

Tesis Doctoral

Transporte de riboflavina en tripanosomátidos: novedoso blanco terapéutico

Balcazar, Darío E.

2017

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Balcazar, Darío E.. (2017). Transporte de riboflavina en tripanosomátidos: novedoso blanco terapéutico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6234_Balcazar

Cita tipo Chicago:

Balcazar, Darío E.. "Transporte de riboflavina en tripanosomátidos: novedoso blanco terapéutico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6234_Balcazar

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Transporte de Riboflavina en Tripanosomátidos:

Novedoso Blanco Terapéutico

Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de

Buenos Aires, Área de Química Biológica

Dario E. Balcazar

Directora de Tesis: Dra. Carolina Carrillo

Director Asistente: Dr. Hernán Ruy Bonomi

Consejera de Estudios: Dra. Elba Vázquez

Lugar de Trabajo: Instituto Científico Tecnológico Dr. Cesar Milstein – CONICET

Fecha: Buenos Aires, 2017

“No estalla como las bombas ni suena como los tiros. Como el hambre, mata callando. Como el hambre, mata a los callados: los que viven condenados al silencio y mueren condenados al olvido. Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende. El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que interese a los políticos ni a los periodistas. Elige a sus víctimas en el pobrerío. Las muerde y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas. Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen. Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren”.

(Informe Clínico, Eduardo Galeano, Chagas: una tragedia silenciosa,
Médicos Sin Fronteras, Editorial Losada, 2005)

Transporte de Riboflavina en Tripanosomátidos: Novedoso Blanco Terapéutico

RESUMEN

La riboflavina (vitamina B2) es un nutriente esencial para todo tipo celular estudiado, siendo el precursor de los cofactores flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleótido (FAD). Los metazoos, incluyendo al humano, carecen de la vía biosintética de riboflavina y la obtienen de la dieta a través de transportadores específicos (familia SLC52). Muchos patógenos sintetizan riboflavina *de novo* mientras otros la incorporan a través de transportadores específicos, estructuralmente diferentes de los transportadores presentes en los metazoos. Por la esencialidad de la riboflavina y las diferencias entre patógenos y hospedadores, las vías de obtención de riboflavina fueron propuestas como potenciales blancos terapéuticos contra los patógenos.

Los tripanosomátidos son un grupo monofilético comprendiendo parásitos responsables de graves enfermedades en humanos tales como *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas), *Trypanosoma brucei* (Tripanosomiasis Humana Africana) y *Leishmania* spp. (Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral). Otros tripanosomátidos son fitoparásitos, como *Phytomonas* spp., generando grandes pérdidas en economías regionales de Sudamérica.

En esta tesis se estudió metabolismo (posibles rutas de obtención por biosíntesis y/o transporte) de riboflavina en tripanosomátidos así como su rol biológico en los distintos estadios celulares. Nuestros resultados mostraron que las flavinas son esenciales para la proliferación de tripanosomátidos. La riboflavina es incorporada a través de un mecanismo mediado por un/os transportador/es saturable/s. Más aún, procesos biológicos de *T. cruzi* como la metacicloogénesis y replicación de epimastigotes y de amastigotes en células de mamíferos son dependientes del transporte de riboflavina. Mediante análisis bioinformáticos, identificamos una nueva familia de transportadores de riboflavina a la que llamamos "RibJ" y caracterizamos funcionalmente los transportadores RibJ de *T. cruzi* y *T. brucei*. Interesantemente, los análisis filogenéticos mostraron que RibJ es específica para tripanosomátidos y no está relacionada con ninguna de las 3 familias descritas en eucariotas. Dado que riboflavina es esencial para tripanosomátidos, que se obtiene por transporte y que RibJ es estructuralmente distinto a los transportadores de otros eucariotas,

incluidos los hospedadores, RibJ puede postularse como nuevo blanco para el diseño de drogas con potencial uso en el desarrollo de terapias tripanocidas.

Palabras Claves

Riboflavina, vitamina B2, FAD, FMN, transportador, tripanosomátidos, RibJ, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana*, *Phytomonas Jma*, *Crithidia fasciculata*, Tritryps, blanco terapéutico.

Riboflavin Transporter in Trypanosomatids: Novel Therapeutic Target

ABSTRACT

Riboflavin (vitamin B2) is an essential nutrient for all studied living cells, being the precursor of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) cofactors. Metazoa, including humans, lack the riboflavin biosynthetic pathway and obtain this vitamin from the diet through its riboflavin transporter (SLC52 family). Many pathogens synthesize riboflavin *de novo* while others incorporate it through specific riboflavin transporters, structurally different from those present in metazoans. For these reasons, the riboflavin pathways have been proposed as therapeutic targets against pathogens.

Trypanosomatids are a monophyletic group encompassing parasites responsible of serious human diseases including *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease), *Trypanosoma brucei* (Human African Trypanosomiasis) and *Leishmania* spp. (cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis). Other ones are phytoparasites, as *Phytomonas* spp., generating regional economic losses in South America.

In this Thesis, we have studied the metabolism (biosynthesis and transport) of riboflavin in trypanosomatids, defining the biological role of this vitamin at the different cellular stages. Our results show that flavins are essential for trypanosomatids proliferation, and that riboflavin is incorporated through a saturable carrier-mediated process. Moreover, we have found that parasites proliferation and *T. cruzi* metacyclogenesis and amastigote replication in mammalian cells are dependent on flavin transport. By bioinformatics analysis, we have identified a novel family of riboflavin transporters, which we named RibJ, functionally characterizing two relevant members from this family: *TcRibJ* and *TbRibJ* from *T. cruzi* and *T. brucei*, respectively. Interestingly, the phylogenetic analysis show that RibJ is specific for trypanosomatids and it is not related with the other three families described in eukaryotic cells. This work highlights the essentiality of riboflavin metabolism for trypanosomatids and presents RibJ as an attractive target for drug design. Specifically blockage of riboflavin transport may lead to novel therapeutics against trypanosomiasis.

KEYWORDS

Riboflavin, vitamin B2, FAD, FMN, transporter, trypanosomatids, RibJ, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana*, *Phytomonas* Jma, *Crithidia fasciculata*, Tritryps, drug target.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la FCEN, y en particular al Departamento de Química Biológica por haberme formado en la investigación y por brindarme la oportunidad de realizar el doctorado. A CONICET por otorgarme la beca para poder cumplir con mi formación de posgrado. También al Instituto Científico Tecnológico Dr. Cesar Milstein y a la Fundación Instituto Leloir por darme los espacios necesarios para la realización de este trabajo.

Especialmente agradezco a mi Directora Dra. Carolina Carrillo, a mi Director Asistente Dr. Hernán Ruy Bonomi, y a mi Co-Director de beca, Dr. Claudio Pereira. En cada uno de sus grupos de trabajo, me sentí parte de ellos, y durante estos 5 años de trabajo, me formaron tanto como investigador y como persona.

En el grupo de Claudio, quiero agradecer a Mariana, Melisa y Chantal, por toda la ayuda y las herramientas que me brindaron, siempre con la mejor energía.

En el grupo de Carolina, primero a Jeremías, mi primer mentor y amigo en el mundo de los tripanosomátidos. Luego, este grupo fue creciendo, con las incorporaciones de Luciana, Laura F. (mi hermana), Fabiana, y finalmente con Dani (la más peque de todas). Sin Uds, el laboratorio hubiese sido solamente eso, pero lo convirtieron en una gran familia.

En el Milstein también conocí otra gente maravillosa, como Pablo T., Pablo Y., Vale, Cristian, Vero, Isa, Pancho, Sabri, Vane, Vicky, Susana, Alicia, y muchas otras personas más.

A Hernán, quien me abrió las puertas de su laboratorio en Leloir, y fue con quien aprendí un montón de cosas y me animó a insistir en este largo camino. El grupo del que forma parte es inmenso, no solo en cantidad de gente sino también en calidad humana. Entre ellos, Fernando, Jime, Seba, Lisandro, Santi, Paula, Vani, Anita, Javi, Marielita, Gaby, Nacho, María Laura. En especial al Ruso (te hice 2 caños hermosos), que junto con Hernán, son 2 tipazos que me dieron una gran mano a nivel personal, y que cambiaron mi vida para siempre, y para bien.

A la gente platense: Alan, Caro B., Luqui, y el resto del Lideb; a la familia; que hacen de La Plata un lindo lugar para vivir.

A mis amigos del primario (Gabi, Javi, JJ, Marce, Fede), que me buscan aún cuando desaparezco, y hacen de las pocas juntadas, unas hermosas juntadas, con grandes noticias.

A los amigos de la facultad (Andrew, Vito, hermana Tita, Agus, Vicky, las Paus, Jere de nuevo, El Guarra, Ale, Checho, Maru, Parra), que aunque no los vea tan seguido por la larga distancia, es lindo tenerlos cerca en la vida.

A mi vieja familia: Gloria y al abuelo Pablo, mis ejemplos de seguir luchando y trabajando. A mi hermano Matías. Particularmente a mi abuela Marcelina, a quién extraño cada día.

A mi nueva familia: Osvaldo, Laura y Pablo, y todos los tíos y tías asociados.

A mi pequeña creciente familia: Lau por tu apoyo inagotable, por tu paciencia infinita, por ser mi cumbiera intelectual y por el amor que nos brindas. Y por adoptar a Betuna.

En fin, a todos los que estuvieron, a los que están, a los que ya no están y a los que no recordé durante esta breve escritura.

Ami familia

INDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
TRIPANOSOMÁTIDOS: ESTADIOS CELULARES Y MORFOLOGÍA	2
CICLOS DE VIDA	3
<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	4
<i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	5
<i>LEISHMANIA SPP.</i>	6
<i>PHYTOMONAS SPP.</i>	7
<i>CRITHIDIA FASCICULATA</i>	8
PATOGÉNESIS Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE ENFERMEDADES ASOCIADAS A TRIPANOSOMÁTIDOS.....	9
ENFERMEDAD DE CHAGAS (TRIPANOSOMIASIS AMERICANA)	9
ENFERMEDAD DEL SUEÑO (TRIPANOSOMIASIS HUMANA AFRICANA)	12
LEISHMANIASIS	15
INFECCIONES EN PLANTAS POR <i>PHYTOMONAS SP.</i>	17
TRATAMIENTOS ACTUALES	19
ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	19
ENFERMEDAD DEL SUEÑO	20
LEISHMANIASIS	22
CARACTERÍSTICAS PARTICULARES DE TRIPANOSOMÁTIDOS COMO POSIBLES BLANCOS TERAPÉUTICOS.....	25
SUPERFICIE CELULAR Y TRANSPORTADORES	25
METABOLISMO Y TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA	33
SÍNTESIS DE RIBOFLAVINA	33
TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA.....	36
TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA EN BACTERIAS GRAM +.....	36
TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA EN BACTERIAS GRAM -	37
TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA DE EUCARIOTAS	39
METABOLISMO Y TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA COMO BLANCOS TERAPÉUTICOS	40
FLAVOPROTEÍNAS EN TRIPANOSOMÁTIDOS	42

RELEVANCIA DE FLAVINAS	42
POSIBLES MECANISMOS DE OBTENCIÓN DE FLAVINAS EN TRIPANOSOMÁTIDOS: ESENCIALES EN LOS ESTADÍOS REPLICATIVOS EN INSECTOS.....	42
FLAVINAS Y DIFERENCIACIÓN A FORMAS INFECTIVAS: PRINCIPAL ENFOQUE EN METACICLOGÉNESIS DE <i>T. CRUZI</i> .	44
FLAVINAS E INFECTIVIDAD: PRINCIPAL ENFOQUE EN TRIPOMASTIGOTES <i>T. CRUZI</i>	44
FLAVINAS Y REPLICACIÓN INTRACELULAR: PRINCIPAL ENFOQUE EN AMASTIGOTES <i>T. CRUZI</i>	45
EFFECTO DE ANÁLOGOS DE RIBOFLAVINA EN TRIPANOSOMÁTIDOS	46
<u>OBJETIVOS</u>	47
OBJETIVO GENERAL.....	48
OBJETIVOS PARTICULARES	48
<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	49
TRIPANOSOMÁTIDOS: MEDIOS DE CULTIVO Y PARÁSITOS UTILIZADOS	50
ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.....	51
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	52
BÚSQUEDA DE FLAVOPROTEÍNAS ANOTADAS EN EL GENOMA DE LOS TRIPANOSOMÁTIDOS	52
BÚSQUEDA DE POTENCIALES TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA EN TRIPANOSOMÁTIDOS	52
CONSTRUCCIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO DE TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA CON EL MÉTODO <i>NEIGHBOR-JOINING</i>	54
CONSTRUCCIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO DE TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA DE KINETOPLÁSTIDOS CON EL MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	55
MODELADO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE <i>TcRibJ</i>	55
IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES SITIOS DE INTERACCIÓN ENTRE <i>TcRibJ</i> Y FLAVINAS POR <i>DOCKING</i>	57
VISUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS	57
CONSTRUCCIÓN DE VECTORES RECOMBINANTES	58
PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> , DE PROCÍCLICOS DE <i>T. BRUCEI</i> Y DE PROMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i>	58
PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO A PARTIR DE <i>E. COLI</i> DH5A	58
CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES RECOMBINANTES DE EXPRESIÓN EN <i>T. CRUZI</i>	58

