algunos anticuerpos heterólogos en *T. cruzi*. A este respecto cabe mencionar que no hemos tenido éxito hasta el momento en la obtención de Ab contra nuestra proteína recombinante HA-TcDSCR3-Like.

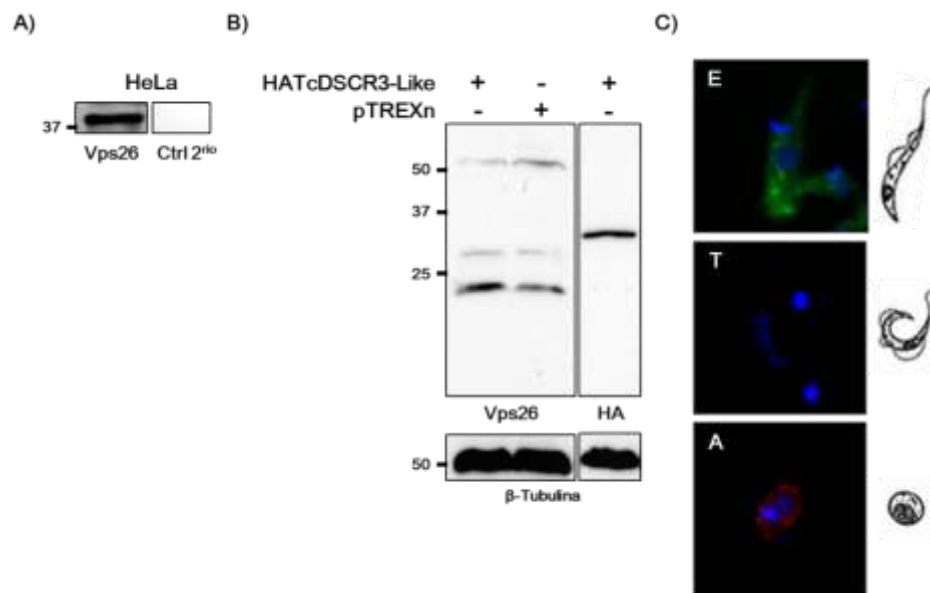


Figura 20. Evaluación del reconocimiento del anticuerpo heterólogo Vps26 a TcDSCR3-Like de *T. cruzi*. A) WB de un ETP de células HeLa como control positivo del reconocimiento del anticuerpo anti-Vps26 (1:200), como control del experimento se utilizó al anticuerpo secundario IgG HRP anti-cabra. B) Western blot utilizando extractos de HA-TcDSCR3-Like y Mock (pTREXn). Se utilizaron los anticuerpos primarios anti HA (1:100), Vps26 (1:200) y β -tubulina (Control de carga, 1:3000). Como anticuerpo secundario se usó IgG-HRP de cabra (Vps26) y ratón (HA y β -tubulina). C) Localización subcelular de Vps26 utilizando un ensayo de inmunofluorescencia. Se utilizó el anticuerpo anti-Vps26 (1:200) y como anticuerpo secundario se usó Alexa-488 anti-cabra (E: epimastigotes, verde) y Alexa-546 anti-cabra (T: tripomastigotes y A: Amastigotes, rojo). Barra = 20 μ m (E) y 25 μ m (A y T)

Se ha reportado que el KD de Vps26 en células de mamífero y *T. brucei* produce la fragmentación de las membranas del aparato de Golgi (Seaman, 2004 y Koumandou V.L. y Cols. 2015). Por lo que como experimento adicional evaluamos si en los parásitos KD se produce la fragmentación de la membrana del aparato de Golgi. Para esto se utilizó al marcador de Golgi, la proteína formiminotransferasa ciclodeaminasa (58K FTCD) la cual está asociada a la superficie citoplasmática del Golgi. Primeramente evaluamos la expresión de esta proteína en el extracto de epimastigotes silvestres y como control se utilizó un extracto de células 3T3/NIH. Como se observa en la Figura 21 panel A, se observó el reconocimiento de una banda esperada para la proteína 58k FTCD de ~58 kDa en ambos extractos, lo cual nos indica que esta proteína se expresa como era esperado en las células 3T3/NIH y en el epimastigote, por lo que podemos usarlo para medir la fragmentación de Golgi mediante IFI. Ésta se evaluó en los parásitos KD de TcDSCR3-Like y el control MOCK. Los resultados de la cuantificación del marcador 58k FTCD en el IFI no mostró diferencia significativa de la fragmentación del aparato de Golgi en los parásitos KD (Figura 21, panel B). Este dato apoya el resultado anterior, y confirma que nuestra secuencia hipotética TcCLB.506941.210 no corresponde a Vps26 de *T. cruzi*.

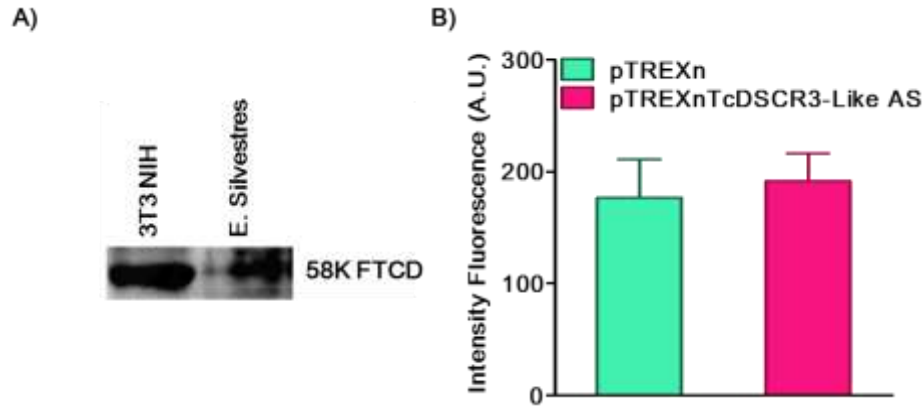


Figura 21. Expresión de la proteína ciclodeaminasa formiminotransferasa (58K FTCD) en epimastigotes (E) silvestres y la fragmentación de Golgi. A) WB de extractos totales de células 3T3NIH y epimastigotes silvestres donde se evaluó la expresión del marcador de Golgi 58K FTCD. Como anticuerpo secundario se utilizó a IgG-HRP anti-ratón. B) Cuantificación de la fragmentación del aparato de Golgi evaluada con el anticuerpo 58k FTCD mediante inmunofluorescencia en los parásitos KD *TcDSCR3-Like*.

Evaluación de la localización subcelular de TcDSCR3-Like de *T. cruzi*

Para evaluar la localización subcelular de TcDSCR3-Like se llevó a cabo su expresión ectópica en el estadio de epimastigote, ya que este es el estadio que puede mantenerse en cultivo y en el cual se puede llevar a cabo ensayos de transfección y selección de parásitos transfectantes estables. Para esto, se fusionó en el extremo 5' de la secuencia nucleotídica la secuencia nucleotídica de Hemaglutinina (HA) y por otro lado en la extremo 3' a la secuencia nucleotídica que codifica de *TcDSCR3-Like* la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 22).



Figura 22. Representación esquemática de la fusión de las secuencias nucleotídicas de TcDSCR3-*Like* con las banderas de hemaglutinina (HA, extremo 5') y la proteína verde fluorescente (GFP, extremo 3'). En azul se marca el inicio de la transcripción (ATG) y en rojo el final (TGA).

Para esto, primeramente se llevó a cabo la inserción en el vector de clonación pGEM®T-Easy, las Figuras 23 y 24 muestran la amplificación, purificación, el PCR de colonia, la obtención del ADN de plásmido y la restricción de los ADN's, realizado para la obtención de las construcciones pGEMT-HA-TcDSCR3-Like y pGEMT-TcDSCR3-Like, respectivamente. En el apartado 5 se muestran las restricciones de los ADN's de pGEMT-HA-TcDSCR3-Like y pGEMT-TcDSCR3-Like con las enzimas *Hind* III / *Xho* I y *Xba* I / *Hind* III, respectivamente. Estos resultados nos indica la exitosa inserción de cada una de las secuencias en el vector pGEM®T-Easy.

Posteriormente procedimos a sub-clonar cada una de las secuencias en el vector de expresión para *T. cruzi* pTREXnGFP, para obtener las construcciones pTREXn-HA-TcDSCR3-Like y pTREXn-TcDSCR3-Like-GFP. Estas clonaciones se realizaron de manera sitio dirigida, utilizando los sitios de restricción *Hind* III / *Xho* I y *Xba* I / *Hind* III, respectivamente. Las Figuras 25 y 26 muestran la purificación, PCR de colonia, obtención del ADN de plásmido y la restricción de los ADNs que

confirman la inserción de cada una de las secuencias en el vector pTREXnGFP, para la obtención de las construcciones pTREXn-HA-TcDSCR3-Like y pTREXn-TcDSCR3-Like-GFP. La integridad de cada una de las construcciones fue verificada por secuenciación. Los resultados de la secuenciación no mostraron ningún cambio en las secuencias nucleotídicas que codifican para *TcDSCR3-Like*, *HA* y *GFP*, por lo que procedimos con los experimentos para la caracterización de *TcDSCR3-Like* (Anexo 4 y 5).

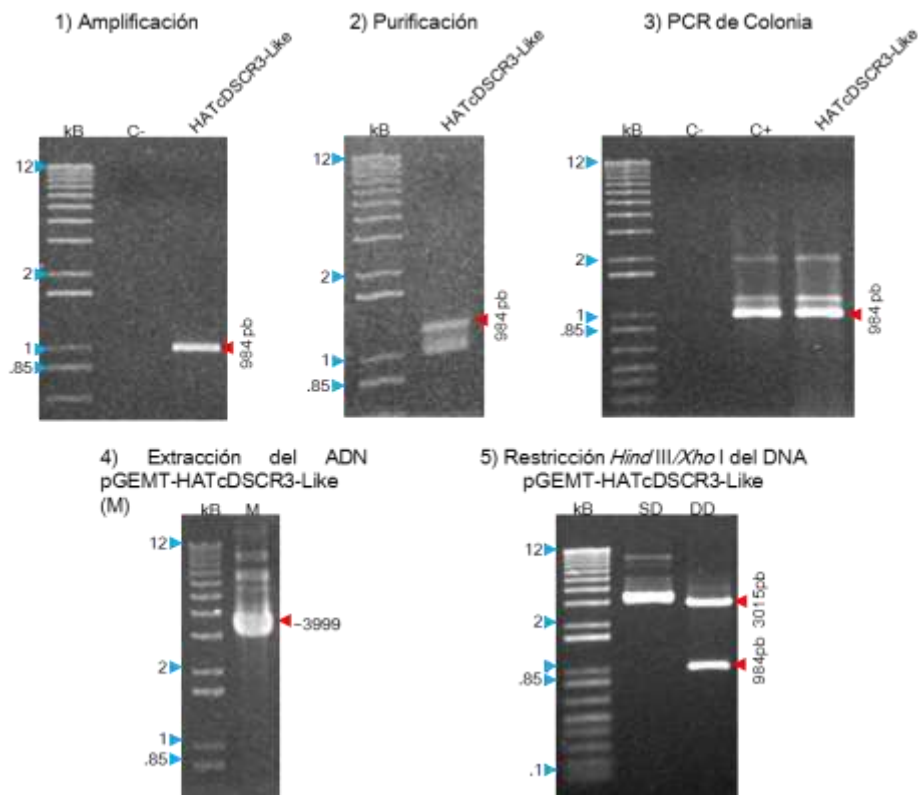


Figura 23. Obtención de la construcción pGEMT-HA-TcDSCR3-Like. 1-5 se muestran los resultados de los pasos seguidos para la obtención de la construcción pGEMT-HA-TcDSCR3-Like, la metodología seguida se expone en materiales y métodos.

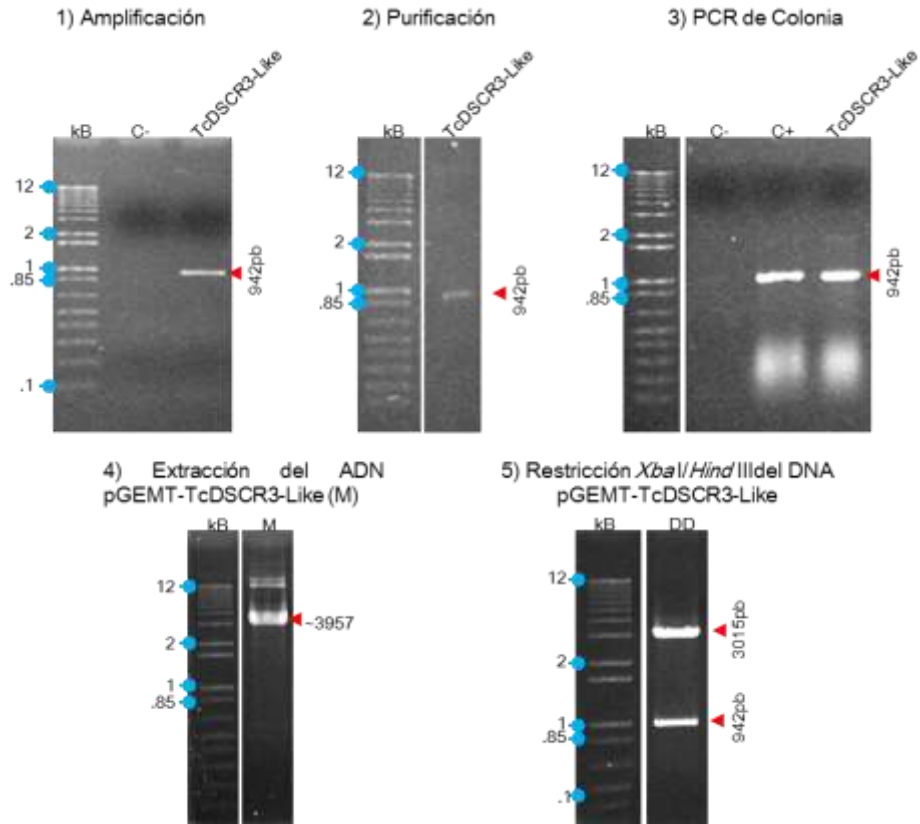


Figura 24. Obtención de la construcción pGEMT-TcDSCR3-Like. 1-5 se muestran los resultados de los pasos seguidos para la obtención de la construcción pGEMT-TcDSCR3-Like, la metodología seguida se expone en materiales y métodos.