CONSTRUCCIÓN DE VECTORES RECOMBINANTES DE EXPRESIÓN EN LEVADURAS <i>S. POMBE</i> Y BACTERIAS <i>E. COLI</i> :	62
PREPARACIÓN DE <i>E. COLI</i> ELECTROCOMPETENTES Y ELECTROPORACIÓN	64
VERIFICACIÓN DE LOS CLONADOS POR <i>COLONY PCR</i>	65
CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE <i>S. POMBE</i> Δ <i>RIB5</i> QUE EXPRESAN LOS POTENCIALES TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA	66
CEPA DE <i>S. POMBE</i> Y MEDIOS DE CULTIVO	66
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>S. POMBE</i>	66
PREPARACIÓN DEL FRAGMENTO DE ADN CONTENIENDO EL GEN <i>KANMX6</i> FLANQUEADO POR SECUENCIAS DE <i>RIB5</i>	66
PREPARACIÓN DE <i>S. POMBE</i> ELECTROCOMPETENTES Y ELECTROPORACIÓN	68
CHEQUEO DE LEVADURAS <i>S. POMBE</i> MUTANTES Δ <i>RIB5</i>	69
ELECTROPORACIÓN DE <i>S. POMBE</i> Δ <i>RIB5</i> CON LAS CONSTRUCCIONES pREP3x - RibJ	69
ENSAYOS FUNCIONALES DE RibJ EN EL SISTEMA HETERÓLOGO <i>E. COLI</i> Δ <i>RIBB</i> AUXÓTROFAS PARA RIBOFLAVINA	69
MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> Δ <i>RIBB</i>	70
PREPARACIÓN DE <i>E. COLI</i> Δ <i>RIBB</i> ELECTROCOMPETENTES Y ELECTROPORACIÓN	70
ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DE CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> Δ <i>RIBB</i> EXPRESANDO RibJ.....	70
ENSAYOS DE TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN <i>E. COLI</i> Δ <i>RIBB</i> EXPRESANDO RibJ	71
DESPLAZAMIENTO DEL TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN <i>E. COLI</i> Δ <i>RIBB</i>	72
ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN <i>E. COLI</i> Δ <i>RIBB</i> EXPRESANDO RibJ	72
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RibJ EN <i>E. COLI</i> BL21 POR <i>WESTERN BLOT</i>	73
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE <i>E. COLI</i>	73
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y TRANSFERENCIA.....	73
REVELADO DE <i>WESTER BLOT</i>	74
PREPARACIÓN DE CEPAS TRANSGÉNICAS DE <i>T. CRUZI</i>	75
PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	75
PREPARACIÓN DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> ELECTROCOMPETENTES Y ELECTROPORACIÓN	75
VERIFICACIÓN DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> MJ-LEVIN SOBRE-EXPRESANDO TcRibJ	76
DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE TcRibJ POR <i>SOUTHERN BLOT</i>	76
DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE TcRibJ POR PCR SEMI-CUANTITATIVA.....	78

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>TcRibJ</i> POR RT-PCR SEMI-CUANTITATIVA	78
CUANTIFICACIÓN DE FLAVINAS INTRACELULARES EN EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	78
PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	78
SEPARACIÓN DE FLAVINAS POR HPLC.....	79
ENSAYOS DE TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN TRIPANOSOMÁTIDOS.....	80
PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS Y MEDICIÓN DEL TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	80
ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DEL TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN <i>T. CRUZI</i>	80
ENSAYOS DE METACICLOGÉNESIS.....	81
SOBREVIDA DE TRIPOMASTIGOTES SANGUÍNEOS DE <i>T. CRUZI</i>	81
ENSAYOS SOBRE MONOCAPA DE CÉLULAS H9C2	82
INFECTIVIDAD Y REPLICACIÓN INTRACELULAR DE AMASTIGOTES	82
TOXICIDAD DE LOS ANÁLOGOS DE RIBOFLAVINA SOBRE LAS CÉLULAS H9C2.....	83
RESULTADOS	86
FLAVINAS Y POTENCIAL FLAVOPROTEOMA DE TRIPANOSOMÁTIDOS.....	87
FLAVINAS: EFECTOS EN LA PROLIFERACIÓN DE TRIPANOSOMÁTIDOS	88
EFFECTO DE LAS FLAVINAS EN LA PROLIFERACIÓN DE <i>T. CRUZI</i>	89
EFFECTO DE FLAVINAS EN LA PROLIFERACIÓN DE PARÁSITOS PATÓGENOS DE HUMANOS RELACIONADOS A <i>T. CRUZI</i>	92
EFFECTO DE FLAVINAS EN LA PROLIFERACIÓN DE PARÁSITOS NO-PATÓGENOS DE HUMANOS RELACIONADOS A <i>T. CRUZI</i>	97
EFFECTO DE ANÁLOGOS DE RIBOFLAVINA EN LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE <i>T. CRUZI</i>	102
EFFECTO DE ANÁLOGOS DE FLAVINAS EN LA PROLIFERACIÓN DE PARÁSITOS PATÓGENOS DE HUMANOS RELACIONADOS A <i>T. CRUZI</i>	104
EFFECTO DE ANÁLOGOS DE FLAVINAS EN LA PROLIFERACIÓN DE PARÁSITOS NO-PATÓGENOS DE HUMANOS RELACIONADOS A <i>T. CRUZI</i>	106
TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN TRIPANOSOMÁTIDOS: ESTUDIO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS Y LA ESPECIFICIDAD DEL TRANSPORTE	110
ENSAYOS DE INCORPORACIÓN DE RIBOFLAVINA EN TRIPANOSOMÁTIDOS.....	110

ESPECIFICIDAD DEL TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN <i>T. CRUZI</i>	113
IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA EN KINETOPLÁSTIDOS: BÚSQUEDA <i>IN SILICO</i> Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS DE LAS SECUENCIAS	116
IDENTIFICACIÓN DE UN POTENCIAL TRANSPORTADOR DE RIBOFLAVINA EN EL GENOMA DE <i>T. CRUZI</i>	116
IDENTIFICACIÓN DE POTENCIAL TRANSPORTADOR DE RIBOFLAVINA EN EL GENOMA DE DIVERSOS TRIPANOSOMÁTIDOS	118
IDENTIFICACIÓN DE POTENCIAL TRANSPORTADOR DE RIBOFLAVINA EN EL GENOMA DE OTROS KINETOPLÁSTIDOS	121
NUEVA FAMILIA DE TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA EN KINETOPLÁSTIDOS: APROXIMACIONES ESTRUCTURALES Y FILOGENÉTICAS DE SUS SECUENCIAS	123
BÚSQUEDA DE POSIBLES SEGMENTOS HIDROFÓBICOS EN LAS SECUENCIAS PROTEICAS DE RibJ	123
IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES DOMINIOS PROTEICOS MFS (<i>MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY</i>) EN RibJ	127
ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE RibJ EN KINETOPLÁSTIDOS	129
ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA SECUENCIA DE RibJ COMPARANDO CON TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA IDENTIFICADOS PREVIAMENTE	130
BÚSQUEDA DE SECUENCIAS CON SIMILITUD A RibJ EN OTROS ORGANISMOS	133
COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE RibJ CON LOS TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATOS DE HUMANOS	135
MODELADO ESTRUCTURAL DEL TRANSPORTADOR DE RIBOFLAVINA <i>TcRibJ</i>	137
ENSAYO DE <i>DOCKING</i> : ANÁLISIS DE INTERACCIÓN DE <i>TcRibJ</i> CON FLAVINAS	143
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN <i>TcRibJ</i> POR SOBRE-EXPRESIÓN HOMÓLOGA EN <i>T. CRUZI</i>	146
CORROBORACIÓN DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE <i>TcRibJ</i> EN PARÁSITOS MJ-LEVIN	146
EFFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE <i>TcRibJ</i> EN LA PROLIFERACIÓN DE <i>T. CRUZI</i> EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVINAS.....	150
EFFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE <i>TcRibJ</i> EN LA PROLIFERACIÓN DE <i>T. CRUZI</i> EN PRESENCIA DE ANÁLOGOS DE RIBOFLAVINA	153
EFFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE <i>TcRibJ</i> EN LA INCORPORACIÓN DE RIBOFLAVINA DE <i>T. CRUZI</i>	155
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MIEMBROS DE LA FAMILIA RibJ EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA .	158
ENSAYO EN LEVADURAS DE <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	158

ENSAYO EN BACTERIAS <i>E. COLI</i> AUXÓTROFAS PARA RIBOFLAVINA (Δ RIBB)	161
EFFECTO DE LAS FLAVINAS Y SUS ANÁLOGOS EN DIFERENTES PROCESOS BIOLÓGICOS DE <i>T. CRUZI</i>	168
INFLUENCIA DE LAS FLAVINAS Y ANÁLOGOS TÓXICOS EN LA CAPACIDAD METACICLOGÉNICA DE <i>T. CRUZI</i>	168
SOBREVIDA E INFECTIVIDAD DE TRIPOMASTIGOTES, Y PROLIFERACIÓN DE AMASTIGOTES EN PRESENCIA DE ANÁLOGOS DE RIBOFLAVINA	171
BÚSQUEDA Y ANÁLISIS DE FÁRMACOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD INHIBITORIA DE TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN <i>T. CRUZI</i>	177
EFFECTO DE LAS DROGAS DAUNOMICINA Y DOXORUBICINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	177
EFFECTO DE LAS DROGAS DAUNOMICINA Y DOXORUBICINA SOBRE LA CAPACIDAD METACICLOGÉNICA DE <i>T. CRUZI</i>	178
EFFECTO DE LAS DROGAS DAUNOMICINA Y DOXORUBICINA SOBRE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE TRIPOMASTIGOTES TCTs Y REPLICACIÓN INTRACELULAR DE AMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	179
EFFECTO DE LAS DROGAS DAUNOMICINA Y DOXORUBICINA SOBRE EL TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	181
<u>DISCUSIÓN</u>	183
RELEVANCIA DE LAS TRIPANOSOMIASIS	184
ESENCIALIDAD DE LAS VITAMINAS DEL COMPLEJO B EN TRIPANOSOMÁTIDOS: ENFOQUE ESPECIAL EN FLAVINAS	184
ROL DE FLAVINAS Y FLAVOPROTEÍNAS EN <i>T. CRUZI</i> Y TRIPANOSOMÁTIDOS RELACIONADOS	185
OBTENCIÓN DE VITAMINAS DEL COMPLEJO B EN <i>T. CRUZI</i> Y TRIPANOSOMÁTIDOS RELACIONADOS	187
OBTENCIÓN DE FLAVINAS EN <i>T. CRUZI</i> Y TRIPANOSOMÁTIDOS RELACIONADOS	188
TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN <i>T. CRUZI</i> Y TRIPANOSOMÁTIDOS RELACIONADOS	189
COMPARACIÓN CON TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA PREVIAMENTE IDENTIFICADOS	191
ESENCIALIDAD DEL TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA EN EL CICLO DE VIDA DE <i>T. CRUZI</i>	195
IDENTIFICACIÓN DE LA FAMILIA RibJ COMO TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA EN TRIPANOSOMÁTIDOS	204
PARTICIPACIÓN DE TRANSPORTADORES DE RIBOFLAVINA EN INFECCIÓN	210
<u>CONCLUSIONES</u>	211

<u>COAUTORÍA Y FINANCIAMIENTO.....</u>	<u>214</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>215</u>
<u>APÉNDICE.....</u>	<u>227</u>

Trabajos Publicados

“Novel 2- arylazoimidazole Derivatives as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Proliferation: Synthesis and Evaluation of their Biological Activity”. Salerno A, Celentano AM, López J., Lara V, Gaozza C, **Balcazar DE**, Carrillo C, Frank F, Blanco MM. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016 Sep, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.09.045. IN PRESS.

“*Trypanosoma cruzi* Polyamine Transporter: Its Role on Parasite Growth and Survival Under Stress Conditions”. Reigada C, Sayé M, Valera Vera E, **Balcazar DE**, Fraccaroli L, Carrillo C, Miranda MR, Pereira CA. *The Journal of Membrane Biology*. 2016 Aug; 249(4):475-81. doi: 10.1007/s00232-016-9888-z.

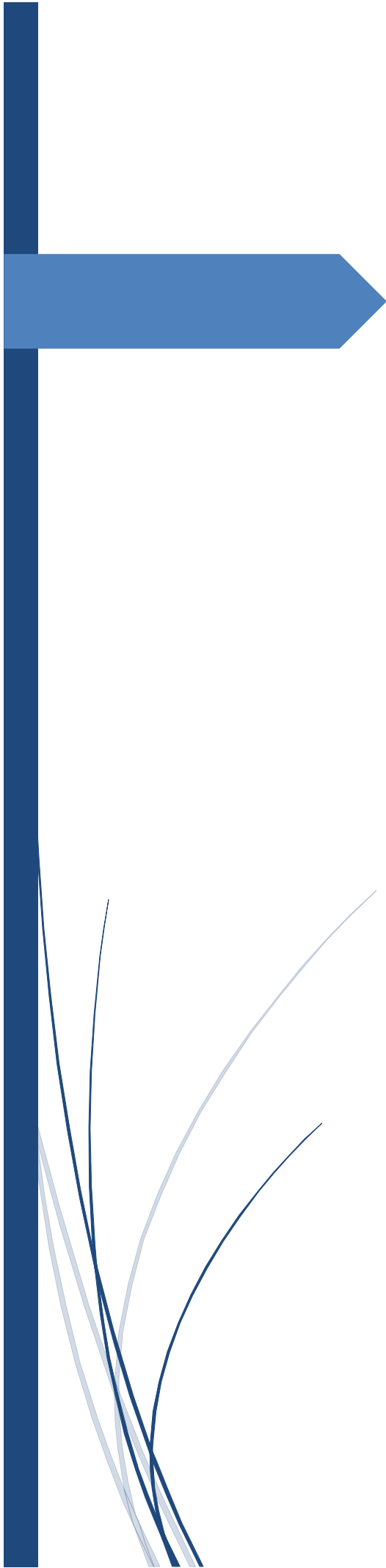
“Discovery of Novel Polyamine Analogs with anti-Protozoal Activity by Computer Guided Drug Repositioning”. Lucas N. Alberca, María L. Sbaraglini, **Darío E. Balcazar**, Laura Fraccaroli, Carolina Carrillo, Andrea Medeiros, Diego Benitez, Marcelo Comini, Alan Talevi. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2016 Apr; 30(4):305-21. doi: 10.1007/s10822-016-9903-6

“Computer-guided drug repurposing: Identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir”. Carolina L. Bellera, **Darío E. Balcazar**, M. Cristina Vanrell, A. Florencia Casassa, Pablo H. Palestro, Luciana Gavernet, Carlos A. Labriola, Jorge Gálvez, Luis E. Bruno-Blanch, Patricia S. Romano, Carolina Carrillo, Alan Talevi. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015 Mar 26; 93:338-48. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.01.065.

“High-throughput Drug Repositioning for the Discovery of New Treatments for Chagas Disease”. Bellera CL, Sbaraglini ML, **Balcazar DE**, Fraccaroli L, Vanrell MC, Casassa FA, Labriola CA, Romano PS, Carrillo C, Talevi A. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2015; 15(3):182-93. doi: 10.2174/138955751503150312120208.

“Identification of Levothyroxine Antichagasic Activity through Computer-Aided Drug Repurposing,” Bellera CL, **Balcazar DE**, Alberca L, Labriola CA, Talevi A, Carrillo C. *The Scientific World Journal*. 2014 Jan 30; 2014:279618. doi: 10.1155/2014/279618.

“Application of computer-aided drug repurposing in the search of new cruzipain inhibitors: discovery of amiodarone and bromocriptine inhibitory effects”. Bellera CL, Balcazar DE, Alberca L, Labriola CA, Carrillo C, Talevi A. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013 Sep 23; 53(9):2402-8. doi: 10.1021/ci400284v.



INTRODUCCIÓN

Tripanosomátidos: estadios celulares y morfología

Los tripanosomátidos son **parásitos eucariotas unicelulares**, la mayoría de los cuales parasitan exclusivamente invertebrados; sin embargo algunos de ellos cumplen parte de su ciclo como parásito patógeno de vertebrados (incluidos el humano) o plantas (H. Lopes 2010).

A lo largo de su ciclo biológico los tripanosomátidos presentan distintos estadios celulares con una morfología distinguible en cada caso, según los diversos ambientes que ocupan y sus funciones biológicas (**Figura I-1**). Las diferentes formas se diferencian por las dimensiones, la posición relativa del complejo kinetoplasto - bolsillo flagelar - núcleo, la presencia o ausencia de un flagelo funcional, y si el mismo está o no adherido al cuerpo del parásito:

- los **epimastigotes** son células prolongadas cuyo bolsillo flagelar se encuentra ubicado en uno de sus laterales, y junto con el kinetoplasto, se localizan anterior al núcleo. Además, su flagelo se encuentra adherido al cuerpo celular;
- los **tripomastigotes** son similares a los anteriores, salvo que su complejo kinetoplasto - bolsillo flagelar se encuentra posterior al núcleo;
- los **promastigotes** y **coanomastigotes** tienen un flagelo no adherido al cuerpo celular y el complejo kinetoplasto - bolsillo flagelar se ubica anterior al núcleo. Los promastigotes son de forma alargada, mientras los coanomastigotes son redondeados en su parte posterior pero truncados en la parte anterior;
- los **amastigotes** son células redondeadas no móviles debido a que su flagelo es muy corto y no emerge del bolsillo flagelar.

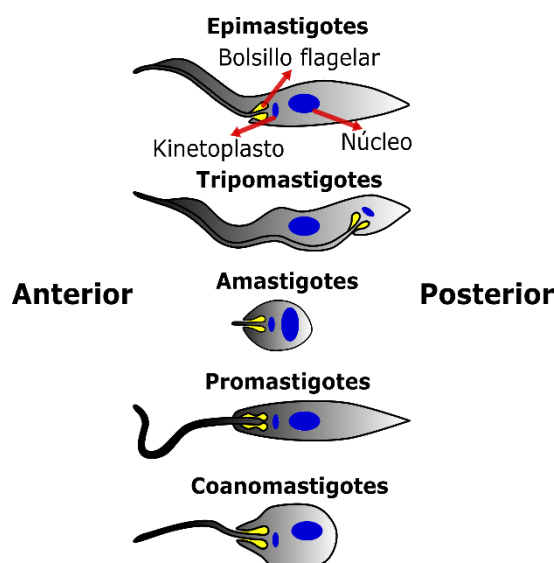


Figura I-1. Estadíos celulares y la morfología de los tripanosomátidos, con los que se trabajó a lo largo de esta tesis. Adaptado de Lopes et al (H. Lopes 2010).

Ciclos de vida

A lo largo de sus ciclos de vida, los cambios morfológicos de estos microorganismos se acompañan de adaptaciones a nivel bioquímico, metabólico, de expresión génica, etc. en respuesta a los cambios ambientales a los que se enfrentan. A grande rasgos, los tripanosomátidos alternan entre dos estadíos altamente especializados: un estadío proliferativo y otro infectivo. El estadío proliferativo es considerado como una adaptación al hospedador, mientras que el estadío infectivo, es una pre-adaptación al siguiente hospedador (Wheeler et al. 2013).

Los tripanosomátidos pueden clasificarse según el tipo de ciclo de vida (Votýpka et al. 2015):

- monogeneico, en la que sólo infecta a un tipo de hospedador, generalmente invertebrado. Entre ellos, se destacan los tripanosomátidos del género *Crithidia*, *Lotmaria*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*;
- digeneico, alterna entre 2 hospedadores: uno invertebrado y el otro vertebrado o una planta. Entre los tripanosomátidos digeneicos se incluyen parásitos patógenos para el hombre, siendo responsables de graves enfermedades: *Trypanosoma cruzi* (agente causal de la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana), *Trypanosoma brucei* (responsable de la

Enfermedad del Sueño o Tripanosomiasis Humana Africana), y varios tipos de leishmaniasis (cutánea, mucocutánea o visceral) causadas por distintas especies del género *Leishmania*. Otros parásitos digeneicos de importancia agronómica son los tripanosomátidos del género *Phytomonas* (Jaskowska et al. 2015).

Trypanosoma cruzi

El Dr. Carlos Chagas fue el primero en identificar al parásito *T. cruzi* (quien inicialmente lo denominó *Schizotrypanum cruzi*, en honor al médico y su mentor Oswaldo Cruz) como el agente responsable de la Enfermedad de Chagas en 1909; y en poco más de un año, describió al parásito en sus distintas formas, su ciclo de vida, sus hospedadores y diversos cuadros clínicos asociados a la enfermedad (Naquira & Cabrera 2009).

El **ciclo de vida** de *T. cruzi* alterna entre **4 formas morfológica- y biológicamente distintas**. El **tripomastigote metacíclico** (estadío infectivo) se desarrolla en el intestino posterior del vector triatomino (invertebrados pertenecientes a la familia *Reduviidae*). Esta forma del parásito ingresa al hospedador mamífero a través de las heces del vector e infecta diversos tipos de células (entre ellas, macrófagos, células musculares, etc.). Una vez en el citoplasma de la célula, el parásito se diferencia a la forma **amastigote** (estadío replicativo) que, luego de multiplicarse varias veces, se transforma a **tripomastigote sanguíneo** (estadío infectivo). El gran aumento en el número de parásitos intracelulares provoca la lisis de la célula hospedadora, liberando las formas amastigote y tripomastigote sanguíneo que pueden invadir células vecinas o acceder, por capilares y vasos sanguíneos, a otros tejidos del hospedador. Cuando el insecto vector se alimenta de personas o animales infectados, ingiere los tripomastigotes sanguíneos que diferencian a **epimastigotes** (estadío replicativo) en su tubo digestivo (intestino medio). Hacia el recto del triatomino, los parásitos se diferencian a la forma infectiva de **tripomastigote metacíclico**, reiniciándose el ciclo (**Figura I-2**) (Atwood et al. 2005).

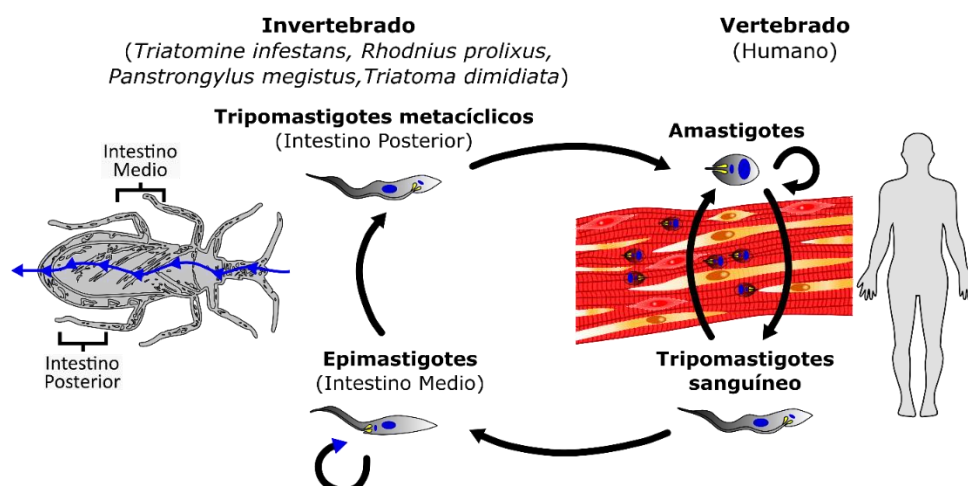


Figura I-2. Representación del ciclo de vida de *T. cruzi*. Las flechas azules indica el recorrido del parásito *T. cruzi* en el sistema digestivo del insecto-vector. Figura adaptada de Lopes et. al (H. Lopes 2010).

Trypanosoma brucei

El microbiólogo y patólogo escocés David Bruce fue el primero en identificar al parásito *T. brucei* como el agente causal de la tripanosomiasis bovina en 1895 y, mediante posteriores investigaciones realizadas a principios del siglo XX, estos parásitos también se encontraron en humanos (Steverding 2008).