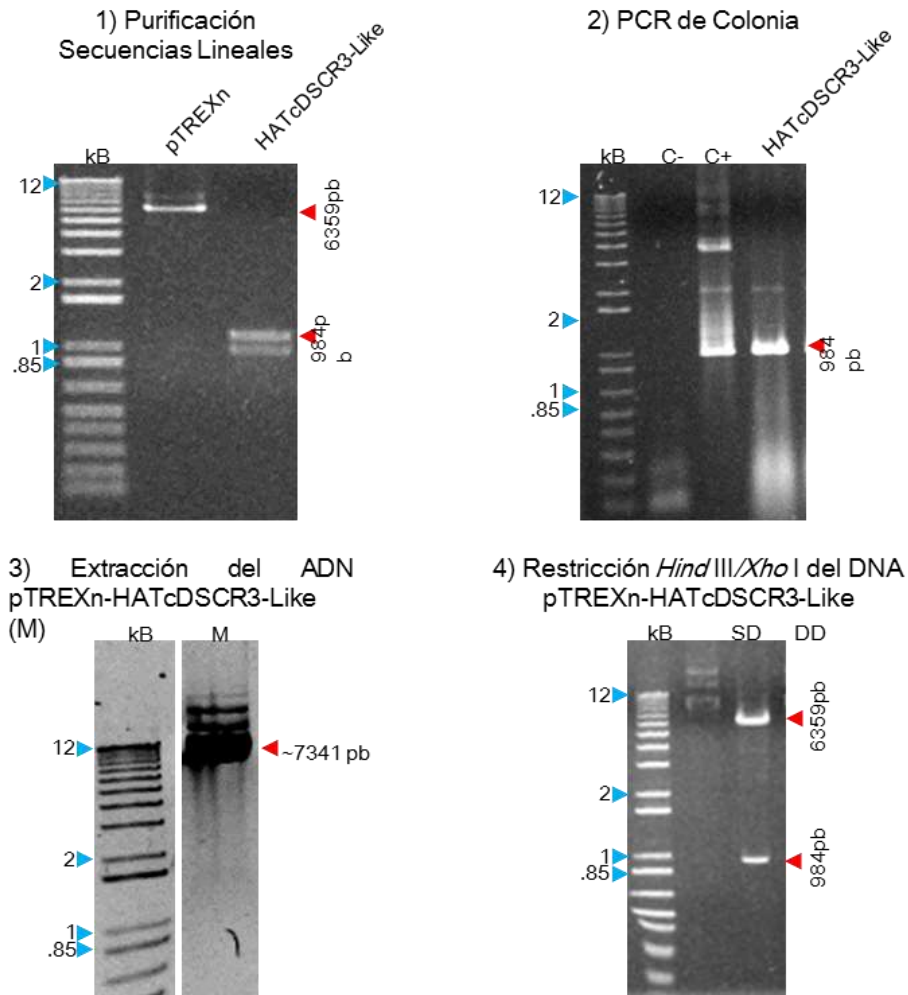


Figura 25. Obtención de la construcción pTREXn-HA-TcDSCR3-Like. 1-4 se muestran los resultados de los pasos seguidos para la obtención de la construcción pTREXn-HA-TcDSCR3-Like, la metodología seguida se expone en materiales y métodos.

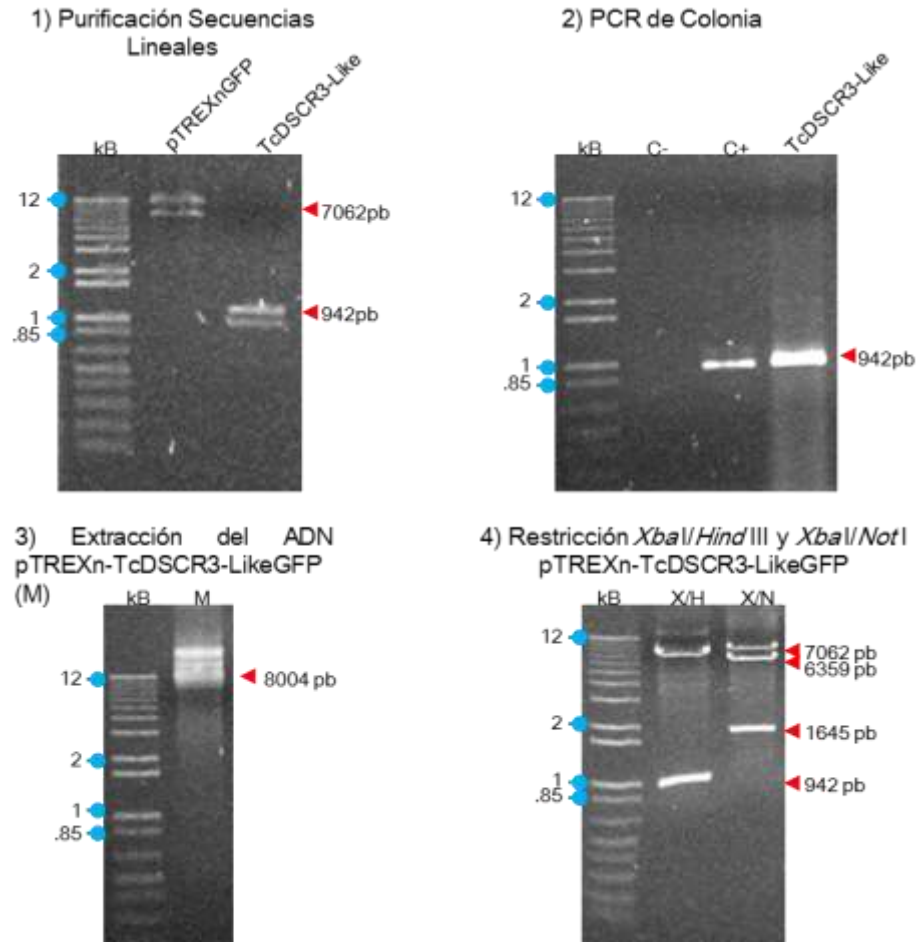


Figura 26. Obtención de la construcción pTREXn-TcDSCR3-Like-GFP. 1-4 se muestran los resultados de los pasos seguidos para la obtención de la construcción pTREXn-TcDSCR3-Like-GFP, la metodología seguida se expone en materiales y métodos.

A continuación estas construcciones fueron utilizadas para transfectar epimastigotes silvestres mediante electroporación. La población de parásitos transfectados establemente fue seleccionada con G418. Una vez obtenidos los parásitos transfectados establemente con las construcciones pTREXn-HA-TcDSCR3-Like y pTREXn-TcDSCR3-Like-GFP procedimos a evaluar primeramente mediante WB la expresión de *TcDSCR3-Like* fusionada a *HA* y *GFP* en el estadio de epimastigote, utilizando anticuerpos primarios anti-*HA* y anti-*GFP* de ratón respectivamente. En la Figura 27, se muestra el resultado de los ensayos de WB, en donde podemos observar por un lado una banda con un peso molecular esperado de ~35.4 kDa, la cual corresponde a la fusión HA-TcDSCR3-Like en los parásitos transfectantes estables de pTREXn-HA-TcDSCR3-Like y no así en los parásitos MOCK (panel A). Por otro lado, observamos una banda esperada para la fusión de TcDSCR3-Like-GFP de ~61 kDa en el caso de los parásitos transfectantes estables de pTREXn-TcDSCR3-Like-GFP (también observamos una banda con un peso molecular menor que podría corresponder a producto de degradación) y una banda esperada de ~27 kDa en el caso de los parásitos que expresan a GFP (panel B). Como control de carga se utilizó a β -tubulina (~55 kDa). Estos resultados demuestran que nuestros parásitos expresan de manera ectópica los genes que codifican las proteínas de fusión HA-TcDSCR3-Like y TcDSCR3-Like-GFP.

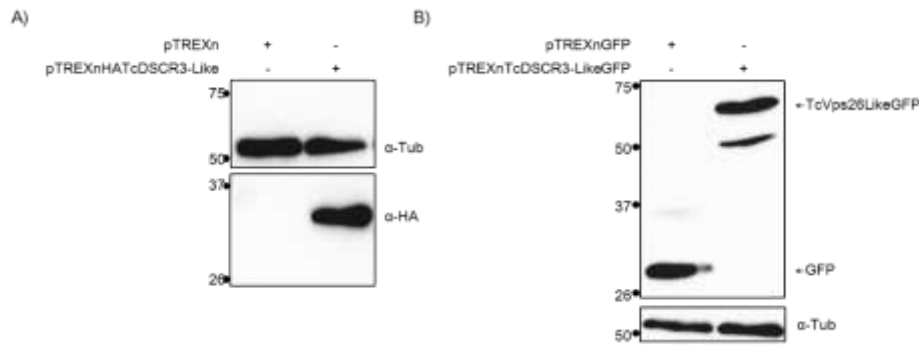


Figura 27. Expresión de las proteínas ectópicas HA-TcDSCR3-Like y TcDSCR3-LikeGFP en el estadio de epimastigotes. WB (A) donde se utilizaron extractos de proteínas totales de los parásitos transfectados establemente con pTREXn-HA-TcDSCR-Like y control MOCK, se utilizó al anticuerpo primario anti-HA (1:100) y como anticuerpo secundario IgG-HRP anti cabra (1:5000). (B) se utilizaron los extractos totales de los parásitos transfectados establemente de pTREXn-TcDSCR3-Like-GFP y control pTREXnGFP, se evaluó la expresión utilizando el anticuerpo primario anti-GFP (1:3000) y al anticuerpo secundario IgG-HRP anti-ratón. Como control de carga se usó a β -tubulina (1:3000) y anticuerpo secundario IgG-HRP anti-ratón.

Posteriormente estos parásitos fueron utilizados para evaluar la localización subcelular mediante IFI. La localización de HA-TcDSCR3-Like fue evaluada utilizando un anticuerpo comercial dirigido contra la bandera de HA reconocido por el anticuerpo secundario Alexa-488, como control se utilizó a los parásitos MOCK. La localización también se evaluó mediante la observación de la expresión de la fusión TcDSCR3-Like-GFP y la GFP. El anticuerpo anti-HA mostró una localización de manera difusa en todo el citoplasma. Sin embargo, se observó a HA-TcDSCR3-Like en forma de puntos (tipo vesículas) en el parte posterior y anterior al núcleo (Figura 28, panel A) y como era esperado los parásitos MOCK no mostraron fluorescencia ya que éstos carecen de la etiqueta HA. Por otro lado, el mismo

fenómeno observado anteriormente se observó en los parásitos que expresan a TcDSCR3-Like-GFP, observándose la fluorescencia de manera difusa en todo el citoplasma y en particular en forma de puntos cercano al cinetoplasto y núcleo en el estadio de epimastigote, mientras que en los parásitos control, la GFP se localiza de manera difusa en todo el citoplasma (Figura 28, panel B). Estos resultados sugieren que TcDSCR3-Like se localiza en estructuras tipo vesiculares en todo el cuerpo del parásito y de manera concentrada muy cercana al núcleo y cinetoplasto.

Localización de TcDSCR3-Like durante un estímulo de invasión

En el trabajo de maestría (Rubio-Ortiz 2012) determinamos que los parásitos transfectados estables que expresan una secuencia AS contra *TcDSCR3-Like* tienen un efecto severo en la capacidad de invadir a la célula hospedera. Una vez que evaluamos la localización subcelular de TcDSCR3-Like, procedimos a evaluar qué pasa con la localización de TcDSCR3-Like cuando se le da un estímulo de invasión. Para esto, los parásitos TcDSCR3-Like-GFP fueron o no expuestos a interactuar con la célula blanco (fibroblastos 3T3/NIH) durante 48 horas y posteriormente los parásitos fueron tratados para ensayos de inmunofluorescencia. Como control se utilizaron los parásitos que expresan a GFP.

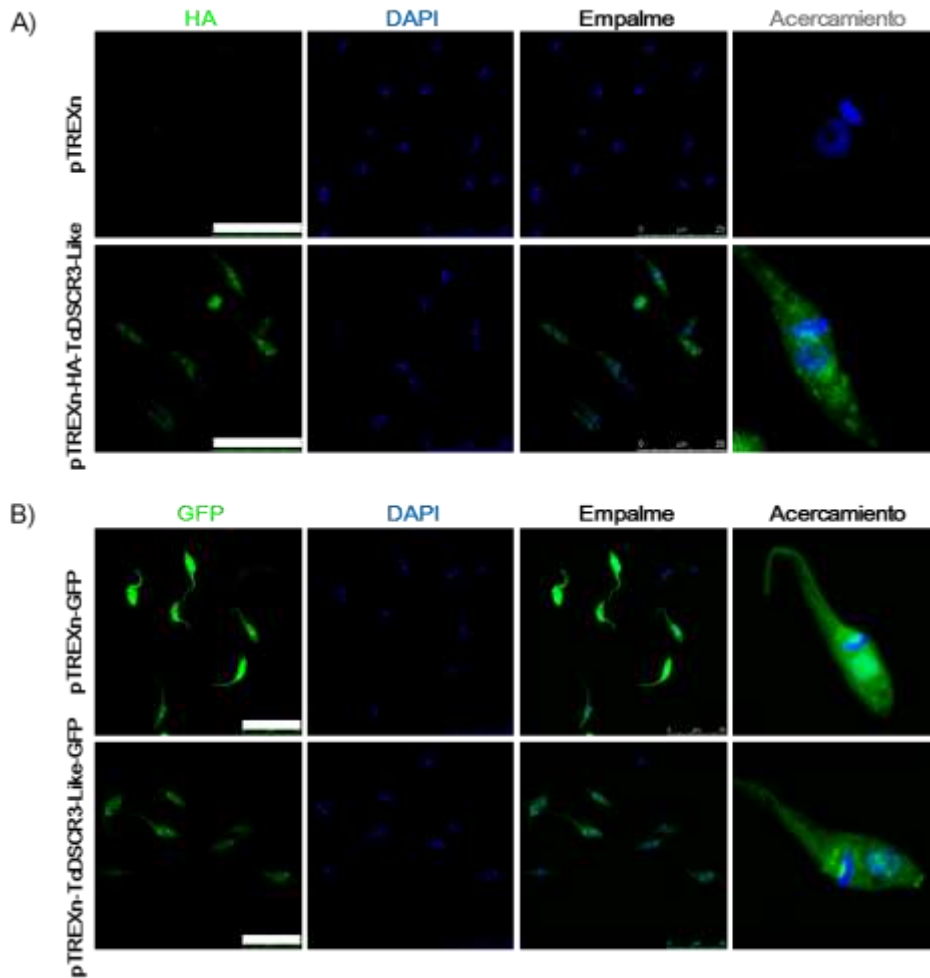


Figura 28. Localización subcelular de TcDSCR3-Like en el estadio de epimastigote. La localización se determinó por inmunofluorescencia evaluando la localización de las proteínas ectópicas HA-TcDSCR3-Like y TcDSCR3-LikeGFP. A) Localización de HA-TcDSCR3-Like, como control se usó a epimastigotes pTREXn. Se utilizó al anticuerpo primario anti HA (1:100), el cual fue marcado usando el anticuerpo secundario Alexa-488 anti-ratón. B) Localización de TcDSCR3-Like-GFP. Como control se usó la expresión de la GFP. El núcleo y el cinetoplasto se tiñó usando DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Barra = 25 μ m

Los resultados de este ensayo muestran que cuando no existe un estímulo, TcDSCR3-Like se localiza de manera difusa por todo el cuerpo del parásito pero principalmente en forma de estructuras tipo vesículas, cercanas al núcleo y

cinetoplasto. Sin embargo, cuando estos parásitos están bajo un estímulo de invasión (interacción con la célula blanco) la proteína TcDSCR3-Like se reorganiza para formar un mayor número de estructuras punteadas y con una mayor intensidad (Figura 29), en contraste con el control en el cual no se observa cambio alguno en la localización de la proteína verde fluorescente, observándose de manera difusa por todo el cuerpo del parásito. Estos resultados junto con los resultados obtenidos en la maestría sugieren que TcDSCR3-Like pudiera tener un papel importante durante el proceso de invasión del parásito a la célula blanco.