El ciclo de vida de *T. brucei* comienza cuando la mosca Tsé-Tsé (género *Glossina* sp.) infectada con la forma **tripomastigote metacíclico** (estadío infectivo contenido en las glándulas salivales), ingiere sangre del mamífero y, al mismo tiempo, favorece el ingreso del tripanosomátido al torrente sanguíneo del hospedador. El tripomastigote metacíclico se diferencia a **tripomastigote sanguíneo o "long slender"** (estadío replicativo), estableciendo y manteniendo la infección en el hospedador mamífero. A diferencia de lo que sucede en *T. cruzi*, *T. brucei* es un parásito extracelular permaneciendo libre en el torrente sanguíneo; en algunos casos, atraviesa el endotelio de los vasos sanguíneos, alcanzando otros tejidos como el sistema nervioso central. En el torrente sanguíneo, la forma *long slender* se diferencia a **tripomastigotes sanguíneo o "short stumpy"**, estadío infectivo y pre-adaptado para sobrevivir en la mosca Tsé-Tsé. Cuando el insecto se alimenta de la sangre de personas o animales infectados, también ingiere parásitos en el estadío *short stumpy*. En el intestino medio de la mosca, se diferencia a **tripomastigote procíclico**

(estadío replicativo), que migra hacia el proventrículo donde sufre una nueva reestructuración hacia la forma **epimastigote** (estadío replicativo). Estos migran hacia las glándulas salivares de la mosca, donde se replican continuamente y se completa el ciclo con la diferenciación hacia la forma **tripomastigote metacíclico** (Figura I-3) (Langousis & Hill 2014).

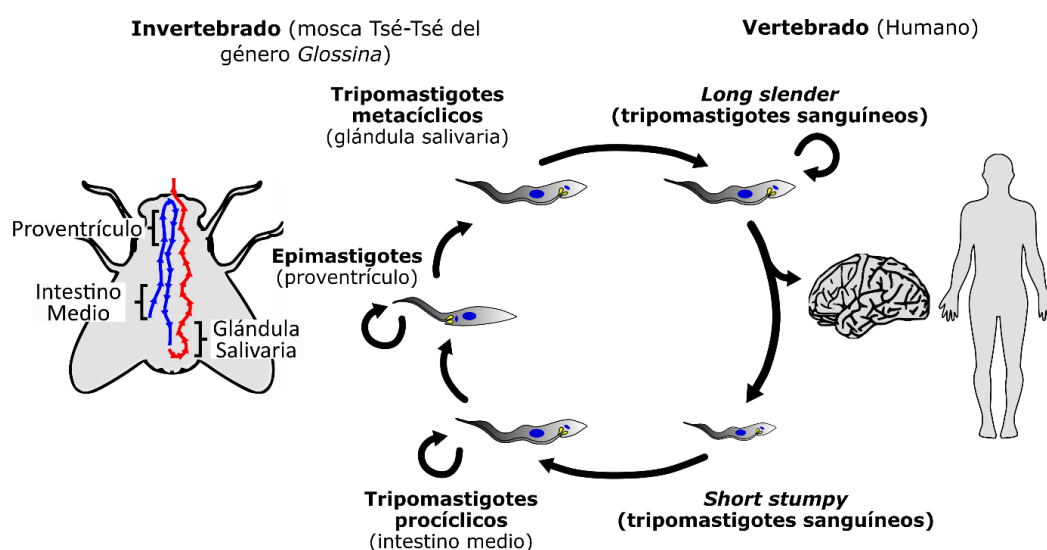


Figura I-3. Representación del ciclo de vida de *T. brucei*. Las flechas azules indica el recorrido del parásito *T. brucei* desde el intestino medio hacia las glándulas salivarias (pasando por el proventrículo); las flechas rojas señalan el camino desde estas glándulas hacia el exterior. Figura adaptada de Lopes et. al (H. Lopes 2010).

***Leishmania* spp.**

Si bien existen varios antecedentes de leishmaniasis que datan de varios cientos de años atrás, no fue hasta el año 1900 que se identificó al parásito responsable de la enfermedad, a manos del doctor de la armada escocesa, Dr. William Leishman, y del profesor de fisiología Charles Donovan (Ul Bari 2006).

La infección inicia cuando mosquitos del género *Phlebotomus* sp., *Psychodopygus* sp. o *Lutzomyia* sp. se alimentan de sangre de mamíferos, permitiendo que las formas **promastigotes metacíclicos** (estadío infectivo) ingresen al hospedador. Con la picadura del mosquito se liberan sustancias que reclutan células del sistema inmune como macrófagos. Los promastigotes metacíclicos reconocen y se asocian a la membrana del macrófago, seguido por la invasión hacia el interior de esta célula

vía fagocitosis. Los fagosomas conteniendo parásitos maduran a través de la fusión de lisosomas y endosomas tardíos, y forman la vacuola parasitófora. En este nuevo microambiente, se produce la diferenciación hacia la forma **amastigote** (estadio replicativo). La continua división de estos parásitos intracelulares lleva a la ruptura de la vacuola parasitófora y del macrófago, dispersando la infección hacia otras células fagocíticas profesionales y otros tipos celulares como fibroblastos. Cuando el mosquito se alimenta de mamíferos infectados, ingiere amastigotes que, en su intestino medio abdominal, diferencian a la forma **promastigote procíclico** (estadio replicativo). Esta forma migra al intestino medio torácico, y allí se diferencia a la forma **promastigote metacíclico** (estadio infeccioso), reiniciándose el ciclo (**Figura I-4**) (Podinovskaia & Descoteaux 2015).

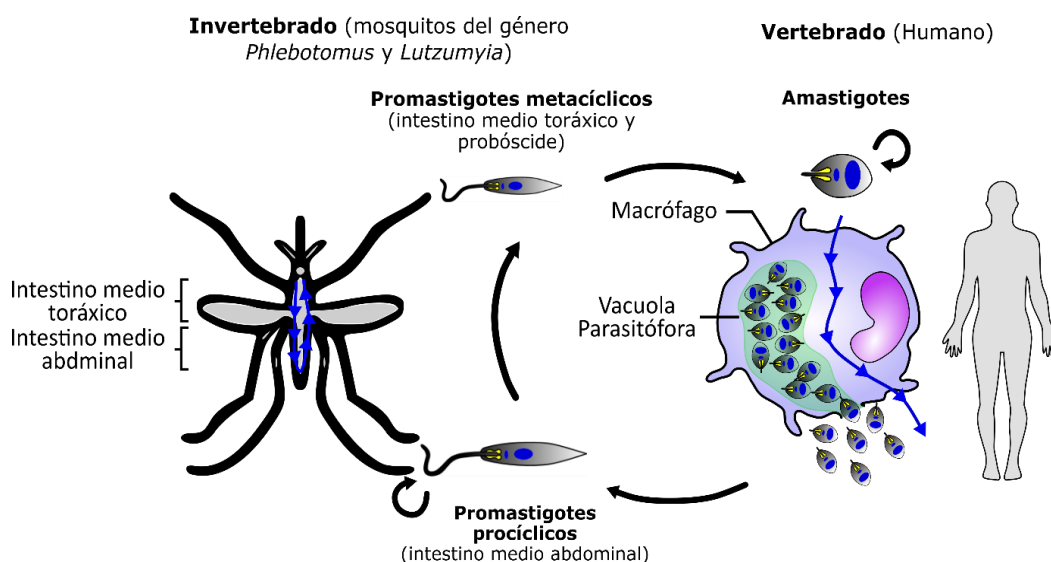


Figura I-4. Representación del ciclo de vida de *Leishmania* sp. Las flechas azules indican el recorrido que realizan estos parásitos en el tubo digestivo del mosquito y el macrófago, según corresponda. Figura adaptada de Lopes et. al (H. Lopes 2010).

***Phytomonas* spp.**

Hace poco más de 100 años, Lafont identificó el primer tripanosomátido presente en los tubos laticíferos de plantas de *Euphorbia pilulifera*, las cuales mostraban severos defectos en su crecimiento.

Phytomonas sp. es un tripanosomátido transmitido por insectos fitófagos pertenecientes a 3 familias del orden Hemiptera: Lygaeidae (*Nysius euphorbiae*), Coreidae (*Dicranocephalus agilis*) y Pentatomidae (*Nezara viridula*) (Camargo & Wallace 1994). Hasta el momento, sólo se conoce la forma **promastigotes** de *Phytomonas* sp. que, a diferencia del resto de los tripanosomátidos, tiene una forma espiralada. Cuando los insectos se alimentan de fluidos de plantas infectadas, los parásitos ingresan a su tracto intestinal, alcanzan el hemocelo y se dirigen hacia las glándulas salivarias. Cuando los insectos se alimentan, los parásitos son inoculados a la planta a través de su saliva (**Figura I-5**). Por otra parte, no es posible descartar que *Phytomonas* sp. sea transmitida entre los insectos a través de la coprofagia (H. Lopes 2010).

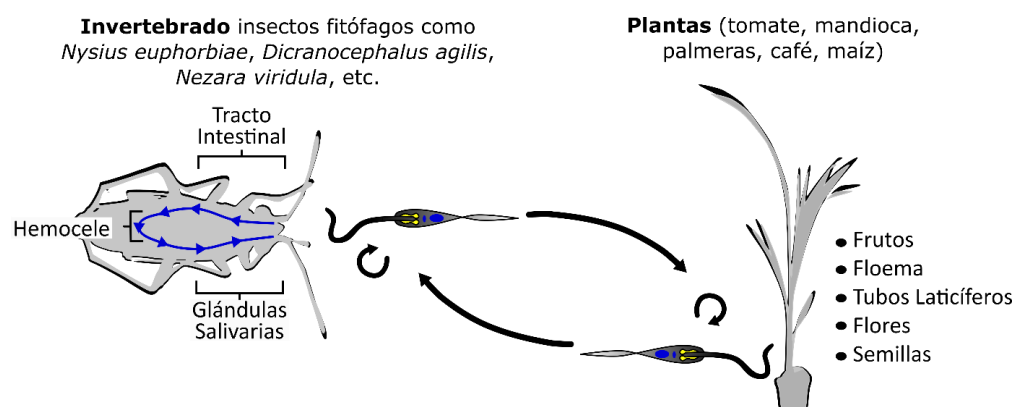


Figura I-5. Representación del ciclo de vida de *Phytomonas* spp. Las flechas azules indican el recorrido del parásito en el hospedador invertebrado. Figura adaptada de Lopes et. al (H. Lopes 2010).

Crithidia fasciculata

La primera observación de flagelados en mosquitos fue realizada por Ronald Ross en 1898; y en 1902, los estudios de Louis Léger (basados en la descripción de varios tripanosomátidos de algunos dípteros) llevaron a la formación del género *Crithidia* (Wallace 1966). Sin embargo en los últimos años, este género sufrió importantes modificaciones. Esto se debe a que, inicialmente, estos parásitos fueron clasificados de acuerdo al criterio de “un parásito - un hospedador”; y contrariamente al mismo, se demostró que existe una amplia variedad de niveles en la especificidad parásito – hospedador (Votýpka et al. 2015). De esta manera, muchos de sus miembros fueron reclasificados y, actualmente, *C. fasciculata* es el principal representante de

este grupo. La forma replicativa **coanomastigote** coloniza el intestino del mosquito (género *Culex* sp.), y algunos de ellos se diferencian a **amastigote** que se asocia al epitelio intestinal del mosquito. El amastigote se libera al ambiente (en cuerpos de agua, flores, etc.) a través de las heces o de otros hospedadores infectados muertos. Las larvas del mosquito, que viven en ambientes acuáticos, se infectan con los amastigotes que persisten hasta que el hospedador alcanza el estadio adulto. Estos amastigotes vuelven a diferenciarse hacia la forma coanomastigotes (**Figura I-6**) (Alcolea et al. 2014).

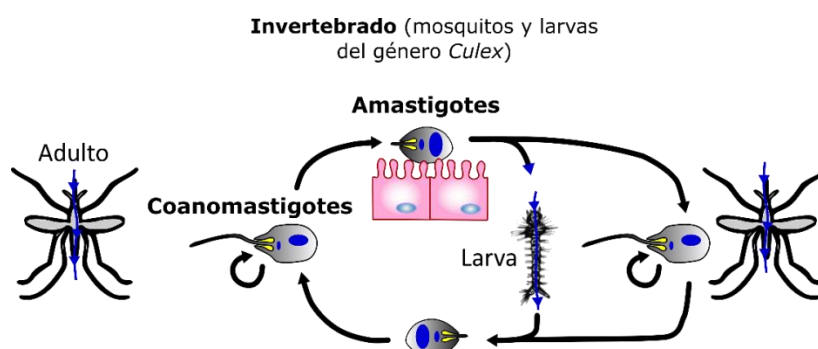


Figura I-6. Representación del ciclo de vida de *C. fasciculata*. Las flechas azules indican el recorrido del parásito en el mosquito y su larva. Figura adaptada de Alcolea et. al (Alcolea et al. 2014).

Patogénesis y Distribución Geográfica de Enfermedades Asociadas a Tripanosomátidos.

Según WHO¹ y PAHO², las “Enfermedades Olvidadas” (o “*Neglected Diseases*”) son aquellas que reciben poca atención, lo cual dificulta el acceso de millones de personas a los tratamientos disponibles. Hoy en día se distinguen 19 Enfermedades Olvidadas, entre las que se destacan la Enfermedad de Chagas, la Enfermedad del Sueño y los diferentes tipos de leishmaniasis (García-Bournissen et al. 2015).

Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana)

La Enfermedad de Chagas, históricamente ha afectado a la población latinoamericana de zonas rurales pobres, cuya principal ruta de infección es través del vector triatomino. Sin embargo, esta

¹ World Health Organization

² Pan American Health Organization

enfermedad también puede ser transmitida por mecanismos independientes al vector: a través de trasplantes de órganos y transfusiones de sangre infectadas, por la ingesta de alimentos contaminados, por accidentes de laboratorio y congénitamente de la madre infectada al hijo (WHO 2015). A causa de estas otras vías, en los últimos años el Chagas se ha dispersado a regiones tradicionalmente no endémicas (WHO 2015).

Fases de la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas en humanos tiene dos fases (Rassi et al. 2012):

- la **fase aguda**: dura unas 2 semanas y generalmente es asintomática. En algunos pacientes pueden desarrollarse síntomas inespecíficos (entre ellos, fiebre prolongada, agrandamiento del bazo, hígado o nodos linfáticos, etc.); en otros puede aparecer el signo de Romaña (cuando la entrada del parásito se produce atravesando la mucosa ocular, generando un doloroso edema en el párpado y en los tejidos circundantes) y en otros casos —especialmente asociados a ciertos géneros de vector— suelen observarse chagomas (eritemas y endurecimiento en la zona de la piel donde se produjo la picadura).
- la **fase crónica**: se desarrolla unos 2 – 3 meses posteriores a la infección. La misma presenta una baja parasitemia y anticuerpos específicos contra *T. cruzi*. En la mayoría de los casos, la enfermedad se mantiene indeterminada o latente por varios años (hasta de por vida) en la que no se desarrollan síntomas. El 20 – 40 % de los portadores de la enfermedad evoluciona a una fase crónica sintomática caracterizada por cardiopatía severa, megaesófago, megacolon o problemas neurológicos.

Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas transmitida por vector se encuentra localizada en 21 países de América Latina: Argentina, Belice, la República Bolivariana de Venezuela, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, el Estado Plurinacional de Bolivia, Surinam y Uruguay (**Figura I-7**) (WHO 2015), y también en el sur de los Estados Unidos (Bern et al. 2011).

Desde 1990, varios Países del Cono Sur, América Central, Países Andinos, Países del Amazonas y México, conjuntamente con PAHO, desarrollaron diversas estrategias para interrumpir la

transmisión de la enfermedad. El relevamiento de este programa realizado en 2010 mostró que en estas regiones hubo una reducción del ~25 % en la muertes anuales asociadas a la enfermedad y en el número estimado de personas infectadas, y un 8 % en los casos de incidencia anual (Pan American Health Organization & World Health Organization 2010). Sin embargo, varios países no pudieron cumplir con los objetivos propuestos.

A su vez, nuevos problemas se hicieron evidentes. Entre ellos, las sucesivas migraciones de personas infectadas a ciudades dentro y fuera de América Latina, junto con las rutas de transmisión independiente de vector y la ausencia de controles para detectar al parásito *T. cruzi*, llevaron a que la Enfermedad de Chagas alcance zonas tradicionalmente no endémicas. Si bien España es el país con mayor número de inmigrantes infectados (47.000 – 67.000), la enfermedad se dispersó también a Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y otros países europeos como Francia, Italia, Suecia, Suiza e Inglaterra (**Figura I-7**) (Rassi et al. 2012). En consecuencia, la Enfermedad de Chagas se volvió un problema de salud pública a nivel mundial, y hoy en día, estos países tradicionalmente no endémicos también desarrollaron mecanismos para evitar las infecciones asociadas a transfusiones y trasplantes de órganos, entre otros (Pan American Health Organization & World Health Organization 2010).

Actualmente, la prevalencia de la Enfermedad de Chagas sigue siendo alta. De acuerdo a los últimos relevamientos realizados por WHO (WHO 2015), se estima que en todo el mundo existe entre 7 – 8 millones de personas infectadas, causando entre 10.000 – 14.000 muertes por año. A su vez, estudios realizados por PAHO indican que existen 65 millones de personas en América que viven en regiones de exposición al vector y, por lo tanto, están en riesgo de contraer la enfermedad

(http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743).

Distribución Global de la Enfermedad de Chagas, basados en datos oficiales entre 2006 - 2010

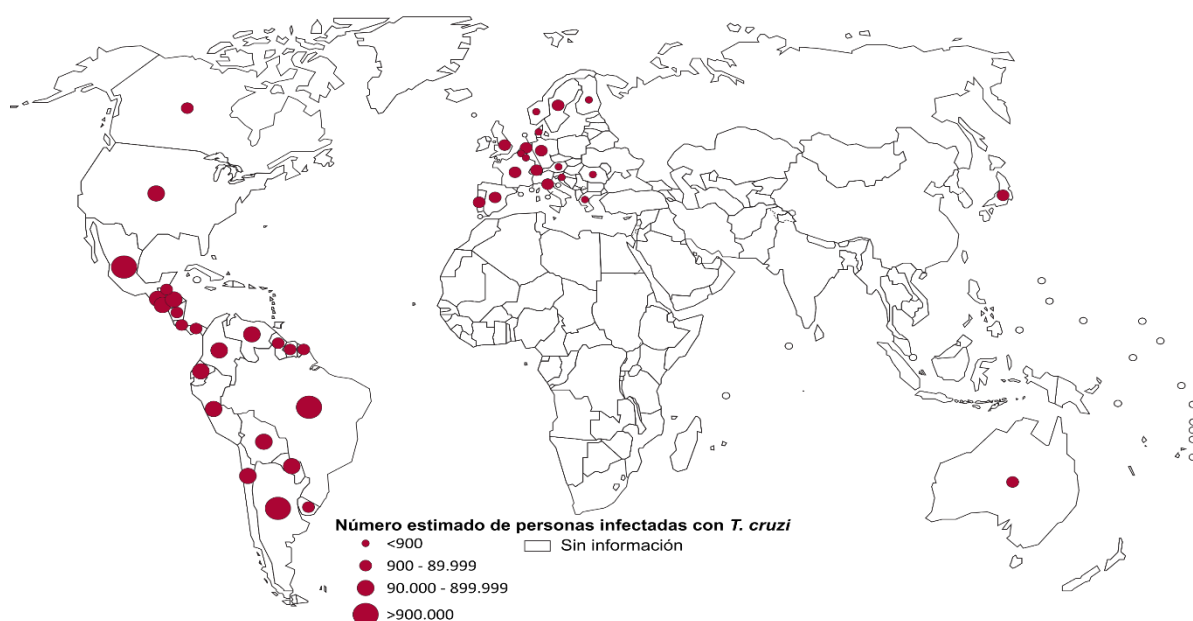


Figura I-7. Distribución global de la Enfermedad de Chagas. Información obtenida de WHO (World Health Organization 2013).

Enfermedad del Sueño (Tripanosomiasis Humana Africana)

Esta enfermedad es causada por dos sub-especies del parásito *T. brucei*: *T. b. gambiense* (responsable del 98 % de los casos reportados entre 2009 - 2011) y *T. b. rhodesiense* (solo el 2 % de los casos). En general, la enfermedad causada por *T. b. gambiense* suele progresar lentamente, mientras *T. b. rhodesiense* es responsable de la forma más aguda (Lutumba et al. 2016).

Fases de la Enfermedad del Sueño

Con ambas sub-especies de *T. brucei*, la enfermedad presenta dos fases:

- **hemo-linfática:** tripomastigotes sanguíneos *long slender* se dispersan por el torrente, pero la parasitemia resulta baja y fluctuante. Los síntomas en esta fase son inespecíficos (fiebre intermitente, malestar general, severos dolores de cabeza, articulaciones, musculares). En menor medida suelen observarse linfadenopatías (en axilas, en ingle y en la cervical), y ensanchamiento de las glándulas localizadas en el triángulo cervical posterior. La duración de esta etapa varía entre meses-años (*T. b. gambiense*) o semanas-meses (*T. b. rhodesiense*).

- **meningo-encefálica:** los parásitos invaden el sistema nervioso central, causando síntomas neurológicos específicos: trastornos en los patrones del sueño, confusión mental, desórdenes psiquiátricos, etc.

Distribución geográfica de la Enfermedad del Sueño

La Enfermedad del Sueño es endémica en 36 países pertenecientes a la región sub-sahariana africana, principalmente en zonas rurales pobres. Según los últimos relevamientos realizados por WHO, durante el período 2009 - 2011, la variante de la enfermedad causada por *T. b. gambiense* afecta a Camerún, El Congo, Costa de Marfil, Guinea Ecuatorial, Gabón, Guinea, Nigeria y Uganda, quienes reportaron poco menos de 100 nuevos casos anuales; además Angola, la República Centroafricana, Chad y Sudán del Sur registraron entre 100 y 1000 nuevos casos anuales. El único país que mostró más de 1000 nuevos casos anuales fue la República Democrática del Congo, sufriendo el 84 % de los casos reportados en 2011 (**Figura I-8A**) (World Health Organization 2013). Desde el mismo año, para el caso de *T. b. rhodesiense*, Kenia y Zimbabue registraron casos esporádicos; Malaui, la República Unida de Tanzania y Zambia reportaron 100 nuevos casos anuales; mientras Uganda mostró entre 100 - 200 nuevos casos anuales (**Figura I-8B**) (World Health Organization 2013).

Sin embargo, cabe destacar que algunos países endémicos para la variante causada por *T. b. gambiense* (como Gambia, Guinea-Bisáu, Liberia, Níger, Senegal y Sierra Leona) o por *T. b. rhodesiense* (como Burundi, Etiopía, Mozambique y Ruanda) no desarrollaron actividades de control de la enfermedad, por lo que hacen falta mediciones para estimar su estatus epidemiológico (World Health Organization 2013).

Estos mismos estudios indican que 70 millones de personas que viven en África están en riesgo de contraer la enfermedad. Según WHO, gracias a los continuos esfuerzos para controlar la enfermedad hubo un gran decrecimiento en el número de casos reportados a nivel global, por lo que existe una gran expectativa en lograr el control de esta enfermedad (WHO 2015).