TcDSCR3-Like co-localiza con marcadores de endosomas tempranos (EEA-1)

A HsDSCR3, al igual que otras proteínas del clan de las Arrestinas, se le atribuye una localización endosomal. Tomando en cuenta el resultado anterior en donde TcDSCR3-Like tiene una localización en estructuras tipo vesículas, procedimos a evaluar mediante inmunofluorescencia la co-localización con un marcador endosomal heterólogo (EEA-1), marcado con Alexa-546 anti-ratón. Utilizamos a la bandera de HA para marcar a TcDSCR3-Like y al anticuerpo secundario Alexa-488 anti-ratón.

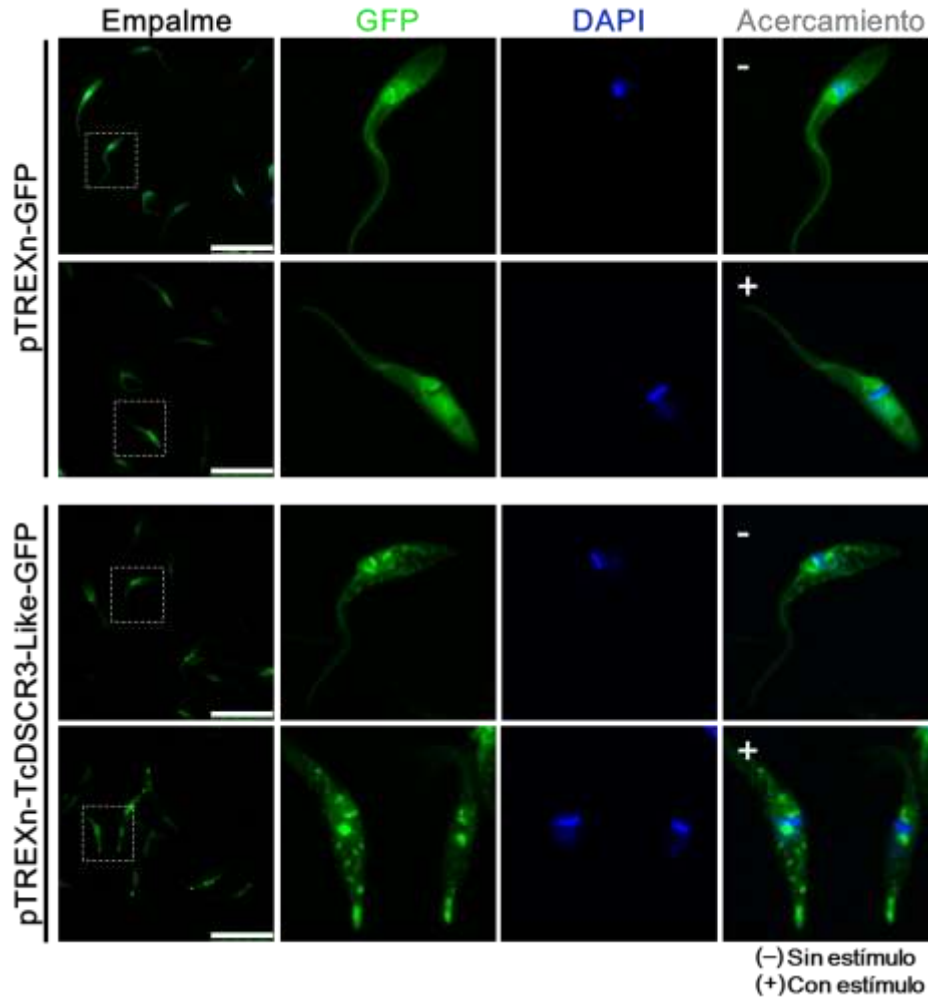


Figura 29. Localización de TcDSCR3-Like-GFP después de la interacción con la célula blanco (estímulo de invasión). La localización se evaluó en los parásitos que expresan ectópicamente a TcDSCR3-Like-GFP y el control GFP. El núcleo se tiñó con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Barra = 25 μ m

Los resultados muestran la co-localización de TcDSCR3-like con el marcador endosomal EEA-1, lo cual nos indica que TcDSCR3-Like tiene una localización endosomal como se ha reportado para otras proteínas del clan de las Arrestinas (Figura 30).

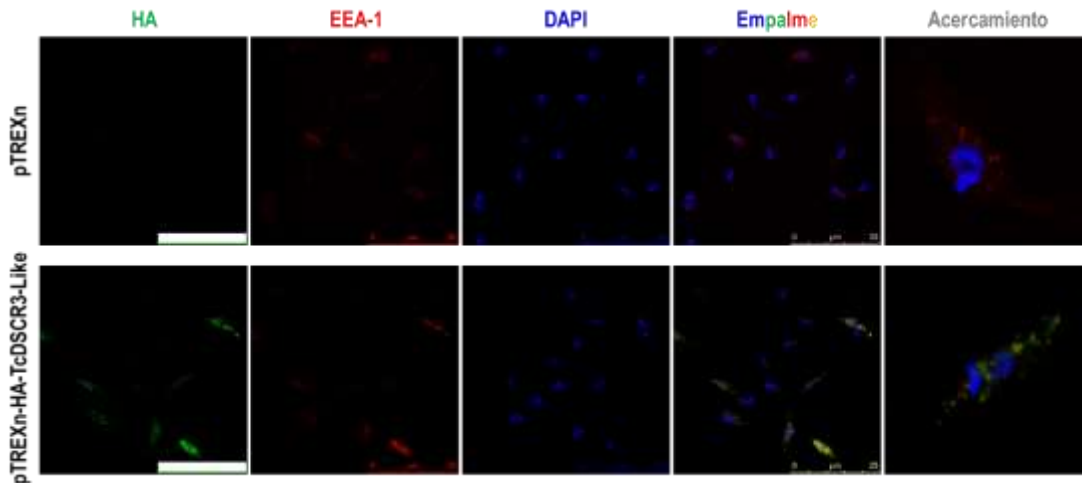


Figura 30. HA-TcDSCR3-Like co-localiza con endosomas tempranos en el estadio de epimastigotes. HA-TcDSCR3-Like fue marcado con el anticuerpo primario anti-HA (1:100) y marcado con Alexa-488 anti ratón (1:600). EEA-1 (anticuerpo primario, 1:200) fue marcado con Alexa-546 anti-ratón, como control se utilizó a los parásitos MOCK. Los núcleos fueron teñidos usando DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Barra= 25 μ m.

La capacidad endocítica de los parásitos que expresan a HA-TcDSCR3-Like se ve disminuida

Funcionalmente las proteínas agrupadas en el clan de las Arrestinas llevan a cabo un papel de proteína andamio en varios eventos de tráfico de proteínas de membrana, por lo que procedimos a evaluar el papel de TcDSCR3-Like en la actividad endocítica del parásito. Para llevar a cabo este ensayo se utilizó al estadio de epimastigote, ya que este es el estadio donde se ha reportado actividad endocítica del parásito (Porto-Carreiro, Attias et al. 2000). Para esto, los parásitos HA-TcDSCR3-Like vivos fueron puestos a incubar con transferrina conjugada con Alexa-594 y como control se utilizaron parásitos vivos MOCK. Posteriormente los

parásitos fijados fueron preparados para un ensayo de inmunofluorescencia, donde se marcó a la etiqueta de HA con el anticuerpo primario anti-HA (1:100), como anticuerpo secundario se utilizó a Alexa-488 anti-ratón (1:600). Como se muestra en la Figura 31, contrario a lo esperado la endocitosis de transferrina en los parásitos que expresan ectópicamente a HA-TcDSCR3-Like se ve disminuía cuando se compara con los parásitos MOCK, lo cual sugiere que la expresión de HA-TcDSCR3-Like afecta la actividad endocítica de manera negativa. Una posible explicación es que HA-TcDSCR3-Like sea un regulador negativo de la endocitosis o que la proteína ectópica esté actuando como una proteína dominante negativa y por ello el efecto observado durante la endocitosis.

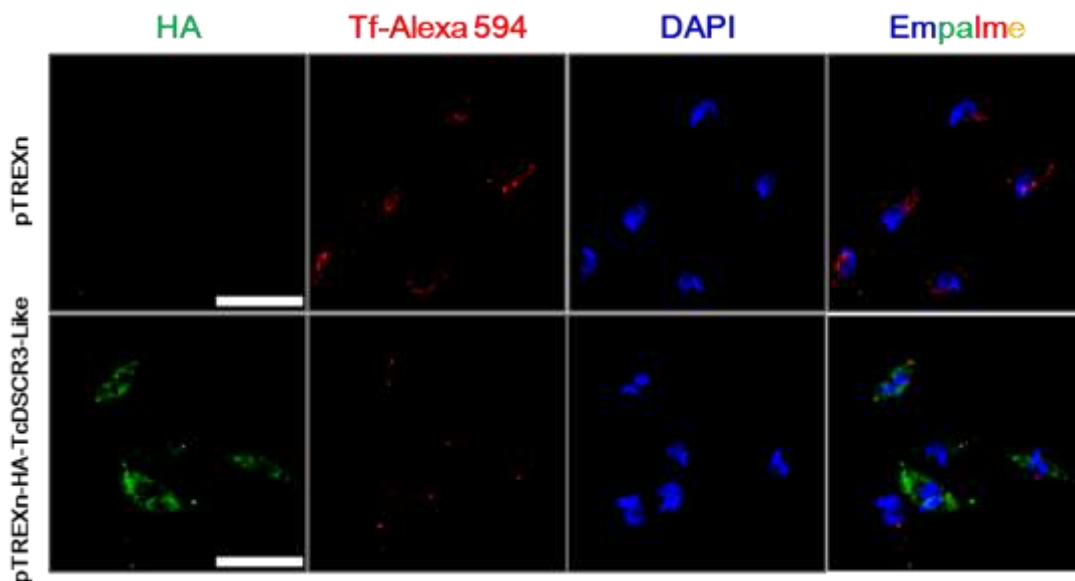


Figura 31. La expresión ectópica de HA-TcDSCR3-Like afecta la endocitosis de transferrina en el estadio de epimastigote. Inmunofluorescencia de los parásitos en donde se evaluó la endocitosis de transferrina conjugada con Alexa-594. La etiqueta de HA se marcó con Alexa-488. El nucleó fue teñido con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Barra= 10 μ m.

Para determinar si HA-TcDSCR3-Like actúa como una proteína dominante negativa evaluamos la capacidad de invasión, infección y diferenciación extracelular de los parásitos transfectantes estables de HA-TcDSCR3-Like y el control MOCK en infecciones primarias, iniciadas con epimastigotes. Primeramente se evaluó la capacidad de los parásitos de diferenciarse extracelularmente cuando se encuentran en interacción con la célula blanco. Como se muestra en la Figura 32 panel A, los parásitos que expresan ectópicamente a HA-TcDSCR3-Like disminuyen su eficiencia de transformación en un 87.5 % y 36 % hacia los estadios de tripomastigotes y amastigotes, respectivamente. Posteriormente evaluamos el proceso de invasión de los parásitos transfectantes estables de HA-TcDSCR3-Like. Para esto, los parásitos se colocaron a interaccionar con una monocapa de células 3T3/NIH durante 2 y 48 horas. Posteriormente se contó el número de parásitos que fueron capaces de ingresar a las células 3T3/NIH mediante un ensayo de inmunofluorescencia tiñendo el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos y el núcleo de las células, este se comparó con la imagen en campo claro para descartar contar parásitos extracelulares. Los resultados mostraron una diferencia significativa en la capacidad de invasión a las 2 horas, mientras que a las 48 horas solamente observamos una tendencia de menor infección de los parásitos pTREXn-HA-TcDSCR3-Like (Figura 32, panel B). Por ultimo evaluamos cómo se comportan estos parásitos durante una cinética de infección por 15 días en comparación con el control MOCK. Para esto los parásitos fueron puestos a interaccionar durante 48

horas con monocapas de células 3T3-NIH, posteriormente los parásitos que no entraron a la células fueron removidos mediante lavados exhaustivo y la cinética de infección se monitoreó y contó a partir del día 5 hasta el día 15 realizando el mismo procedimiento mencionado para el ensayo de invasión. Los resultados de la cinética mostraron que los parásitos pTREXn-HA-TcDSCR3-Like infectan menos eficientemente a la célula blanco en comparación al control MOCK (Figura 32, panel C). Una posible explicación a estos datos es que: 1) al tener una menor transformación extracelular a la forma infectiva de tripomastigote en los parásitos pTREXn-HA-TcDSCR3-Like se afecta la infección de las células en comparación con los parásitos control MOCK, o 2) que la expresión ectópica de HA-TcDSCR3-Like produce una dominante negativa, aunque los procesos de invasión e infección celular no se ven afectados en los mismos niveles como en caso de los parásitos KD, pero la diferenciación extracelular observada fue similar. Sin duda futuros experimentos de infección de células en cultivo iniciados con tripomastigotes, serán necesarios para validar las dos hipótesis planteadas anteriormente.

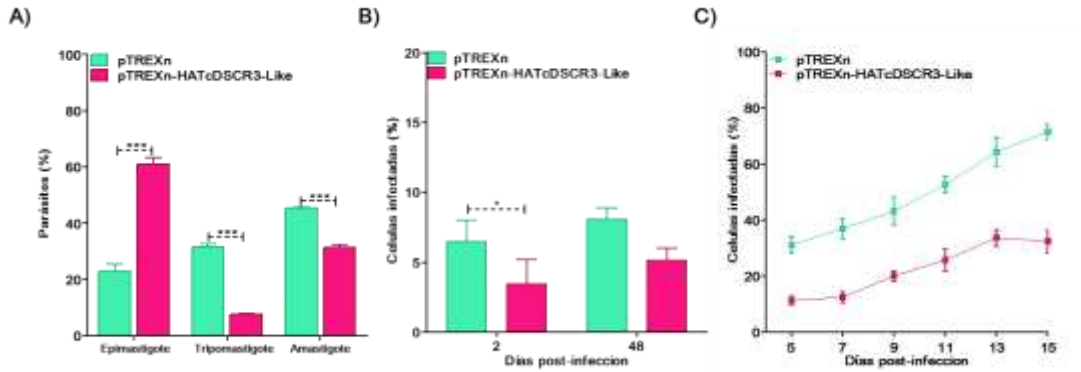


Figura 32. Análisis funcional de los parásitos HA-TcDSCR3-Like. A) Diferenciación extracelular. Los parásitos se colocaron a interactuar con células 3T3/NIH durante 48 horas. Posteriormente se contaron las formas de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes en el sobrenadante en una cámara de Neubauer. B) Ensayo de invasión. Los parásitos se interaccionaron durante 2 y 48 horas con las células blanco y posteriormente fueron tratados para inmunofluorescencia. Se tiñó con DAPI (DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) el núcleo y el cinetoplasto. C) Cinética de infección de los parásitos pTREXn-HA-TcDSCR3-Like y control MOCK. Los parásitos se interaccionaron por 48 horas con las células, se lavaron exhaustivamente y posteriormente cada tercer día. Media \pm SD, n=2. Anova * p <0.05, *** p <0.001.

Evaluación del interactoma de TcDSCR3-Like en ensayos *in vivo*

Con el objetivo de conocer las proteínas que interaccionan con TcDSCR3-Like *in vivo*, realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación utilizando a los parásitos que expresan ectópicamente a TcDSCR3-Like fusionada a HA. Anteriormente determinamos que la proteína ectópica se expresa en el estadio de epimastigote (Figura 27), por lo que procedimos a evaluar cuales proteínas interaccionan de manera natural con TcDSCR3-Like en condiciones de cultivo mediante su identificación por espectrometría de masas. Cabe mencionar que en el laboratorio en otro trabajo de doctorado se encuentran caracterizando a las

proteínas que interaccionan *in vivo* con TcDSCR3-Like durante el proceso de invasión, y se pretende realizar estudios comparativos de ambos resultados en un futuro cercano. Además, el epimastigote es el estadio en el cual se ha reportado actividad endocítica como se mencionó anteriormente. La endocitosis de los nutrientes del medio de cultivo podría darnos una idea de con qué proteínas TcDSCR3-Like se encuentra interaccionando y si participa en la endocitosis. Como control utilizamos a los parásitos MOCK. Debido a que carecemos de un anticuerpo específico contra TcDSCR3-Like, utilizamos a los parásitos que expresan de manera ectópica a la fusión en *TcDSCR3-Like* con la etiqueta de HA (pTREXn-HA-TcDSCR3-Like). Los extractos de inmunoprecipitación de HA-TcDSCR3-Like así como de pTREXn obtenidos usando el anticuerpo anti HA y control de IgG (anti-GST), así como el input (4 %) fueron separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 12 % y luego se tiñeron con plata para poder visualizar el patrón de proteínas co-precipitadas con los anticuerpos anti HA y control de IgG (anti-GST). En los resultados que se muestran en la Figura 33 panel A, se observó un patrón diferencial entre el control pTREXn y TcDSCR3-Like cuando se realizó la co-inmunoprecipitación con el anticuerpo anti HA, observándose como se esperaba una banda con una mayor intensidad en el peso molecular de ~35 kDa correspondiente a HA-TcDSCR3-Like, que no es observada en la muestra con parásitos control MOCK ni detectada en los resultados de secuenciación MS-MS. Para comprobar lo anterior, un gel de poliacrilamida cargado con los mismos

extractos se corrió electroforéticamente en las mismas condiciones y posteriormente fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente evaluar mediante WB el reconocimiento de la proteína de interés utilizando el anticuerpo anti HA. Los resultados de la Figura 33 panel B, muestra que el anticuerpo contra HA únicamente reconoce a una banda con un peso molecular aproximado de ~35 kDa (la cual corresponde a HA-TcDSCR3-Like) solamente en los extractos proteicos de HA-TcDSCR3-Like precipitados con el anticuerpo de HA y en el input. Estos resultados demuestran la especificidad del anticuerpo utilizado para llevar a cabo el ensayo de inmunoprecipitación. En la Figura 33 panel C, se muestran la integridad de los extractos co-precipitados con el anticuerpo anti-HA del control MOCK y HA-TcDSCR3-Like que se enviaron micro-secuenciar.

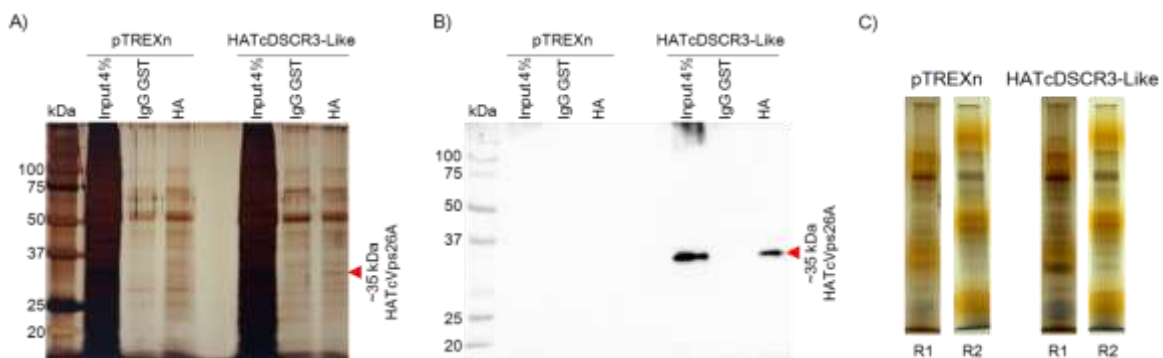


Figura 33. Patrón de bandeo diferencial y reconocimiento de la bandera de HA en los extractos inmunoprecipitados. A) Tinción con plata de los patrones de bandeo de las proteínas co-precipitadas en los extractos HA-TcDSCR3-Like y pTREXn. B) WB utilizando el anticuerpo anti-HA para reconocer a la proteína quimérica HA-TcDSCR3-Like y para evaluar la especificidad del experimento de Co-IP. C) Extractos teñidos con plata que muestran la integridad de las muestras, las cuales fueron enviadas secuenciar por espectrometría de masas MS-MS.

Análisis MS-MS de los productos Co-IP junto con HA-TcDSCR3-Like con el anticuerpo anti-HA

El análisis de los resultados obtenidos por espectrometría de masas después de eliminar las proteínas también encontradas en el control MOCK, arrojó un total de 212 proteínas como posibles candidatos de interacción con TcDSCR3-Like. De las cuales el 77 % corresponden a proteínas anotadas con una probable función y los 23 % restantes correspondieron a proteínas hipotéticas, es decir no se conoce la función de estas proteínas (Figura 34).

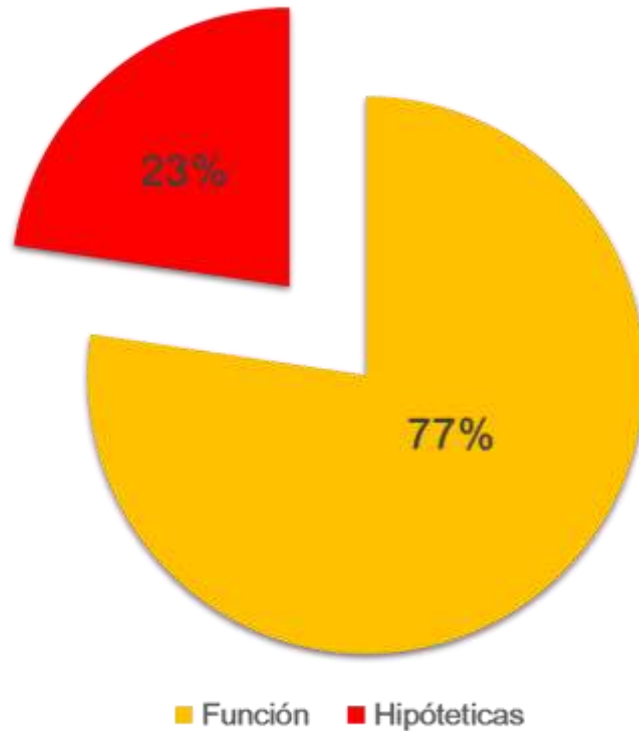


Figura 34. Clasificación de las proteínas analizadas *in silico* entre proteínas con función conocida o como proteína hipotética.

Mediante el análisis de *Gene Ontology* (GO), basado en las tres principales categorías de GO asociados al componente celular, proceso biológico y función molecular, evaluamos cómo se clasifican las proteínas obtenidas en el interactoma de TcDSCR3-Like (Figura 35), los términos GO se conservaron en inglés. En particular, en la categoría de Función Molecular (*Molecular Function*) se encontraron un mayor número de proteínas asociadas a unión (*Binding*) y actividad catalítica (*catalytic activity*), sin embargo también se pueden observar categorías como actividad transportadora (*Transport activity*) y actividad de molécula estructural (*Structural molecule activity*). En la categoría de componente celular (*Cellular Component*), se encontró un mayor número de proteínas con los términos de parte celular (*Cell part*) y complejo macromolecular (*Macromolecular complex*), en esta categoría también se observó a la categoría parte de membrana (*Membrane part*). Finalmente en la categoría de proceso biológico (*Biological process*), el análisis mostró un mayor número de proteínas que se clasifican en el proceso celular y metabólico (*Cellular, Metabolic process*). Este resultado es un tanto esperado ya que las muestras de las cuales partimos son parásitos mantenidos en cultivo donde se espera que el proceso metabólico esté activo. Otras categorías que fueron observadas fue la regulación biológica (*Biological regulation*) y localización (*Localization*). En conjunto estos datos sugieren que las proteínas obtenidas en la co-inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-HA tienen funciones putativas asociadas a la unión y transporte de macromoléculas.

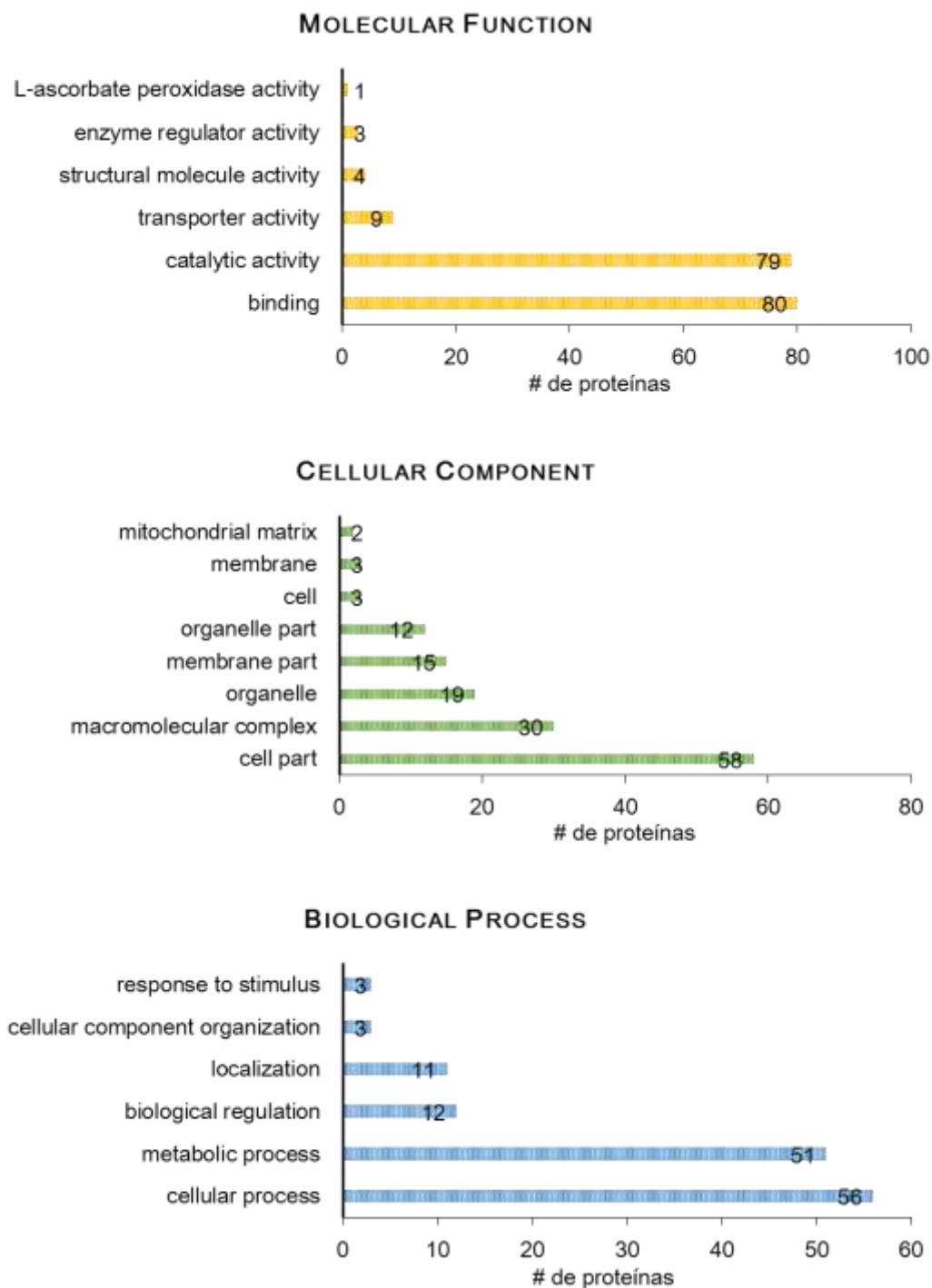


Figura 35. Análisis de las proteínas obtenidas en el ensayo de co-inmunoprecipitación mediante *Gene Ontology* (GO). Graficas de barras que muestran el número de proteínas identificadas en términos GO en las categorías de función molecular (*Molecular Function*), proceso biológico (*Biological process*) y componente celular (*Cellular Component*). Los términos GO se conservaron en inglés.

VIII. Discusión

T. cruzi es un parásito con un complejo ciclo de vida digénico, durante el cual se expone a diversos cambios microambientales que detonan los diversos procesos de diferenciación que le permiten completar su ciclo biológico. De este modo lleva a cabo el establecimiento de la enfermedad de Chagas en el humano, una enfermedad altamente incapacitante y mortal, clasificada dentro las 13 principales enfermedades tropicales desatendidas.

Para poder estudiar el proceso de diferenciación que participa en el establecimiento de la patología de la enfermedad de Chagas, en nuestro laboratorio se estableció un sistema *in vitro* de amastigogénesis secundaria (diferenciación de tripomastigotes sanguíneos a amastigotes) altamente sincrónico que permite obtener formas intermedias puras. De este modo, se obtuvo una forma intermedia a partir de la cual se llevó a cabo la construcción de una biblioteca de substracción. De esta biblioteca se obtuvo una clona que alinea en un 99 % con la secuencia hipotética conservada anotada como TcCLB.506941.210 (TritrypDB) / XM_813993.1 (NCBI), la cual durante mi trabajo de maestría fue caracterizada funcionalmente mediante un enfoque de ARNm antisentido. Esta proteína hipotética mostró tener un papel importante para la diferenciación extracelular y la invasión de *T. cruzi* a la célula blanco (Rubio-Ortiz 2012). Por lo que se decidió continuar con la caracterización de esta proteína, en este trabajo de doctorado.