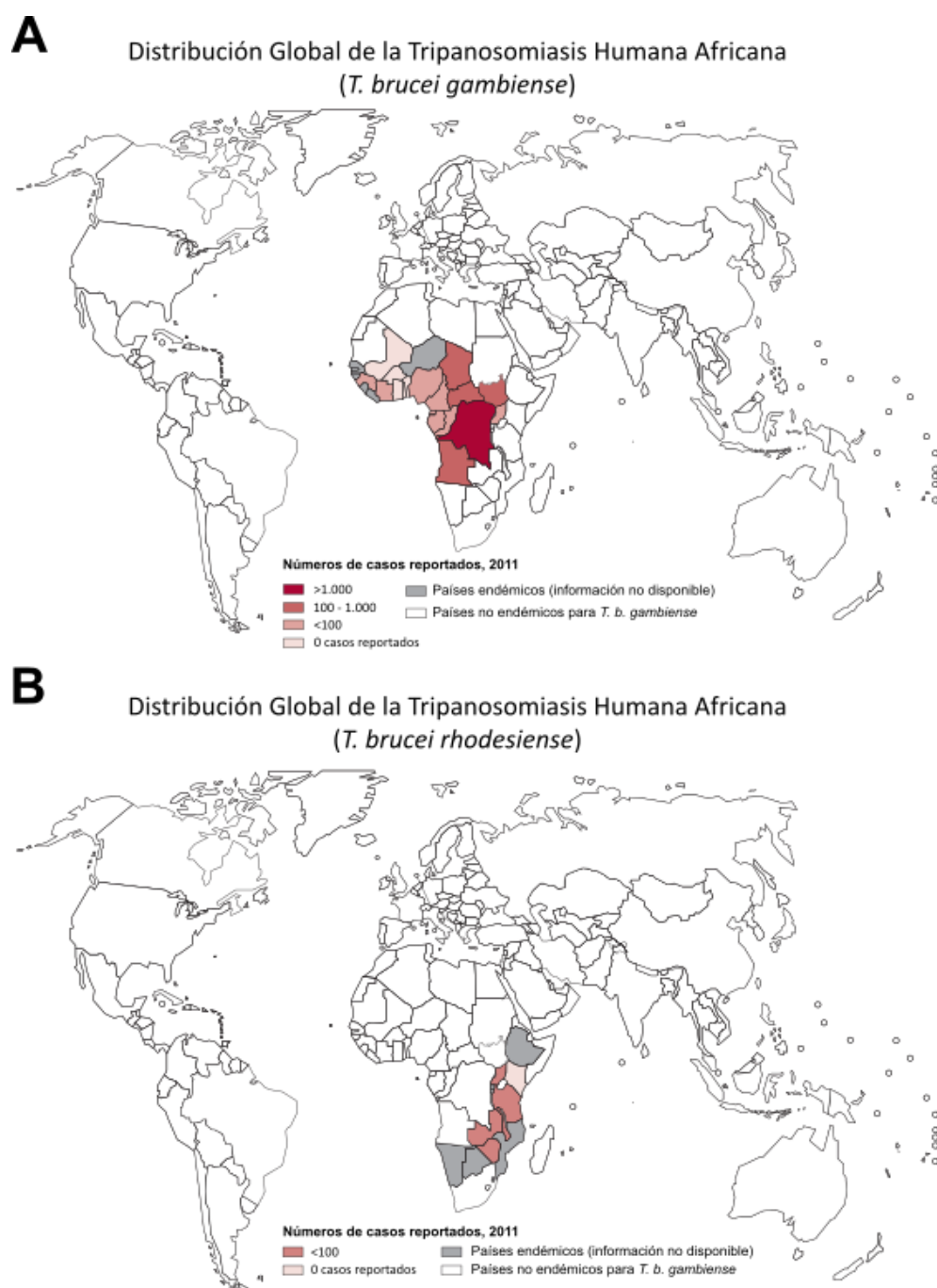


Figura I-8. Distribución global de la Tripanosomiasis Humana Africana, causada por A) *T. b. gambiense*, y por B) *T. b. rhodesiense*. Información obtenida de WHO (World Health Organization 2013).

Leishmaniasis

La leishmaniasis es causada por al menos 20 especies diferentes de parásitos pertenecientes al género *Leishmania*, y se estima que 90 especies de mosquitos son capaces de transmitir la enfermedad en varias partes del mundo.

Tipos de Leishmaniasis

Existen 3 tipos de leishmaniasis: visceral, cutánea o mucocutánea:

- La **leishmaniasis visceral** (causada por *L. donovani* y *L. infantum*) resulta fatal si no se trata adecuadamente. Generalmente, se manifiesta con fiebre prolongada e irregular, con pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia, etc.; en las etapas avanzadas de la enfermedad, se visualiza un severo adelgazamiento, anemia, sangrados internos, ictericia, diarrea y neutropenia, entre otros (Hailu et al. 2016).

Algunas veces, después de los tratamientos evoluciona a la forma cutánea, caracterizada por provocar erupciones maculares, maculopapulares y nodulares en la piel (rostro, cuello, miembros, etc.) (Hailu et al. 2016).

- La **leishmaniasis cutánea** (causada por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. major*, *L. tropica*, y *L. aethiopica*) causa úlceras en la piel que, en algunos casos, desaparecen espontáneamente meses - años siguientes a la infección; mientras en otros casos suelen dejar cicatrices desfigurantes y/o incapacitantes. Un tipo particular de leishmaniasis cutánea es la **forma difusa**, causada por *L. aethiopica*, caracterizándose por máculas, pápulas, nódulos dispersos a lo largo de la piel. Esta sub-forma no se cura espontáneamente, y suele reaparecer después del tratamiento (Hailu et al. 2016).

- La **leishmaniasis mucocutánea** (causada por *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tropica* y *L. infantum*) afecta a las membranas mucosas del tracto respiratorio superior, destruyendo los tejidos blandos de la nariz, boca y garganta (World Health Organization 2013).

Distribución geográfica de leishmaniasis

Las diferentes formas de leishmaniasis afectan a 98 países (**Figura I-9A y B**), estimándose 1,3 millones de nuevos casos anuales: 300.000 son de la forma visceral (90% de los cuales ocurre en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudan del Sur y Sudan), mientras 1 millón son del tipo cutáneo (principalmente en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, la República Islámica de Irán, Paquistán, Perú, Arabia Saudita, la República Árabe Siria y Túnez) o mucocutánea (Brasil, Perú y el Estado Plurinacional de Bolivia) (World Health Organization 2013).

Desde 2007, WHO ha realizado múltiples esfuerzos en expandir los programas de control de leishmaniasis visceral, y en 2010 se establecieron protocolos para su control. Todo este trabajo permitió sentar las bases para lograr la eliminación de esta forma de leishmaniasis en 2020, al menos en el subcontinente indio (WHO 2015).

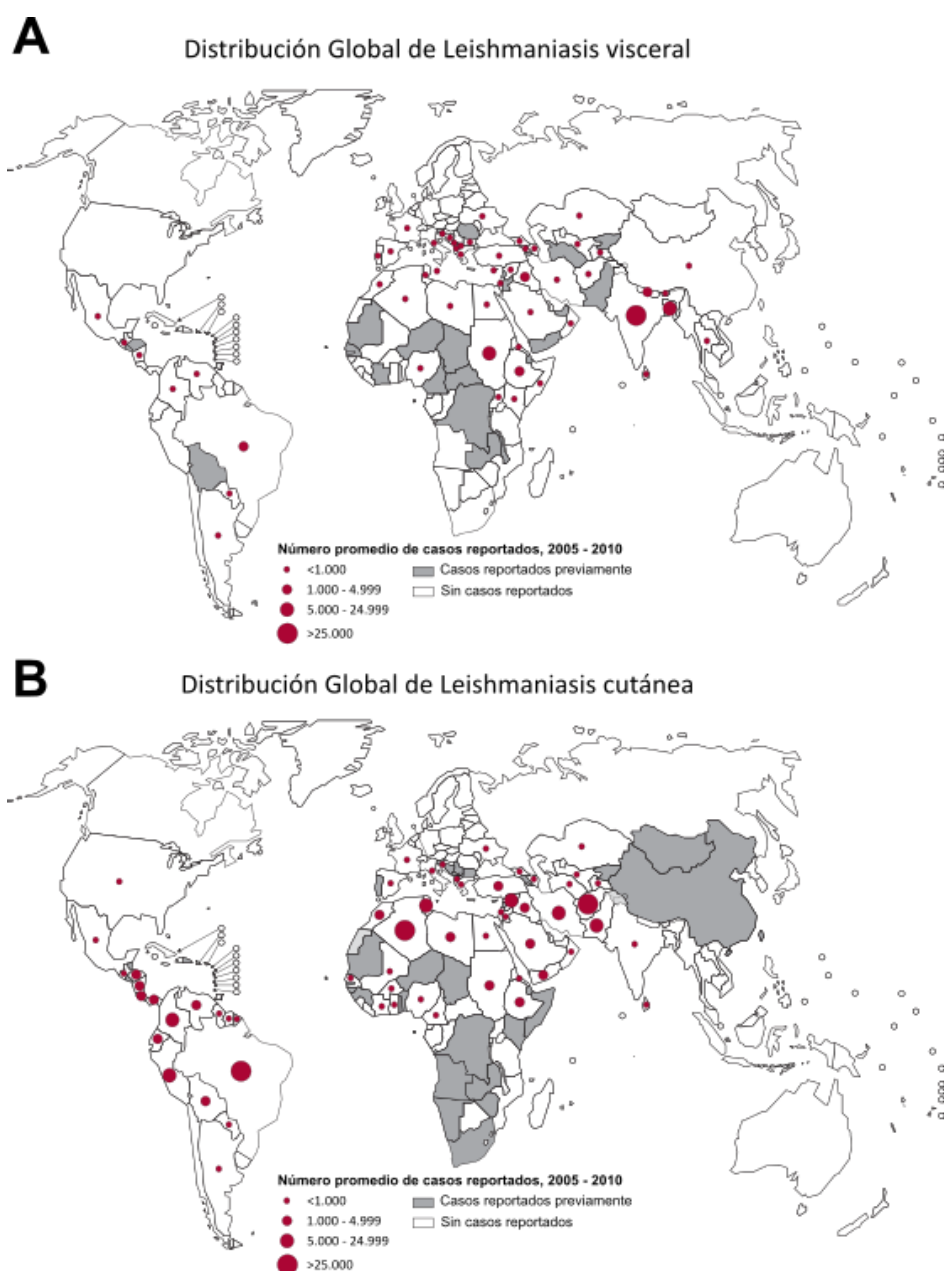


Figura I-9. Distribución global de A) leishmaniasis visceral y B) leishmaniasis cutánea, en el período 2005-2010. Información obtenida de WHO (World Health Organization 2013).

Infecciones en plantas por *Phytomonas* spp.

Los síntomas de enfermedades causadas por *Phytomonas* sp. dependen de la especie del fitoparásito y del hospedador. Actualmente se han caracterizado varias enfermedades. Entre ellas, el fitoparásito *Phytomonas staheli* es el agente causal de la enfermedad *hartrot* (del inglés *rotting of the heart*: putrefacción del corazón) de la palmera de coco (*Cocos nucifera*); este

parásito también causa la enfermedad conocida como “marchitez sorpresiva” del aceite de palma (*Elaeis guineensis*). Ambas comienzan en las hojas y continúan hacia la raíz, siendo letales (Jaskowska et al. 2015).

Por otro lado, *Phytophthora leptovasorum* causa la necrosis del floema de la planta de café (*Liberica coffee* y *Arabica coffee*) (Jaskowska et al. 2015).

Una tercera especie nociva es *Phytophthora francai*, y se cree que está vinculada al síndrome de raíz vacía en mandioca (*Manihot esculenta*). Esta enfermedad se caracteriza por un pobre desarrollo de las raíces y clorosis de las hojas (Jaskowska et al. 2015).

Distribución geográfica

Si bien estos fitoparásitos son nativos de América del Sur (afectando principalmente a Brasil), hoy en día se encontraron en otros lugares del mundo como Europa (España y Francia), en África (costa de Senegal), Asia (India, China, Kazajistán) y Oceanía (como el Estado Queensland de la Mancomunidad de Australia) (H. Lopes 2010; Jaskowska et al. 2015) (**Figura I-10**).

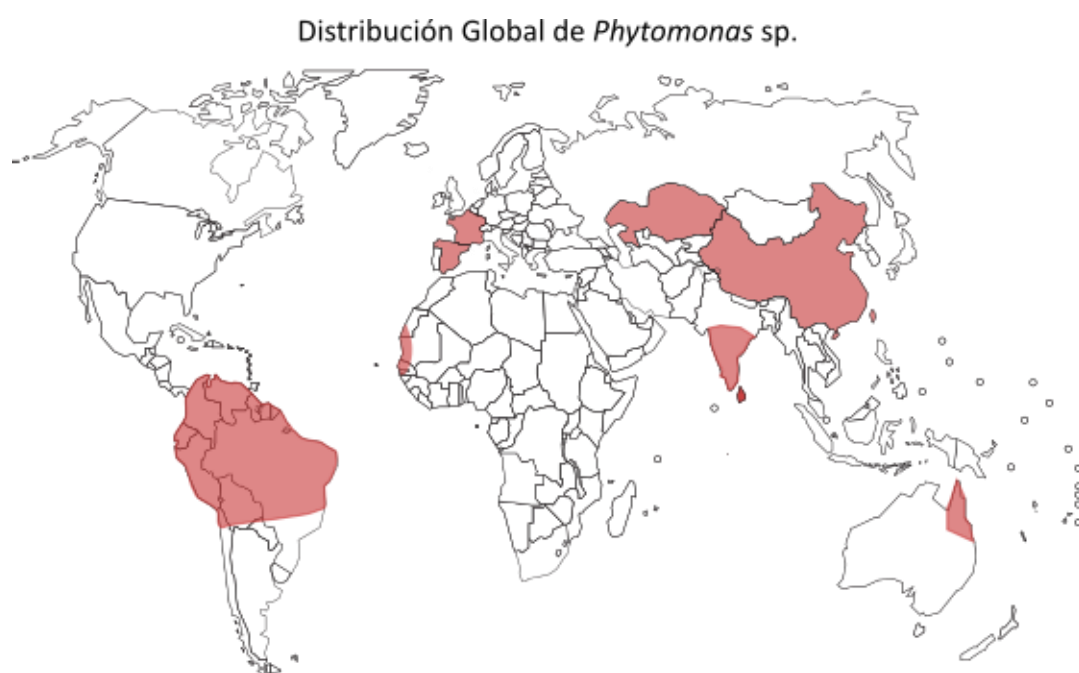


Figura I-10. Distribución global de *Phytophthora* spp. Información editada de Lopes et al. Y Jaskowska et al. (H. Lopes 2010; Jaskowska et al. 2015).