Más del 50 % del genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener han sido anotadas como "proteínas hipotéticas". En la base de datos TriTryp existen más de 105,060 genes que codifican para proteínas de los cuales 62,068 corresponden a proteínas hipotéticas (59 %). En el caso específico de *T. cruzi*, existen en la base de datos del genoma 11,062 proteínas hipotéticas (56 %) las cuales corresponden a 6,526 genes diferentes, esto significa que la función es desconocida y se necesita la caracterización de las mismas, ya que esto contribuirá al entendimiento de la patogénesis molecular de *T. cruzi* (Martins, Reis-Cunha et al. 2011, Silber and Pereira 2012). En este trabajo llevamos a cabo la identificación, clonación y caracterización de la secuencia hipotética conservada anotada como TcCLB.506941.210 (TritrypDB) / XM_813993.1 (NCBI) en el genoma del parásito. Mediante análisis *in silico* proponemos que la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 corresponde a DSCR3 de *T. cruzi*, pues presenta las características para poder clasificarla como TcDSCR3. Tales como la presencia de los dominios E-set (SSF81296, 6.2×10^{-7} , dominio tipo sándwich de hojas betas similar al de las inmunoglobulinas, análogo al dominio N-Arrestina pfam00339) y el dominio Vps26 (pfam03643, $e = 4.3 \times 10^{-18}$), un modelado de estructuras secundarias y tridimensional semejantes con un 30.76 % de identidad entre las secuencias aminoacídicas y además la superposición de las estructuras tridimensionales de HsDSCR3 y TcDSCR3 que son muy similares.

DSCR3 es un gen que se identificó en el cromosoma 21, específicamente en la región crítica del Síndrome de Down (DSCR), particularmente en la región distal del brazo largo del cromosoma 21 (21q22), se ha propuesto que los genes localizados en esta región son los responsables en su mayoría de las características fenotípicas del Síndrome de Down, sin embargo no existen reportes acerca de la asociación directa de DSCR3 con el Síndrome de Down (Nakamura, Hattori et al. 1997, Toyoda, Noguchi et al. 2002). DSCR3 contiene el dominio pfam03643 que corresponde a las proteínas Vps26. Estructuralmente estas dos proteínas adquieren un plegamiento muy similar al que presenta la familia de proteínas denominadas Arrestinas, las cuales se caracterizan por presentar un dominio N-Arrestina (también presente en DSCR3) y C-Arrestina con una estructura tipo sándwich beta similar al de las inmunoglobulinas (Aubry, Guetta et al. 2009). Análisis filogenéticos consideran a DSCR3 como un parálogo de la proteína Vps26 pues el clado DSCR3 se separa tempranamente del clado Vps26, además se ha considerado a DSCR3 como un enlace perdido entre el clado de las Arrestinas y Vps26. Debido a la conservación de su estructura tridimensional se han clasificado a estas proteínas: Arrestinas, Vps26, DSCR3 así como otras proteínas (ARRDCs y ARTs) dentro del clan de las Arrestinas. En mamíferos, existen reportadas al menos 12 proteínas que pertenecen a la familia de las Arrestinas y estas proteínas también se han descrito en organismos como *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Saccharomyces* y *Dictyostelium*. Funcionalmente estas proteínas están involucradas en múltiples procesos,

particularmente los que están relacionados a tráfico endosomal, clasificación de vesículas y señalización (de Mendoza, Sebé-Pedrós et al. 2014). Las proteínas de esta familia tienen una localización citoplasmática cuando se encuentran de forma inactiva, y cuando se activan son reclutadas al sitio de acción en donde presentan similitudes y diferencias entre los mecanismos funcionales.

T. cruzi es un organismo que se caracteriza por presentar un cinetoplasto y un flagelo al igual que otros miembros de la familia *Trypanosomatidae* como *T. brucei* y *Leishmania*. Si bien *T. cruzi* comparte muchas características con los otros cinetoplastidos, este presenta algunas peculiaridades. Como en el caso de la endocitosis / exocitosis, que en contraste con la mayoría de los eucariontes, los tripanosomátidos presentan un sistema de endocitosis / exocitosis altamente polarizado, en donde los orgánulos que participan en estos procesos mantienen una posición conservada en el citoplasma. A diferencia de *T. brucei* y *Leishmania*, los cuales llevan a cabo el proceso de endocitosis / exocitosis a través de la bolsa flagelar y en donde no se cuenta con el ortólogo de DCSR3, *T. cruzi* presenta además de la bolsa flagelar un segundo sitio de endocitosis / exocitosis denominado citostoma, en el que probablemente TcDSCR3 tenga un papel en el tráfico de proteínas. Además, la diferencia en la distribución topográfica de los compartimentos endocíticos en los diferentes cinetoplastidos y en las formas de desarrollo, es sorprendente. Si bien se conoce la ruta y los orgánulos involucrados

en el proceso de endocitosis / exocitosis en *T. cruzi* son pocas las proteínas reportadas que participan en este proceso. Mediante ensayos de IFI determinamos que TcDSCR3 tiene una localización citoplasmática, principalmente en estructuras tipo vesículas, estas estructuras se encuentran distribuidas por todo el cuerpo del parásito. Sin embargo, también observamos un punto bien definido cerca de la zona donde se encuentran los sitios de la bolsa flagelar y el citostoma del epimastigote de *T. cruzi*. En esta zona o cercana a ella se han descrito otras proteínas que participan en la endocitosis de *T. cruzi*, tales como Clatrina, TcVps34, Rab11 y Rab32 (Correa, Atella et al. 2007, Schoijet, Miranda et al. 2008, Niyogi, Mucci et al. 2014, Niyogi, Jimenez et al. 2015). De igual manera determinamos que cuando el parásito se expone a un estímulo de invasión TcDSCR3 se reorganiza para formar un mayor número de estructuras tipo vesículas, sugiriendo que TcDSCR3 podría tener un papel en el tráfico de proteínas. En este trabajo también encontramos que la expresión ectópica de HA-TcDSCR3-Like disminuye la endocitosis de transferrina. Se sabe que esta proteína en el epimastigote de *T. cruzi* es endocitada a través de un mecanismo dependiente de receptor principalmente por el citostoma del parásito. Un fenómeno también observado con la expresión ectópica de la proteína TcVps34 fusionada a la bandera de histidinas (Schoijet, Miranda et al. 2008). Este resultado por lo tanto apoya la idea de la participación de TcDSCR3-Like en el proceso de endocitosis mediado por receptor en el citostoma de *T. cruzi*. Experimentalmente DCSR3 se localizó en el núcleo en células de mamífero, pero también se ha inferido

que puede estar presente en el endosoma, citosol y mitocondria. El análisis de co-localización utilizando el marcador endosomal EEA-1, mostró que TcDSCR3 tiene una co-localización endosomal, además la localización de TcDSCR3-GFP se observa muy cercana al núcleo y cinetoplasto del parásito, lo cual podría sugerir al igual que DSCR3, que TcDSCR3-Like podría tener un papel relacionado con el núcleo. Los resultados del interactoma de TcDSCR3-Like apoyan esta posibilidad, ya que se co-inmunoprecipitaron algunas proteínas que participan en diversos procesos dentro del núcleo (Como factores de inicio de la transcripción putativos [5 proteínas identificadas], factores de elongación putativos [6 proteínas identificadas], proteínas de unión al ARN [5 proteínas identificadas], proteína nucleolar 56, putativa, Importina Subunidad alfa). Recientemente en 2017, se describió que DSCR3 es parte del complejo *retriever*, el cual es un complejo heterotrimérico compuesto por Vps29, C16orf62 y DSCR3. Este complejo guarda mucha similitud con el complejo *retromer* (complejo heterotrimérico compuesto por Vps29, Vps35 y Vps26) pues ambos complejos comparten una arquitectura y composición similar, ambos son heterotriméricos, contienen la subunidad Vps29, una proteína con repetidos HEAT (C16orf62/ Vps35, respectivamente) y una proteína con un plegamiento como el de las Arrestinas (DSCR3/Vps26). Sin embargo, el mecanismo funcional es diferente pues el complejo *retriever* se encarga de prevenir la degradación lisosomal y promover el reciclamiento hacia la membrana plasmática, mientras que el complejo *retromer* lleva a cabo el reciclamiento del endosoma hacia

el aparato de Golgi o la membrana plasmática. El complejo *retromer* se encuentra presente en todas las células eucariotas a diferencia del complejo *retriever* pues DSCR3 se pierde en muchas especies, en el caso particular de tripanosomatidos DSCR3 se pierde en *T. brucei* y *leishmania*. Para llevar su función, ambos complejos interactúan con proteínas accesorias, como son SNXs, Rabs, actina o proteínas de los complejos CCC y WASH (Schoijet, Miranda et al. 2008, Koumandou, Klute et al. 2011, McNally, Faulkner et al. 2017). El objetivo de obtener el interactoma de TcDSCR3-Like es saber si es parte del complejo *retriever* en *T. cruzi*. Sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo no encontramos a las proteínas Vps29 y C16orf62, subunidades del complejo *retriever*. Nosotros proponemos que lo anterior se debe a que el complejo *retriever* se activa cuando el parásito se coloca bajo un estímulo de invasión (trabajo de doctorado en proceso). Sin embargo, interesantemente en nuestros resultados del interactoma pudimos encontrar algunas proteínas con actividad transportadora (Protón ATPasa subunidad C Tipo-V, Protón ATPasa subunidad A Tipo-V, ATP sintasa Vacuolar, subunidad B).

En resumen, en este trabajo se identificó a TcDSCR3 una proteína que se localiza en estructuras tipo vesículas en el endosoma y que podría tener un papel importante en la endocitosis mediada por receptor de transferrina.

IX. Conclusión

Mediante análisis *in silico* determinamos que la secuencia hipotética TcCLB.506941.210 corresponde a TcDSCR3-Like de *T. cruzi*, la cual presenta una localización en estructura tipo vesículas, localizada entre el núcleo y cinetoplasto de *T. cruzi*. Esta proteína además mostró tener una co-localización endosomal, en donde podría participar en el transporte de proteínas.

X. Perspectivas.

c_w Evaluar la participación de TcDSCR3-Like en las infecciones secundarias utilizando tripomastigotes.

c_w Obtener el anticuerpo contra TcDSCR3-Like

c_w Analizar los resultados del interactoma de TcDCSR3-Like durante el estímulo de invasión con los resultados obtenidos en este trabajo.

c_w Determinar si TcDSCR3-Like es parte del complejo *retriever*

c_w Determinar el mecanismo por el cual TcDSCR3-Like participa en la endocitosis en *T. cruzi*

XI. Bibliografia

Alvarez, C. E. (2008). "On the origins of arrestin and rhodopsin." BMC Evolutionary Biology **8**: 222-222.

Andersson, B. (2011). "The Trypanosoma cruzi genome; conserved core genes and extremely variable surface molecule families." Res Microbiol **162**(6): 619-625.

Araripe, J. R., N. L. Cunha e Silva, S. T. Leal, W. de Souza and E. Rondinelli (2004). "Trypanosoma cruzi: TcRAB7 protein is localized at the Golgi apparatus in epimastigotes." Biochemical and Biophysical Research Communications **321**(2): 397-402.

Atwood, J. A., 3rd, D. B. Weatherly, T. A. Minning, B. Bundy, C. Cavola, F. R. Opperdoes, R. Orlando and R. L. Tarleton (2005). "The Trypanosoma cruzi proteome." Science **309**(5733): 473-476.

Aubry, L., D. Guetta and G. Klein (2009). "The Arrestin Fold: Variations on a Theme." Current Genomics **10**(2): 133-142.

Aubry, L. and G. Klein (2013). Chapter Two - True Arrestins and Arrestin-Fold Proteins: A Structure-Based Appraisal. Progress in Molecular Biology and Translational Science. L. M. Luttrell, Academic Press. **118**: 21-56.

Brener, Z. and E. Chiari (1963). "[Morphological Variations Observed in Different Strains of Trypanosoma Cruzi]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **5**: 220-224.

Burleigh, B. A. and N. W. Andrews (1995). "The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells." Annu Rev Microbiol **49**: 175-200.

Clayton, C., T. Häusler and J. Blattner (1995). "Protein trafficking in kinetoplastid protozoa." Microbiological Reviews **59**(3): 325-344.

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

Contreras, V. T., A. R. Lima and M. C. Navarro (2006). "Morfogénesis de *Trypanosoma cruzi*: Factores relevantes para la diferenciación in vitro." Acta biológica venezolana **26**(2): 49-60.

Contreras, V. T., C. M. Morel and S. Goldenberg (1985). "Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." Mol Biochem Parasitol **14**(1): 83-96.

Contreras, V. T., M. C. Navarro, A. R. De Lima, R. Arteaga, F. Duran, J. Askue and Y. Franco (2002). "Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(8): 1213-1220.

Correa, J. R., G. C. Atella, R. S. Menna-Barreto and M. J. Soares (2007). "Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites." J Eukaryot Microbiol **54**(3): 297-302.

Coura, J. R. and P. A. Vinas (2010). "Chagas disease: a new worldwide challenge." Nature **465**(7301): S6-7.

de Mendoza, A., A. Sebé-Pedrós and I. Ruiz-Trillo (2014). "The Evolution of the GPCR Signaling System in Eukaryotes: Modularity, Conservation, and the Transition to Metazoan Multicellularity." Genome Biology and Evolution **6**(3): 606-619.

de Souza, W., T. U. de Carvalho, M. Benchimol and E. Chiari (1978). "*Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake." Experimental Parasitology **45**(1): 101-115.

Ferella, M., D. Nilsson, H. Darban, C. Rodrigues, E. J. Bontempi, R. Docampo and B. Andersson (2008). "Proteomics in *Trypanosoma cruzi*--localization of novel proteins to various organelles." Proteomics **8**(13): 2735-2749.

Fernandes, M. C. and N. W. Andrews (2012). "Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence." FEMS Microbiol Rev **36**(3): 734-747.

Ferrao, P. M., F. L. de Oliveira, W. M. Degrave, T. C. Araujo-Jorge, L. Mendonca-Lima and M. C. Waghbi (2012). "A phosphoproteomic approach towards the understanding of the role of TGF-beta in *Trypanosoma cruzi* biology." PLoS One **7**(6): e38736.

Figueiredo, R. C., D. S. Rosa and M. J. Soares (2000). "Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress." J Parasitol **86**(6): 1213-1218.

Florencio-Martinez, L., C. Marquez-Duenas, G. Ballesteros-Rodea, S. Martinez-Calvillo and R. Manning-Cela (2010). "Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **126**(3): 332-336.

Gourbiere, S., P. Dorn, F. Tripet and E. Dumonteil (2012). "Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control." Heredity (Edinb) **108**(3): 190-202.