Tratamientos Actuales

Enfermedad de Chagas

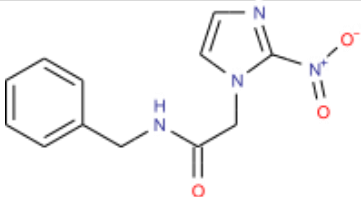
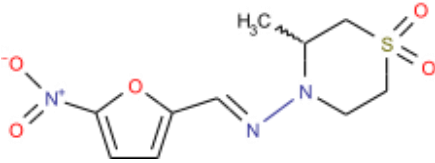
Los **tratamientos actuales** para la enfermedad de Chagas se basan en la administración de **benznidazol** o de **nifurtimox**, compuestos que se desarrollaron a principios de la década del 70 por las farmacéuticas Hoffman-La Roche (Rochagan® en Brasil, Radanil® en Argentina) y Bayer (Lampit®), respectivamente (**Tabla I-1**).

Con respecto al **benznidazol**, en 2003 Roche transfirió la licencia y la tecnología a LAPEFE (Laboratorios del Estado de Pernambuco), siendo el estado de Brasil el principal productor de la droga. Sin embargo, debido a problemas de logística, su producción y distribución fueron discontinuadas en 2010. Recién en 2012, la compañía farmacéutica privada ELEA (en Argentina) anunció la producción de un lote de benznidazol (Abarax®) (Molina et al. 2015).

Por otro lado, respecto del **nifurtimox**, a finales de la década del 90, Bayer dejó de producirlo a causa de las bajas demanda y rentabilidad; pero debido a pruebas clínicas que mostraron su eficacia contra la Enfermedad del Sueño y las presiones a cargo de organizaciones médicas (como Médicos Sin Fronteras), Bayer reinició su producción donándola para el tratamiento de ambas enfermedades a través de WHO (García-Bournissen et al. 2015).

Aunque sus **mecanismos de acción** no están completamente dilucidados, estos compuestos son pro-drogas y deben ser metabolizados por el parásito para ejercer su efecto tripanocida, por desestabilizar el estado redox de los parásitos (Andrade Rajão et al. 2014; Hall et al. 2011). Algunas características de estos tratamientos se resumen en la **Tabla I-1**.

Tabla I-1. Tratamientos utilizados contra la Enfermedad de Chagas, características generales y efectos adversos.

	Benznidazol (de primera línea)	Nifurtimox
Descubrimiento	1966	1970
Estructura Molecular		
Administración	Oral	Oral
Duración del tratamiento	60 días	60 - 90 días

Efectividad

Fase aguda, 80 % de probabilidad de cura.
Niños hasta 18 años de edad con fase crónica, 60 % de probabilidad de cura.
Adultos en fase crónica, nula o baja efectividad

Efectos secundarios

(12 - 18 % de los pacientes suspenden el tratamiento)

Dermatitis alérgica, neuropatía periférica, leucopenia, náusea, vómitos, anorexia, pérdida de peso, insomnio, pérdida de gusto, onicólisis

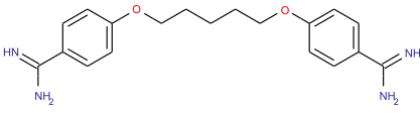
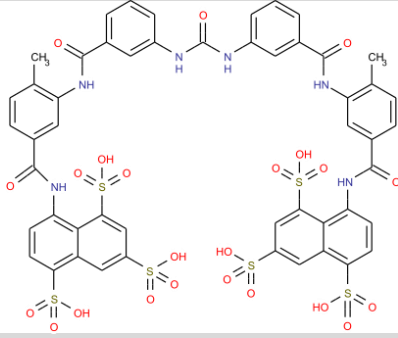
Anorexia, náusea, vómitos, dolor abdominal, diarrea, insomnio, irritabilidad, desorientación, polineuropatía, parestesias, dolor de cabeza, mialgia, artralgia, mareo, vértigo

Datos resumidos de Molina et al. y Dumonteil et al. (Molina et al. 2015; Dumonteil et al. 2012).

Enfermedad del Sueño

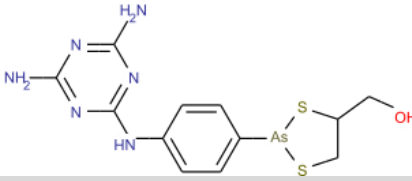
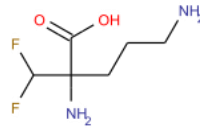
Actualmente existen 4 drogas (pentamidina, suramina, melarsoprol y eflornitina) y 1 terapia combinatoria (*Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy*, NECT) para el tratamiento de la Enfermedad del Sueño, resumidas en la **Tabla I-2**.

Tabla I-2. Tratamientos utilizados contra la Enfermedad del sueño, características generales y efectos adversos.

Etapa hemo-linfática		
	Pentamidina (<i>T. b. gambiense</i>)	Suramina (<i>T. b. rhodesiense</i>)
Descubrimiento	1937	1920
Estructura Molecular		
Administración	Intramuscular	Endovenosa
Duración del tratamiento	7 días	5 semanas
Efectividad	Altamente efectiva (93 - 98 %)	Altamente efectiva

Efectos secundarios	Reacción hipotensiva con taquicardia, mareo, colapso y shock. Reacciones inflamatorias (necrosis).	Fiebre. Reacciones de hipersensibilidad (náusea, colapso circulatorio, urticaria, dermatitis exfoliativa, anemia)
	Disfunción renal, hepática y pancreática. Neurotoxicidad (polineuropatía periférica y disfunción de médula ósea).	Daño renal. Neurotoxicidad (neuropatía periférica). Toxicidad en médula ósea
Cuidados médicos	Atención hospitalaria y monitoreo	Observaciones de las funciones renales

Etapas meningo-encefálicas

	Melarsoprol (<i>T. b. gambiense</i> y <i>T. b. rhodesiense</i>)	Eflornitina (<i>T. b. gambiense</i>)	NECT (<i>T. b. gambiense</i>) combinación de Nifurtimox y Eflornitina
Descubrimiento	1949	1981	2009
Estructura Molecular			-
Administración	Endovenosa	Endovenosa	Nifurtimox: oral; Eflornitina: endovenosa
Duración del tratamiento	10 días	7 - 14 días (28 a 56 inyecciones)	Nifurtimox: 10 días; Eflornitina: 7 días (14 inyecciones)
Efectividad	Altamente efectiva (99 %)	Efectiva (83,5 - 84 %)	Altamente efectiva (98 %)
Efectos secundarios	Inyecciones dolorosas. Encefalopatía, fiebre. Neurotoxicidad: polineuropatía motora o sensorial, dolores de cabeza, rápido deterioro neurológico, convulsiones, profundos estados de coma. Reacciones dermatológicas. Cardiotóxicas. Disfunción renal y hepática. Muerte en 5 % de los casos	Síntomas gastrointestinales (náusea, vómitos y diarrea). Toxicidad de médula ósea (anemia, leucopenia) Síntomas neurológicos (convulsiones). Muerte en 1,4 % de los casos	El número de efectos es menor que con las monoterapias. Vómitos, náusea, dolor de cabeza o de abdomen, dolor de articulaciones, convulsiones e insomnio.
Cuidados médicos	Numerosas reapariciones de la enfermedad en pacientes tratados (parásitos resistentes)	Requiere de personal entrenado adecuadamente para la administración.	Requiere de personal entrenado adecuadamente para la administración.

Datos resumidos de Babokhov et al., Stich et al. y Lutumba et al. (Babokhov et al. 2013; Stich et al. 2015; Lutumba et al. 2016).

Por otra parte, algunas de estas drogas también tienen otras complicaciones. La pentamidina **presenta un alto costo**, complicando su acceso por parte de las instituciones de salud de países de bajos ingresos. Gracias a la intervención de WHO, una cantidad –limitada- de pentamidina es donada para el tratamiento de la Enfermedad del Sueño (Stich et al. 2015).

Debido al efecto nefrotóxico de la **suramina**, deben realizarse controles regulares durante el tratamiento aumentado los costos en su utilización (Stich et al. 2015).

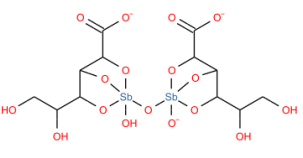
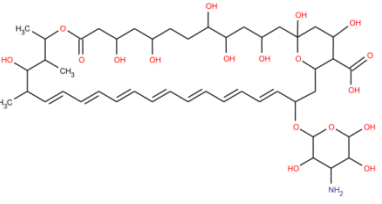
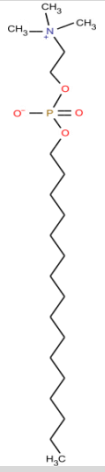
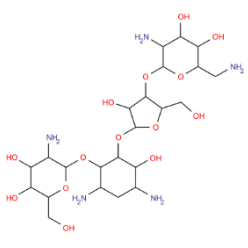
Actualmente, la utilización de **melarsoprol** está decayendo debido a sus efectos secundarios y al aumento en la reaparición de parásitos posteriores al tratamiento (Babokhov et al. 2013).

Por mucho tiempo, debido al alto costo y baja rentabilidad, la **eflornitina** fue categorizada como “medicamento huérfano” (productos medicinales que, si bien son útiles, se utilizan en afecciones tan infrecuentes que los fabricantes no están dispuestos a comercializarlos) (Kennedy 2013). Gracias a los efectivos esfuerzos y asociaciones entre WHO y compañías farmacéuticas, una versión intravenosa de eflornitina es producida y donada desde 2001 (Babokhov et al. 2013).

Leishmaniasis

Actualmente existen varias drogas terapéuticas para los diferentes tipos de leishmaniasis, y su selección depende de la disponibilidad y efectividad en las diferentes regiones (algunos de ellos se muestran en la **Tabla I-3**):

Tabla I-3. Tratamientos utilizados contra diferentes formas de leishmaniasis, características generales y efectos adversos.

	Antimoniales pentavalentes	Anfotericina B desoxicolato	Miltefosina	Paromomicina
Descubrimiento	1940	1960	1996	2006
Estructura Molecular				
Administración	Intralesionalmente en forma cutánea. Endovenosa o intramuscular para forma visceral.	Endovenosa	Oral	Formulaciones tópicas para forma cutánea. Intramuscular para forma visceral
Duración del tratamiento	10 - 20 días para la forma cutánea. 30 días para la forma visceral.	30 días forma cutánea y visceral.	28 días para forma cutánea y visceral.	10 - 20 días para forma cutánea. 21 días para forma visceral
Efectividad (probabilidad de cura)	80 % forma cutánea. 100 % forma visceral	100 % para la forma visceral	53 - 91 % para forma cutánea. 94 - 95 % para forma visceral	74 - 80 % para forma cutánea. 14 - 95 % para forma visceral, dependiendo de la región.
Efectos secundarios	Fallas cardíacas, mialgia, artralgia. Fallas hepáticas, pancreáticas	Reacciones en la infusión. Nefrotoxicidad. Miocarditis. Hipocalemia	Efectos gastrointestinales, hepatotoxicidad. Nefrotoxicidad. Teratogénico	Inyecciones dolorosas. Ototoxicidad. Daño hepático. Nefrotoxicidad
Cuidados médicos	Monitores continuo durante el tratamiento	Internación durante el tratamiento	Monitores continuo durante el tratamiento	-

Datos resumidos de Sundar et al. y McGwire et al. (Sundar & Chakravarty 2013; McGwire & Satoskar 2014).

Estas drogas también tienen otras complicaciones. Existen variantes de leishmaniasis que son **refractaria** a los **antimoniales pentavalentes** (Sundar & Chakravarty 2013).