Guzmán Bracho, C., García García, Lourdes, Floriani Verdugo, Jorge, Guerrero Martínez, Sandra, Torres Cosme, Mario, Ramírez Melgar, Carmen, Velasco Castrejón, Oscar (1998). "Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México." Rev Panam Salud Publica **4**(2): 94-99.

Haft, C. R., M. d. I. L. Sierra, R. Bafford, M. A. Lesniak, V. A. Barr and S. I. Taylor (2000). "Human Orthologs of Yeast Vacuolar Protein Sorting Proteins Vps26, 29, and 35: Assembly into Multimeric Complexes." Molecular Biology of the Cell **11**(12): 4105-4116.

Hernandez-Osorio, L. A., C. Marquez-Duenas, L. E. Florencio-Martinez, G. Ballesteros-Rodea, S. Martinez-Calvillo and R. G. Manning-Cela (2010). "Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms." J Biomed Biotechnol **2010**: 283842.

Herrador, A., S. Herranz, D. Lara and O. Vincent (2010). "Recruitment of the ESCRT Machinery to a Putative Seven-Transmembrane-Domain Receptor Is Mediated by an Arrestin-Related Protein." Molecular and Cellular Biology **30**(4): 897-907.

Hirsch, J. A., C. Schubert, V. V. Gurevich and P. B. Sigler "A Model for Arrestin's Regulation: The 2.8 Å Crystal Structure of Visual Arrestin." Cell **97**(2): 257-269.

Hu, Y.-H., H.-J. Warnatz, D. Vanhecke, F. Wagner, A. Fiebitz, S. Thamm, P. Kahlem, H. Lehrach, M.-L. Yaspo and M. Janitz (2006). "Cell array-based intracellular localization screening reveals novel functional features of human chromosome 21 proteins." BMC Genomics **7**: 155-155.

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

Koumandou, V. L., M. J. Klute, E. K. Herman, R. Nunez-Miguel, J. B. Dacks and M. C. Field (2011). "Evolutionary reconstruction of the retromer complex and its function in *Trypanosoma brucei*." Journal of Cell Science **124**(9): 1496-1509.

Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016). "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." Mol Biol Evol **33**(7): 1870-1874.

Landfear, S. M. and M. Ignatushchenko (2001). "The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids." Molecular and Biochemical Parasitology **115**(1): 1-17.

Landfear, S. M., K. D. Tran and M. A. Sanchez (2015). "Flagellar Membrane Proteins in Kinetoplastid Parasites." IUBMB life **67**(9): 668-676.

Lescure, F. X., G. Le Loup, H. Freilij, M. Develoux, L. Paris, L. Brutus and G. Pialoux (2010). "Chagas disease: changes in knowledge and management." Lancet Infect Dis **10**(8): 556-570.

Levine, N. D., J. O. Corliss, F. E. Cox, G. Deroux, J. Grain, B. M. Honigberg, G. F. Leedale, A. R. Loeblich, 3rd, J. Lom, D. Lynn, E. G. Merinfeld, F. C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra and F. G. Wallace (1980). "A newly revised classification of the protozoa." J Protozool **27**(1): 37-58.

Lopes, A., M. T Gomes, F. L Dutra, A. Vermelho, J. Meyer-Fernandes, M. Silva-Neto, T. Souto-Padrón and D. P Vieira (2010). Intracellular Signaling Pathways Involved in Cell Differentiation in Trypanosomatids.

Málaga, S. and N. Yoshida (2001). "Targeted Reduction in Expression of Trypanosoma cruzi Surface Glycoprotein gp90 Increases Parasite Infectivity." Infection and Immunity **69**(1): 353-359.

Martins, C., J. L. Reis-Cunha, M. N. Silva, E. G. Pereira, G. J. Pappas, Jr., D. C. Bartholomeu and B. Zingales (2011). "Identification of genes encoding hypothetical proteins in open-reading frame expressed sequence tags from mammalian stages of Trypanosoma cruzi." Genet Mol Res **10**(3): 1589-1630.

Maslov, D. A. and L. Simpson (1995). "Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa." Parasitology Today **11**(1): 30-32.

McNally, K. E., R. Faulkner, F. Steinberg, M. Gallon, R. Ghai, D. Pim, P. Langton, N. Pearson, C. M. Danson, H. Nagele, L. L. Morris, A. Singla, B. L. Overlee, K. J. Heesom, R. Sessions, L. Banks, B. M. Collins, I. Berger, D. D. Billadeau, E. Burstein and P. J. Cullen (2017). "Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling." Nat Cell Biol **19**(10): 1214-1225.

Minning, T. A., J. Bua, G. A. Garcia, R. A. McGraw and R. L. Tarleton (2003). "Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in Trypanosoma cruzi." Mol Biochem Parasitol **131**(1): 55-64.

Nakamura, A., M. Hattori and Y. Sakaki (1997). "Isolation of a Novel Human Gene from the Down Syndrome Critical Region of Chromosome 21q22.2." The Journal of Biochemistry **122**(4): 872-877.

Navarro, M. C., A. R. De Lima, J. Askue and V. T. Contreras (2003). "Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(1): 83-91.

Niyogi, S., V. Jimenez, W. Girard-Dias, W. de Souza, K. Miranda and R. Docampo (2015). "Rab32 is essential for maintaining functional acidocalcisomes, and for growth and infectivity of *Trypanosoma cruzi*." Journal of Cell Science **128**(12):2363-2373.

Niyogi, S., J. Mucci, O. Campetella and R. Docampo (2014). "Rab11 Regulates Trafficking of Trans-sialidase to the Plasma Membrane through the Contractile Vacuole Complex of *Trypanosoma cruzi*." PLoS Pathogens **10**(6): e1004224.

Okura, M., J. Fang, M. L. Salto, R. S. Singer, R. Docampo and S. N. Moreno (2005). "A lipid-modified phosphoinositide-specific phospholipase C (TcPI-PLC) is involved in differentiation of trypomastigotes to amastigotes of *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **280**(16): 16235-16243.

OMS. (2017). "Nota Descriptiva." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.

OPS. (2017). "Enfermedad de Chagas en las Américas para los trabajadores de salud pública." from <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com>.

Parsons, M. and L. Ruben (2000). "Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids." Parasitol Today **16**(2): 56-62.

Pellegrini-Calace, M. and A. Tramontano (2006). "Identification of a novel putative mitogen-activated kinase cascade on human chromosome 21 by computational approaches." Bioinformatics **22**(7): 775-778.

Perez-Molina, J. A. and I. Molina (2018). "Chagas disease." Lancet **391**(10115): 82-94.

Peterson, Y. K. and L. M. Luttrell (2017). "The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling." Pharmacological Reviews **69**(3): 256.

Pinheiro, E., L. Brum-Soares, R. Reis and J. C. Cubides (2017). "Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America." Rev Soc Bras Med Trop **50**(3): 296-300.

Porto-Carreiro, I., M. Attias, K. Miranda, W. De Souza and N. Cunha-e-Silva (2000). "Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes." European Journal of Cell Biology **79**(11): 858-869.

Ramsey, J. M. and C. J. Schofield (2003). "Control of Chagas disease vectors." Salud Pública de México **45**(2).

Rassi, A., Jr., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." Lancet **375**(9723): 1388-1402.

Rubio-Ortiz, M. (2012). Evaluación de la participación de TcPAR-2, TcArrestina, TcPTS-1 y Tc40s-S33 en el proceso de diferenciación de Trypanosoma cruzi.

Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-425.

Salazar-Schettino, P. M., M. I. Bucio-Torres, M. Cabrera-Bravo, M. C. de Alba-Alvarado, D. R. Castillo-Saldaña, E. A. Zenteno-Galindo, J. Rojo-Medina, N. A. Fernández-Santos and M. G. Perera-Salazar (2016). Enfermedad de Chagas en México. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. **59**.

Sales Junior, P. A., I. Molina, S. M. Fonseca Murta, A. Sanchez-Montalva, F. Salvador, R. Correa-Oliveira and C. M. Carneiro (2017). "Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review." Am J Trop Med Hyg **97**(5): 1289-1303.

Sambrook, J. and R. W. Russell (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold spring harbor laboratory press.

Sánchez-Cruz., D. (2009). Análisis de la expresión diferencial de tripomastigotes y una forma intermedia de Trypanosoma cruzi.

Schmunis, G. A. (2007). "Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration." Mem Inst Oswaldo Cruz **102 Suppl 1**: 75-85.

Schoijet, A. C., K. Miranda, W. Girard-Dias, W. de Souza, M. M. Flawiá, H. N. Torres, R. Docampo and G. D. Alonso (2008). "A Trypanosoma cruzi Phosphatidylinositol 3-Kinase (TcVps34) Is Involved in Osmoregulation and Receptor-mediated Endocytosis." The Journal of Biological Chemistry **283**(46): 31541-31550.

Shi, H., R. Rojas, J. S. Bonifacino and J. H. Hurley (2006). "The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain." Nature structural & molecular biology **13**(6): 540-548.

Shukla, A. K., A. Manglik, A. C. Kruse, K. Xiao, R. I. Reis, W.-C. Tseng, D. P. Staus, D. Hilger, S. Uysal, L.-Y. Huang, M. Paduch, P. Tripathi-Shukla, A. Koide, S. Koide, W. I. Weis, A. A. Kossiakoff, B. K. Kobilka and R. J. Lefkowitz (2013). "Structure of active β -arrestin1 bound to a G protein-coupled receptor phosphopeptide." Nature **497**(7447): 137-141.

Silber, A. M. and C. A. Pereira (2012). "Assignment of Putative Functions to Membrane "Hypothetical Proteins" from the Trypanosoma cruzi Genome." The Journal of Membrane Biology **245**(3): 125-129.

Skieterska, K., P. Rondou and K. Van Craenenbroeck (2017). "Regulation of G Protein-Coupled Receptors by Ubiquitination." International Journal of Molecular Sciences **18**(5): 923.

Tanowitz, H. B., L. V. Kirchhoff, D. Simon, S. A. Morris, L. M. Weiss and M. Wittner (1992). "Chagas' disease." Clin Microbiol Rev **5**(4): 400-419.

Teixeira, A. R., M. M. Hecht, M. C. Guimaro, A. O. Sousa and N. Nitz (2011). "Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity." Clin Microbiol Rev **24**(3): 592-630.

Tomlinson, S., F. Vandekerckhove, U. Frevert and V. Nussenzweig (1995). "The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH." Parasitology **110** (Pt 5): 547-554.

Tovar, J. and A. H. Fairlamb (1996). "Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*." Nucleic Acids Research **24**(15): 2942-2949.

Toyoda, A., H. Noguchi, T. D. Taylor, T. Ito, M. T. Pletcher, Y. Sakaki, R. H. Reeves and M. Hattori (2002). "Comparative Genomic Sequence Analysis of the Human Chromosome 21 Down Syndrome Critical Region." Genome Research **12**(9): 1323-1332.

Tyler, K. M., C. L. Olson and D. M. Engman (2003). *The Life Cycle Of Trypanosoma Cruzi*. American Trypanosomiasis. K. M. Tyler and M. A. Miles. Boston, MA, Springer US: 1-11.

Vazquez, M. P. and M. J. Levin (1999). "Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector." Gene **239**(2): 217-225.

Wanderley De, S. (2002). "Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*." Current Pharmaceutical Design **8**(4): 269-285.

Anexo 1. Secuencias de DSCR3 en las diferentes especies utilizadas para generar el árbol filogenético

> *Homo sapiens* (NP_006043.1)

MGTALDIKIKRANKVYHAGEVLSGVVVISSKDSVQHQQVSLTMEGTVNLQLSAKSVGVFE
AFYNSVKPIQIINSTIMVKPGKFPSPGKTEIPFEFPLHLKGNKVLYETYHG VFVNIQYTLRCD
MKRSLAKDLTKTCEFIVHSAPQKGKFTPSVDFTITPETLQNVKERALLPKFLLRGHLNST
NCVITQPLTGELVSESSEAAIRSVELQLVRVETCGCAEGYARDATEIQNIQIADGDVCRGL
SVPIYMFVPRFLFTCPTLETTNFKVEFEVNVVLLHPDHLITENFPLKLCRI

> *Mus musculus* (NP_031860.1)

MGTTLDIKIKRANKVYHAGEMLSGVVVISSKDSVQHQQVSLTMEGTVNLQLSAKSVGVFE
AFYNSVKPIQIINSTIDVLKPGKIPSPGKTEVPFEFPLLVKGSKVLYETYHG VFVNIQYTLRCD
MRRSLAKDLTKTCEFIVHSAPQKGKLTSPVDFTITPETLQNVKERASLPKFFIRGHLNST
NCAITQPLTGELVVEHSDAAIRSIELQLVRVETCGCAEGYARDATEIQNIQIADGDICRNLS
VPLYMVFPRFLFTCPTLETTNFKVEFEVNVVLLHADHLITENFPLKLCRT

> *Danio rerio* (NP_001003421.1)

MSVSLDIRLKRANKVYHEGERLCGLLVVSRDPLQHQQVSLSLEGLVNLQLSAKSVGVFE
AFYNSVKPIQLVSSTMEVAKPGKVPAGRTEIPFEFPLQAKGNKQLYETYHG VFVNIQYTLR
CDIRRSLLAKDLSKSCEFMVHCQPQKAKLQPNPVD FSITPETLQNIRERASLPRFLIRGHL
DATCCSITRPLSGELVWENSEVPIKSIELQLVRVETCGCAEGYARDATEIQNIQIAEGDVCH
GLSIPIYMFVPRFLFTCPTLETTNFKVEFEVNVVLLHDDHLITENFPLKLLRL

> *Dictyostelium discoideum* (XP_629739.1)

MNNVLDLKLKIDKIYRPGSKVSGNVVINSKDDMSHSGVTIVVEGTVQLQLSSKSVGLFEA
FYNSLKPITLMHYTISVTNNGGKGFQAGITELPFEFTLEPLPNQQLYD TYHG VFVNIQYSIKC
DVKRGILSKDLSKTIEFIVEVPSQNKEVLMKSTPESLITFNITPDSLNVFKKISKADVPTFKIS
GGLVSAICNINEAFQGHMIESADTVIKSVELQLVRVETCGCADGYAREVTEIQNIQIADGDI
WRNFKIPLYMVFPRFLFTCISTAGKTFKIEFEVNLVIMLEDGHLITENFPIKLIR

> *Drosophila melanogaster* (NP_649249.1 CG4074)

MLLGCVQFQCAQETKHEGIIYLEGIVNLQLSAKTVGLF DAFYNSVKPINLLQNSLELSAPG
KLSAGRSEFHFELPLVCKKEPRILYETYHG VFINVNYQLTCTVKRNFLGKATTKIQQFCVQ

YKPVPLSEDSKKVVPFSLSPDSLQKNASAKERLSMPRFLITGRLLDRSEFCVTTPTITGSITV
QHTEAAIKSIEMQLVRVETCGCDEGYSKDATEIQTIQIADGNVLPKLELPIHMVLPRLFTCP
TLLTKNFKIEFELNLIVFKEDYTVSENFKIVLKRSTGPLPSKVTTAGR

> *Trypanosoma cruzi Silvio* (EKG05646.1)

MREMRKSGAGRDEIFLLYFLRTINYLFSLHSLTFTVAGGAEGKGAVGVLTGRHTLACVMQ
AKVQNPLTVQLDRVGGTYFAGEEVTGCVVNYATSSSFVDINLTVLGVAIQFPYGENAS
VFRRVGNIKPLKVMSLQIPLCRRGTQIPAGKTEVPFTFEIRASHPDVPLVQTYTGFHVTCN
YTIVAISTGIMSSDVSEVVPIYVIVPGQGQPPPHVLKEDTGVRFELNEESLEVLCDRPTPSD
RVNPNFLLEGCFDRYYNDIDIPLSGWIVRRCSAKILSIELQMQRVEQAATPGKVVREVTE
LQTIQIADGNVLRNLEIPIYMIFPRWYTCPSLKTPNIRVVF DANVLVKLQGRQLLRKVVIHL
YSAS

> *Trypanosoma cruzi Dm28c* (ESS65324.1)

MQAKVQNPLTVQLDRVGGTYFAGEEVTGCVVNYATSSSFVDINLTVLGVAIQFPYGEN
ASVFRRVGNIKPLKVMSLQIPLCRRGTQIPAGKTEVPFTFEIRASHPDVPLVQTYTGFHVT
CNYTIVAISTGIMSSDVSEVVPIYVIVPGQGQPPPHVLKEDTGVRFELNEESLEVLCDRPTP
SDRVNPNFLLEGCFDRYYNDIDIPLSGWIVRRCSAKILSIELQMQRVEQAATPGKWREV
TELQTIQIADGNVLRNLEIPIYMIFPRWYTCPSLKTPNIRVVF DANVLVKLQGRQLLRKVVI
HLYSAS

> *Trypanosoma cruzi marinkellei* (EKF37810.1)

MQAKAHSPLTVQLDRVGGTYFAGEEVTGCVVNYTMSSSFVDISLVVLGVVAIQFPDGE
NASVFRRVSNIKPLKVMSLQISLCRRGTQLPAGKTEVPFTFEIKASHPDVPLFQTYTGVHV
TCNYTIVAISTGIMSSDMSEVVPIYVIVPGQGQPPPHALKEDKGVRFELNEESLEVLCDPP
ATSDRVNPNFLLEGCFDRYYNDIDTPLSGWIVRRCSAKILSIELQMQRVEQAAMPKGIAR
EVSELQTIQLADGNVLRNLEIPIYMLFPRWYTCPSLKTPNIRVVF DVNVLVKLQGGQLLRK
VVIHLYRAS

> *Trypanosoma grayi* (XP_009306157.1)

MAGAWTDSPVTVCLDRVGGAYVAGETVTGCVVNYTTASAFVSIELSVLGSVLVQHPNT
DDAARFAALGDVEPVGLMNLRIPLHSRGALLPAGRIEFPFTFEIHTSTPGVSLIETYSGVYI
SCSYTITVTASGIVGKVTSEPLSFPVSVPGQGQPPPHALKDDTG VQFELNEDSMEVLHAS

GRALPSFLLEGLSERYNDIDIPLSGWIVVRRCSAKIVSIELQLLRVEQAAVPGASARGATE
VQSIQVADGDVLRNLEIPIYMFFPRWYTCPSIKTANMRVAFDENVILLLEGNRQLSKVVIH
LYRASLLS

> *Trypanosoma theileri* (ORC90835.1)

MTAELRREAPLSVQLDRVGATYTAGEKVTGCVVNYAMASTFLSIDLTVLGTLTIASTIDG
CSDMVGFSSETLNLKPMVLMNLRISLHSGHILPAGKTELPFLFEIKASNPNIPLIETYNGVCI
SCSYTLIATARGIIGKSTSDPLQLLVIVPGQGIPSPDLLKEDKGTYPFELNEESIEKKHHHLIS
QKCHLNFLLEGFFERYNDIDIPLSGWIVVRRCNVRILSIELQLLRVEHAATSEKIAHKATEV
QSIQVADGDVSRNLDIPIYMFFPRWYTCPSIKTSNVRVFDVNIKVFLEGRQVWSKVIPIHL
YRACN

> *Populus trichocarpa* (XP_002321517.1)

MSTKIALKFSRSNRIRPSEPVEGKVIKSPSSISHYGIRLSVNGSVNLQVRGGSAGVIETF
YGVVVKPITIVNKSIEVKPSGKIGSGTTEVPFTMVLKQNGEKSLERFYETFHGTDVSIQYLFT
VDIARGYLYKSLSATMEVIVESDKADLLERPVSPEMAIFYITQDTQRHPLLPEIKSGGFRVT
GRMSTLCSLLDPISGELTVETSAPVSSIDIHLLRVESILMGEKVTETSLIQTTQIADGDVCR
NLTLPYVILPRLTLCPSVFAGPFSIEFKVSIVISFQSELSKLHKKSDPRTPRWLAMETLPLE
LVRTR

> *Arabidopsis thaliana* (NP_175288.1)

MATATTNVNKLRSNRIRSSSEPVEGKVIKSATSISHQAIRLSVNGSVNLQVRGGSAGVIE
SFYGVKPIQIVKKTIEVKSSGKIPPGTTEIPFSLNLREPGEKVEKGYETFHGTNINIYLLTA
DIPRGYLHKPLSATMEFIIESGRVDLPERPIPEVIFYITQDTQRHPLLPDIKTGGFRVTGKL
ATQCSLQDPLSGELTVEASSVPITSIDIHLLRVESIIVGERVTETSLIQSTQIADGDVCRNMT
LPIYVLLPRLLMCPVSVFAGPFSVEFKVCITISFKSKLAKAQPKSDPTAPRLWMALERLPLEL
VRTKRDQFSC

> *Tetrahymena thermophila* (XP_001032785.2)

MNQQELDVGTLITFDNANSTYKQNDWVTGKVKLEGDVENSKEFYGLKIKAEGLTQAQNK
ASNRDLEAVSAHLIPLKLFTHESIAEMQYVDKDNCEFTFKFKLMANEKLIETYVGVVYV
TVGYEIQAEKLKLANYQVKETQNFVQVNGAGRDMLNTDKYPNPQSSINPDKLKQGSME

KMPRIKIQGVINSDVCMINNDFTGQFELEECEGKIRSIDLQLIRVEQVSNAGKGFQEATEIQ
LIQVCDGNITKGIEIPLTMMFPKYFCCPNFQWKDFTVEFEVNFVILYDAFKITLNYPIKLLRN

> *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener (XP_819086.1)

MQAKVQNPLTVQLDRVGGTYFAGEEVTGCVVNYATSSSFVDINLTVLGWAIQFPYGEN
ASVFRRVGNIKPLKVMSLQIPLCRRGTQIPAGKTEVPFTFEIRASHPDVPLVQTYTGVHVT
CNYTIVAISTGIMSSDVSEVVPYVMPGQGQPPPHVLKEDTGVRFELNEESLEVLCDRPTP
SDRVNPNFLLEGCFDRYYNDIDIPLSGWIVVRRCSAKILSIELQMQRVEQAATPGKIVREV
TELQTIQIADGNVLRNLEIPIYMIFPRWYTCPSLKTPNIRVVFDANVLVKLQGRQLLRKVPPI
HLYSAS

Anexo 2. Alineamiento de TcDSCR3-Like con Vps26 de otras especies

```

TcVps26 -----
TbVps26 -----MLERER-PQEK---ERGAGLFSRFRKMGCDVKIILDGKSESDV
LmTcVps26 -----MLRDELPPEKG---QQSFSLWSRILRSIDGCKLEIVLDDQTEADK
ScVps26 -----MSIFFKP---PIDIEILFDNEESRKH
HsBVps26 -----MSFFG--FGQ--SVEVEILLNDAESRKR
HsAVps26 -----MSFLGGFFGP--ICEIDVLDNDGETRKM
MmVps26 MSEPLPAFLDRLWGPWLGTRSPFSRSSAASPSKFLGGFFGP--ICEIDVALNDGETRKM
Pfvps26 -----MLSTIFGS--VCSIDLKIDADDNKKF
TgVps26 -----MLATLFGS--VCTVEIFIDQEG--RKT

TcVps26 --MQAKVQNPLTVQLDRVGGTYFAGEEVTGCVVNYATSS--S--FVDINLTVLGVVAIQF
TbVps26 VR---VHDFRDNTSERLYRYSCPEPVGVRVMLNP--KG-SYRHNGVDVMLLAYAVLPO
LmTcVps26 IK---VVDIYDKVSEFPLYSWKEPVKGRVWVTP--TGSSYSHQGWVVELIGVASTFR
ScVps26 VDIATRSSNSYSKSMKESLVYEDGESLGGIVTLRV-RDSKQVVDHLGKIVSVIGSIDMLK
HsBVps26 AEHKTED----GKKEKYLFDYDGETVSGKVSALAKNPNKRLEHQGKIEFIFGQIEIY
HsAVps26 AEMKTED----GKVEKHYLFYDGESVSGKVNLAFAKQPKRLEHQGRIEFVGGQIEI
MmVps26 AEMKTED----GKVEKHYLFYDGESVSGKVNLAFAKQPKRLEHQGRIEFVGGQIEI
Pfvps26 A-FLRKD----KKGKCPIFSDGEDINGTATISL-KPGKKEHYGKLELIGQINILN
TgVps26 T-YLSRD----KGERVPIFSDGEDVTGCAIILN-KPGKRLDHNGIKVELIGQIDTLY
. . . . .
: * : * : . . . . .

TcVps26 PYGENASVFRVGNII-----KPLKVMISLQIPLCRRGTQIPAGKTEVPPTF
TbVps26 ASDH-----KVEFITQKRFEP-DTLQG---ATPLF
LmTcVps26 EVES-----RVFLRQERQFEP-DTINQ---STPEF
ScVps26 SHGSGNSSSKKVTSSSTSSSSNGSVVDRKNSVDQFLCQSYDLCPAGEIQH---SQSFPF
HsBVps26 DRGN-----HHEFVSLVKDLARPGEITQ---SQAFDF
HsAVps26 DKSN-----THEFVNVLKELALPGEITQ---SRSYDF
MmVps26 DKSNI-----THEFVNVLKELALPGEITQ---SRSYDF
Pfvps26 DKAN-----SYDFFSISKDLEPPGVIVE---SKQFKW
TgVps26 DRSN-----SYDFFSISKDLEPPGVIVE---SKKXY
. . . . .
: . . . . .

TcVps26 EIRASHFDVPLVQTYTGVHVCNYTIVAI STGIMSDVSEVVPYVI VPGQGGPPHVLK
TbVps26 SFTV-L--KEHESYRG INARVMYLRVVVHRPLK-NVTEQMEFVWTRVDTVLSDTQEDA
LmTcVps26 TFSA-P--KEHESYHG IYARVRYVQATVKQRIK-SPSVKEEVVHVRVDTALSESQDA
ScVps26 LFRDLS--KRYESYKGNVDVAVYVVKVTVMRKT-DISKIKREVVYLYNSVTTAPNTLS
HsBVps26 EPTHVE--KPYESYTGQNVKLRFLRATISRRLN-DVVKEMDIVVH-----
HsAVps26 EFMQVE--KPYESYIGANVRLRYFLKVTIVRRLT-DLVKEYDLIVH-----
MmVps26 EFMQVE--KPYESYIGANVRLRYFLKVTIVRRLT-DLVKEYDLIVH-----
Pfvps26 KFSAVD--KQHESYFGTNVQLRYFVRLNI IKGYSGNIQKEIDFIVQ-----
TgVps26 RENAVD--KPNETYSGHVRLRYFIRLTIMRNYGSSIVKEQDFVVQ-----
. . . . .
: : * * . * : *

TcVps26 E--D-----TGVRFELN-----EESLEVLCDRPTPSDRVNPFILE
TbVps26 -----LRHRS-----YFRETVEFGPNSITMDVGV
LmTcVps26 -----SAHMN-----YFRETVEFGPNSIAMNVGD
ScVps26 ANETHKATNDIAGGNAYAADNASINTQTKSTQGEAADVNQVLPISHSNNEPKPVRDLIGIE
HsBVps26 -----TLSTYPELNSKMEVGIE
HsAVps26 -----QLATYPDVNNISKMEVGIE
MmVps26 -----QLATYPDVNNISKMEVGIE
Pfvps26 -----NLICIPPEINNTIKMEVGIE
TgVps26 -----NIGIPPEVNNNTIKMEVGIE
. . . . .
: . . . . .

TcVps26 GCFDRYY--N---DIDIPLSGWIIVRRCSAKILSIELQMQRVEQA--ATPGKIVREVE
TbVps26 NMLHIEFMYDKRFHLQERVLGKVFVKVHMDIRYGEVGVVRKEVTVVPLSESEAVNME
LmTcVps26 NVLHIEFRYDKKI FHLAERVLGKVEYKVDMDIAYGEVGLVRKEFLAPGQ-TDETMES
ScVps26 NCLHIEFEYAKSQYSLKEVIVGRIYFLLRIRLKHMELSITRESS--GLQTSNVMYDST
HsBVps26 DCLHIEFEYNKSKYHLKDVIVGKIYFLVLRIRIKIHMEIDIKREIT--GTGPNVYHENDT
HsAVps26 DCLHIEFEYNKSKYHLKDVIVGKIYFLVLRIRIKIHMEIQLIKKEIT--GIGPSTTTETET
MmVps26 DCLHIEFEYNKSKYHLKDVIVGKIYFLVLRIRIKIHMEIQLIKKEIT--GIGPSTTTETET
Pfvps26 DCLHIEFEYDKSKYHLKDVIVGKIYFLVLRIRIKIHMEIQLIKKEIT--GIGPSTTTETET
TgVps26 DCLHIEFEYDKSKYHLRVDVVGKVFVLRIRIKIKDMQIDIRIETETA--GTGSAVTDSET
. . . . .
: . . . . .
: * * : * : * : * : * : * : *

TcVps26 LQTIQIADGNVLRNLEIPIYMIFFRW-YTCPSIKTPN--IRVV-FDANVLVKLQGRQLLR
TbVps26 LQKFEIMDGTPIVGEVVPRLYLNCIPNLTPYKNVQDCVNVQYFLNLVLI TADGKRFK
LmTcVps26 LQKFEIMDGTPIVEEVVPIRLYLKSVPRLTSPYMDVENLFSVRYFLNLVNVQEGKRYFK
ScVps26 AIRYEIMDGSSVKGETIPIRLFLSGY-DLTPNMS--CNYFNVNKYLVLVIDEEDRRYFK
HsBVps26 IAKYEIMDGAPVKGESIPIRLFLAGY-ELTPTMRDINKKFSVRYFLNLVLI DEEERRYFK
HsAVps26 IAKYEIMDGAPVKGESIPIRLFLAGY-DPTPTMRDINKKFSVRYFLNLVLI DEEERRYFK
MmVps26 IAKYEIMDGAPVKGESIPIRLFLAGY-DPTPTMRDINKKFSVRYFLNLVLI DEEERRYFK
Pfvps26 LSKFEIMDGSPKSECI FVRLYLSGF-DLTPTYKNIQNKFSVRYINLIV DEEERRYFK
TgVps26 LTKFEIMDGAPIRSECI FVRVYLSGF-DFTPTYKNVQNKFSVRYFLNLVLI DEEERRYFK
: * * * : * : * : * . * : : : : : : : : :

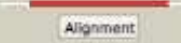

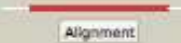

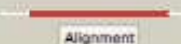













TcVps26 KVPPIHLYSAS-----
TbVps26 Q-QEIELYRRRQGEALTWTA--WR----QDDPGKGDGEA--GETSH---
LmTcVps26 Q-QEIQLYRRTQERSATSFNGL----PVTFASGDVDAKGGWSA----
ScVps26 Q-SEITLYRTR-----
HsBVps26 Q-QEVVILWRKGDIVRKSMSHQAAIASQRFEGTTSLEGEVTPSLSDNCRQ
HsAVps26 Q-QEII LWRKAPEKLR---KQRNFHQRFESPEQASAEQPEM-----
MmVps26 Q-QEII LWRKAPEKLR---KQRNFHQRFESPEQASAEQPEM-----
Pfvps26 K-QEIFLWRKMG-----
TgVps26 K-QEITMWRKIG-----
: . . . . .
: : : :

```

Porcentaje de identidad del alineamiento de TcVps26-Like con Vps26 de otras especies.

	<i>T. brucei</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>T. gondi</i>	<i>H. sapiens</i>
<i>T. cruzi</i>	TbVps26	LmTcVps26	PfVps26	ScVps26	HsAVps26	MmVps26	TgVps26	HsBVps26
TcVps26	14.34	16.97	17.44	17.61	18.99	18.99	18.99	20.54

Anexo 3. Estructuras predichas para TcDSCR3-Like utilizando como templatado proteínas que pertenecen al clan de las Arrestinas

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% I.d.	Template Information
1	c2c51A	 Alignment		100.0	21	PDB header: transport protein Chain: A; PDB Molecule: vacuolar protein sorting-associated protein 26b; PDBTitle: crystal structure of mouse vps26b
2	c2fauA	 Alignment		100.0	19	PDB header: protein transport Chain: A; PDB Molecule: vacuolar protein sorting 26; PDBTitle: crystal structure of human vps26
3	c1g4nA	 Alignment		100.0	13	PDB header: signaling protein Chain: A; PDB Molecule: beta-arrestin1; PDBTitle: crystal structure of bovine beta-arrestin 1
4	c1au8A	 Alignment		100.0	14	PDB header: signaling protein Chain: A; PDB Molecule: cone arrestin; PDBTitle: x-ray crystal structure of ambystoma tigrinum cone arrestin
5	c1ayrA	 Alignment		100.0	12	PDB header: sensory transduction Chain: A; PDB Molecule: arrestin; PDBTitle: arrestin from bovine rod outer segments
6	c1au8A	 Alignment		100.0	16	PDB header: signaling protein Chain: A; PDB Molecule: bovine arrestin-2 (full length); PDBTitle: crystal structure of bovine arrestin-2
7	c4r7y8A	 Alignment		100.0	16	PDB header: protein binding Chain: A; PDB Molecule: arrestin domain-containing protein 3; PDBTitle: crystal structure of n-lobe of human amrc3(1-165)
8	c4gqjD	 Alignment		100.0	17	PDB header: protein binding Chain: D; PDB Molecule: thioredoxin-interacting protein; PDBTitle: n-terminal domain of vdup-1
9	c1c1fB	 Alignment		100.0	14	PDB header: structural protein Chain: B; PDB Molecule: protein (arrestin); PDBTitle: arrestin from bovine rod outer segments

Anexo 4. Alineamiento entre la secuencia teórica de HA-TcDSCR3-Like y el resultado de secuenciación

	Etiqueta HA	TcDSCR3-Like
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		gctt ATG TACCCATACGATGTCCAGATTACGC TATG CAGGCAAAAAGTCAGAACCGCT GCTTATGTACCCATACGATGTCCAGATTACGCATGCAGGCAAAAAGTCAGAACCGCT *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		GACGGTTCAGCTGACCGTGTGGAGGGACGTA TTTCGCTGGT GAGGAGGTTACCGGCTG GACGGTTCAGCTGACCGTGTGGAGGGACGTA TTTCGCTGGT GAGGAGGTTACCGGCTG *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		CGTCGTGTGAAC TACGCCACGT CATCCAGT TTTGT CGATA TTAATTT GACTGTGCTTGG CGTCGTGTGAAC TACGCCACGT CATCCAGT TTTGT CGATA TTAAT TTGACTGTGCTTGG *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		TGTCGTGGCCATA CAATTTCCCATAT GAGAGAA CGCCTCGGTT TTC CGCAGGGTTGGCAA TGTGTGGCCATA CAAT TTCCCATAT GAGAGAA CGCCTCGGTT TTC CGCAGGGTTGGCAA *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		TATCAAAC CAC TGAAGGTAAT GAGCC TT CAGAT TCCACT TTGT CGT CGCGGCA CGCAGAT TATCAAAC CAC TGAAGGTAAT GAGCC TT CAGAT TCCACTTTGT CGT CGCGGCA CGCAGAT *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		TCCCGCTGGAAA ACTGAGGTGC CCTTT ACGTT TGAAA TTAGGCGCTCCATC CAGATGT TCCCGCTGGAAA ACT GAGGTGC CCTTT ACGTT TGAAA TTAGGCGCTCCATC CAGATGT *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		GCCGCTCGTTC AGACGTA TACT GGGGTCCATGT CACAT GTAAT TATAC ATTG TCGCGAT GCCGCTCGT TTC AGACGTA TACT GGGGTCCATGT CACAT GTAAT TATAC ATTG TCGCGAT *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		TTC TACTGGAATC ATG AGCAGCGACGTGAGTGAAGTGGTGCCTATT TA TGTTA TTG TCCC TTC TACT GGAATC ATG AGCAGCGACGTGAGTGAAGTGGTGCCTATT TA TGTTA TTG TCCC *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		CGGCCAGG GTCAACCA CCGCC GCATGTGCTGAA GGA AGACA CAGGT GTTCGGTT GAA TT CGGCCAGG GTCAACCA CCGCCGCATGTGCTGAA GGA AGACA CAGGT GTTCGGTT GAA TT *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		GAA TGAAGAGATCTG GAGGT GC TGT GC GAT CGTCC CA CAC CC AGC GACC CGTGAAT CC GAA TGAAG AGATCTG GAGGT GC TGT GC GAT CGTCC CA CAC CC AGC GACC CGTGAAT CC *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		CAATTT TC TTC TTGAGGGATGCTTTGATCGGTA TATA ACGATATT GATA TCCCTCTT TC CAATTTTC TTC TTGAGGGATGCTTTGATCGGTA TATA ACGATATT GATA TCCCTCTT TC *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		CGGCTGGA TTGTCGTGCGCGGTG TAG CCTAAGATTC TTT CCATT GA CTGC AAAT GCA CGGCTGGA TTGTC GTGCGCGGTG TAG CCTAAGATTC TTT CCATT GA CTGC AAAT GCA *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		GCGAGTGG AGCAGCGGC AAC GCCGGGG AAAAT CGTGC GAGAA GTGACAGAGC TG CA AAC GCGAGTGG AGC AGCGGC AAC GCCGGGG AAAAT CGTGC GAGAA GTGACAGAGC TG CA AAC *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		CAT TCAGAT TTG CGGATGG GAA CGT AC CGCA CC CTTGAGATTTCC CA TT ACA TGATA TT CATTCAGAT TTG CGGATGG GAA CGT AC CGCA CC CTTGAGATTTCC CA TT ACA TGATA TT *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		CCC TCGATGGT AC AGTGGCCCT CCC TC AAG ACGCC AA ACA TAC CGCTG TTTT TTGAT GC CCC TCGAT GGT AC AGTGGCCCT CCC TC AAG ACGCC AA ACA TAC CGCTG TTTT TTGAT GC *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		CAACGT TTTAGTC AAA CTGCA GG GTC GC CAGTT GCT TAG GAA AGTT GT CC AA TACAT TT CAACGTTTTAGTC AAA CTGCA GG GTC GC CAGTT GCT TAG GAA AGTT GT CC AA TACAT TT *****
pTREXnHATcDSCR3L ResultadoSec		GTA CTCTG CCAGT TGA ct cgagccat tt ggctg gaa -----cgctgcagaa acc tg GTA CTCT G CCAGT TGA ct cgagccat tt acgac TCCA AGCA CGCT GCAGAA CA ACC TG *****

Anexo 5. Alineamiento de la secuencia teórica pTREXnTcDSCR3-LikeGFP y el resultado de secuenciación

```

pTREXnTcDSCR3LikeGFPGFP      TTATCCGGCCTTATATTTTTTTTTTGCTCTA TNGTTGACTTGTctAga ATGCAGGCAAAA
Resultado Secuenciación      -----NNNNTNNGNTcT TAGTTGCTTTGTCTAGAATGCAGGCAAAA
                               *          *          *          *          *          *
pTREXnTcDSCR3LikeGFPGFP      GTGCAGAACCCTGCTGACCGTT CAGCTGGACCGGTG TGGAGGGACGATATTCGCTGGTGAG
Resultado Secuenciación      GTGCAGAACCCTGCTGACCGTT CAGCTGGACCGGTG TGGAGGGACGATATTCGCTGGTGAG
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFPGFP      GAGGTTACCGGCTGCGTCGTTGTGAACTACGCCACGTCA TCCAGTTTGTGCGATATTAAT
Resultado Secuenciación      GAGGTTACCGGCTGCGTCGTTGTGAACTACGCCACGTCA TCCAGTTTGTGCGATATTAAT
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFPGFP      TTGACTGTGCTTGGTGTGCTGGCCATACAAT TCCCATATGGAGAGAACGCCTCGGTTTTC
Resultado Secuenciación      TTGACTGTGCTTGGTGTGCTGGCCATACAAT TCCCATATGGAGAGAACGCCTCGGTTTTC
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFPGFP      CGCAGGGTTGGCAATCAAACTGAAGGTAA TGAGCCTCAGATTCCA CT TTGTCGT
Resultado Secuenciación      CGCAGGGTTGGCAATCAAACTGAAGGTAA TGAGCCTCAGATTCCA CT TTGTCGT
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      CGCGCACGCAGATTCCCGCTGGGAAAAC TGAGGTGCCCTTACGTTTGAAT TAGGGCG
Resultado Secuenciación      CGCGCACGCAGATTCCCGCTGGGAAAAC TGAGGTGCCCTTACGTTTGAAT TAGGGCG
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      TCCCATCCAGATGTGCCGCTCGTT CAGACGTATACTGGGTCATGTCACATGTAATTAT
Resultado Secuenciación      TCCCATCCAGATGTGCCGCTCGTT CAGACGTATACTGGGTCATGTCACATGTAATTAT
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      ACCATTGTCGCGATTCTACTGGAATCATGAGCAGCGACGTGAGTGAAGTGGTGCCATTT
Resultado Secuenciación      ACCATTGTCGCGATTCTACTGGAATCATGAGCAGCGACGTGAGTGAAGTGGTGCCATTT
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      TATGTTATTGTCCC CGGCCAGGGTCAACCACCGCGCATGTGCTGAAGGAAGACACAGGT
Resultado Secuenciación      TATGTTATTGTCCC CGGCCAGGGTCAACCACCGCGCATGTGCTGAAGGAAGACACAGGT
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      GTTCGGTTTGAATTGAATGAGAGTCTGGAGGTGCTGTGCGATCCTCCACACCCAGC
Resultado Secuenciación      GTTCGGTTTGAATTGAATGAGAGTCTGGAGGTGCTGTGCGATCCTCCACACCCAGC
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      GACCGGTGAA TCCCAATTTCTTCTTGAGGGATGCTTTGATCGGTAT TATAACGATA TT
Resultado Secuenciación      GACCGGTGAA TCCCAATTTCTTCTTGAGGGATGCTTTGATCGGTAT TATAACGATA TT
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      GATA TCCTCTTCCGCTGGATTGTCGTGCGGCGTGTAGCGCTAAGATTCTTTCATT
Resultado Secuenciación      GATA TCCTCTTCCGCTGGATTGTCGTGCGGCGTGTAGCGCTAAGATTCTTTCATT
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      GAAC TGCAAATGCAGCGAGTGAGCAGGC GGCAACGCCGGGAAAATCTGTGCGAGAAGTG
Resultado Secuenciación      GAAC TGCAAATGCAGCGAGTGAGCAGGC GGCAACGCCGGGAAAATCTGTGCGAGAAGTG
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      ACAGAGCTGCAAACCA TTCAGATTGCGGATGGGAACGTACTCCGCAACCTTGAGAT TCCC
Resultado Secuenciación      ACAGAGCTGCAAACCA TTCAGATTGCGGATGGGAACGTACTCCGCAACCTTGAGAT TCCC
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      ATTTACATGATATTCCCTC GATGGTACACGTGCCCTCCCTCAAGACGCCAAACATACGC
Resultado Secuenciación      ATTTACATGATATTCCCTC GATGGTACACGTGCCCTCCCTCAAGACGCCAAACATACGC
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      GTTGTTTTTGATGCCAACGTTT TTAGTCAAAC TGCAGGGTGCAGTGTGCTTAGGAAAGTT
Resultado Secuenciación      GTTGTTTTTGATGCCAACGTTT TTAGTCAAAC TGCAGGGTGCAGTGTGCTTAGGAAAGTT
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      GTGCCAATACATTTGTACTCTGCCAGT CaAGCCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAAGGAGAT
Resultado Secuenciación      GTGCCAATACATTTGTACTCTGCCAGT CaAGCCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAAGGAGAT
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      ATAACA ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGAGGTTGTCCCAATTTCTGTGAATTA
Resultado Secuenciación      ATAACA ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGAGGTTGTCCCAATTTCTGTGAATTA
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      GATGGTGATGTAA TGGGCACAAA TTTC TGTCAGTGGAGAGGTGAAAGGTGATGCAACA
Resultado Secuenciación      GATGGTGATGTAA TGGGCACAAA TTTC TGTCAGTGGAGAGGTGAAAGGTGATGCAACA
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      TACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTAT TTGCACTACTGGAAAAC TACCTGTTCCATGGCCA
Resultado Secuenciación      TACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTAT TTGCACTACTGGAAAAC TACCTGTTCCATGGCCA
                               *****
pTREXnTcDSCR3LikeGFP      ACAC TTGTCAC TACTTCACTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCA TATG
Resultado Secuenciación      ACAC TTGTCAC TACTTCACTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCA TATG
                               *****

```