Para reducir los efectos de la **anfotericina B desoxicolato**, se hicieron varias reformulaciones lipídicas reemplazando el desoxicolato con otros lípidos. De todos ellos, la formulación Anfotericina B liposomal (AmBisome®; Gilead Sciences; L-AmB) es la única aprobada por FDA³, siendo altamente efectiva contra las leishmaniasis visceral y cutánea, con pocos efectos secundarios y con solo 1 día de hospitalización (Sundar & Chakravarty 2013). Sin embargo, **su costo resulta prohibitivo como solución sanitaria** (Sundar & Chakravarty 2013). La efectividad de **miltefosina** es dudosa debido a la alta tasa de reaparición (Sundar & Chakravarty 2013).

Como puede observarse, los tratamientos consisten de la administración de drogas (la mayoría antiguas) durante un largo período, pero generan numerosos efectos adversos, de manera tal que en muchos casos es necesario realizar desde continuos monitoreos hasta la internación del paciente, y finalmente, la suspensión del tratamiento. Por otra parte, son difíciles de administrar por lo que se requiere de personal altamente entrenado y contar con la infraestructura adecuada, lo cual incrementa los costos del tratamiento. Por lo tanto, aún es necesario buscar terapias nuevas o complementarias a las existentes.

³ *US Food and Drug Administration*

Características Particulares de Tripanosomátidos como Posibles Blancos Terapéuticos

Ante este escenario terapéutico actual, una estrategia posible es buscar nuevos blancos terapéuticos. Los blancos promisorios son componentes celulares o vías metabólicas esenciales para el patógeno – para que la terapia sea efectiva – y que, a la vez, estén ausentes o sean sustancialmente diferentes en el hospedador – asegurando la selectividad - (Fernandes Rodrigues et al. 2014). Existen estructuras y funciones celulares características de *T. cruzi* y de tripanosomatidos que están ausentes o presentan notables diferencias con las células hospedadoras; entre ellas se destacan los glicosomas, acidocalcisomas, kinetoplasto y reservosomas así como el sistema de membrana que rodea a los tripanosomátidos (**Figura I-11A y Recuadro I-1**) (H. Lopes 2010).

Superficie Celular y Transportadores

La superficie celular de los tripanosomátidos está formada por una **membrana plasmática** que, del lado externo, está rodeada por una gran cantidad de glicoproteínas, glicolípidos, proteínas ancladas a GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) y que -en su conjunto- forman el glucocálix. En su cara interna, la membrana se ancla firmemente a una red de microtúbulos subpeliculares (**Figura I-11B**), la cual rodea a todo el parásito manteniendo su forma (Fernandes Rodrigues et al. 2014). Por su parte, el flagelo se encuentra rodeado por una **membrana flagelar** (**Figura I-11B**). A diferencia del resto de los tripanosomátidos, las formas epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* y *T. brucei* tienen la membrana flagelar fuertemente unida a la membrana plasmática, a través de una zona especializada de la superficie celular llamada *Flagellum Attachment Zone* (FAZ). Desde su cara citosólica, esta zona está formada por microtúbulos especializados (cuartetos de microtúbulos), el filamento FAZ y conexiones inter-membrana (Fernandes Rodrigues et al. 2014).

El **bolsillo flagelar** es una invaginación de la membrana plasmática en la base del flagelo, y que carece de la red de microtúbulos subpeliculares, siendo el sitio principal donde ocurren los procesos de endocitosis y secreción (**Figura I-11B**) (H. Lopes 2010).

Recuadro I-1. Componentes celulares y mecanismos moleculares característicos de tripanosomátidos como potenciales blancos terapéuticos.

El **glicosoma** es una organela esférica rodeada de una sola bicapa; en su interior se encuentran la mayoría de las enzimas que forman parte de la vía glicolítica, favoreciendo que la glicólisis ocurra de manera más eficiente (H. Lopes 2010). También existen diversas enzimas que participan en otras vías catabólicas y anabólicas (salvataje de purinas, síntesis de esteroides, de pirimidinas, etc., y β -oxidación de ácidos grasos), y todas ellas están interconectadas a través de cofactores y metabolitos intermedios en común. De esta manera, la interrupción en la integridad y la biogénesis del glicosoma son estudiados como blancos promisorios (Barros-Alvarez et al. 2014; Moyersoen et al. 2004).

Los **acidocalcisomas**, también presentes en otros patógenos (*Toxoplasma gondii* y *Plasmodium* spp.) (Docampo & Moreno 2008), tienen como funciones principales el almacenamiento de fósforo y cationes (como Ca^{2+}) y el mantenimiento del pH (H. Lopes 2010). Existen 2 enzimas fundamentales para su correcto funcionamiento: una pirofosfatasa translocadora de protones vacuolar (V- H^+ -PPasa) y una pirofosfatasa soluble (PPasa). Ambas son consideradas blancos terapéuticos pues no se encuentran en humanos. Actualmente, se desarrollaron algunos inhibidores como los bisfosfonatos (Docampo & Moreno 2008).

Los tripanosomátidos tienen su ADN mitocondrial o kinetoplastídico (ADNk) en una región específica de la mitocondria llamada **kinetoplasto**. El ADNk está compuesto de varias moléculas circulares entrelazadas formando una única red altamente compacta. Existen 2 tipos de ADNk: maxicírculos y minicírculos. Los minicírculos expresan diversos ARN guías, fundamentales para el **proceso de edición del ARN de genes** codificados en los maxicírculos (H. Lopes 2010). Este proceso es esencial y exclusivo de tripanosomátidos, por lo se propuso como blanco terapéutico. Recientes avances fueron hechos en la búsqueda de potenciales inhibidores (Salavati et al. 2012).

Los **reservosomas** son característicos de epimastigotes de *T. cruzi* (y de organismos relacionados como *Trypanosoma vespertilionis* y *Trypanosoma dionisii*), pero recientemente se encontraron estructuras similares en su formas tripomastigotes y amastigotes (Sant'Anna et al. 2008). Los reservosomas son el principal lugar de almacenamiento de lípidos y proteínas ingeridas por la vía endocítica, y también de varias proteínas que una vez sintetizadas siguen la vía secretoria (H. Lopes 2010). Son sustancialmente diferentes de los lisosomas pues carecen de los marcadores lisosomales canónicos (Sant'Anna et al. 2008). Pese a su potencial valor como blanco terapéutico, hasta el momento no se conocen inhibidores específicos.

Las evidencias muestran que la membrana plasmática, la membrana flagelar y el bolsillo flagelar son morfológica, química y funcionalmente distintos entre sí y respecto de la membrana plasmática de células hospedadoras (H. Lopes 2010). Una característica que tienen en común es que en todos estos dominios de la superficie celular se expresan transportadores de membrana

(Landfear & Ignatushchenko 2001). Actualmente, gracias a la secuenciación del genoma de varios tripanosomátidos, se estima que entre 2-2,5 % de las proteínas se corresponden con posibles transportadores (H. Lopes 2010), los cuales resultan esenciales ya que los tripanosomátidos carecen de varias rutas biosintéticas de nutrientes, y estas proteínas permiten su incorporación desde el ambiente (Dean et al. 2014).

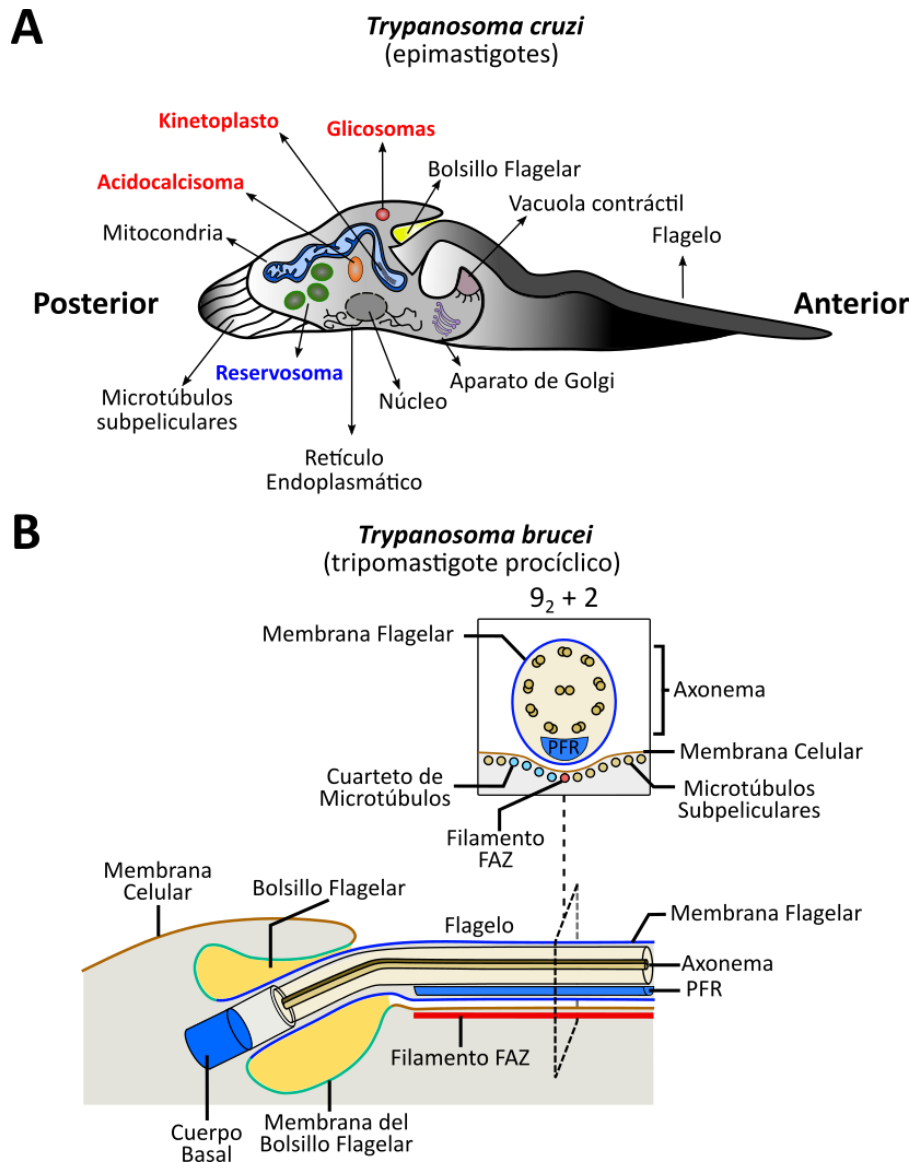


Figura I-11. Esquemización de los principales componentes celulares y del sistema de membranas de 2 tripanosomátidos representativos. A) Diferentes componentes celulares de la forma epimastigote de *T. cruzi*. En rojo se resaltan los componentes celulares aceptados como potenciales blancos terapéuticos; en azul los que aún están en discusión. Figura editada de Lopes et al. 2010 (H. Lopes 2010). B) Estructura de membranas de la forma tripomastigote procíclico de *T. brucei*, editado de Langousis et al. (Langousis & Hill 2014).

Las proteínas transportadoras tienen un gran potencial como blanco terapéutico contra las tripanosomiasis, resaltando la importancia de su identificación y estudio de sus funciones correspondientes, como así también conocer las diferencias con los transportadores humanos (Pereira et al. 2014; Dean et al. 2014). Por otro lado, estos transportadores median la incorporación de varios compuestos tripanocidas, y la pérdida de estas proteínas está relacionada con la resistencia a drogas terapéuticas (Pereira et al. 2014). Entre ellos se destacan:

Transportadores de Nucleósidos y Nucleobases

Todos los tripanosomátidos son incapaces de sintetizar purinas *de novo* y deben incorporarlas desde sus hospedadores. En los últimos años se han descrito molecular y funcionalmente varios transportadores de nucleósidos (**Recuadro I-2**). Particularmente, el transportador de *T. brucei* **TbAT1** media la incorporación de dos drogas utilizadas como tratamiento para la Enfermedad del Sueño: melarsoprol y pentamidina; y mutantes en **TbAT1** muestran una resistencia parcial a estas drogas (Landfear 2011).

Recuadro I-2. Transportadores de nucleósidos y/o nucleobases identificados molecularmente.

Todos los transportadores de nucleósidos y/o nucleobases identificados hasta el presente pertenecen a la **familia ENT** (*Equilibrative Nucleoside Tranporter*) y consumen energía indirectamente a través del gradiente de protones (H⁺) (Landfear 2011). En el parásito *L. donovani* se identificaron 2 transportadores de nucleósidos (**LdNT1** y **LdNT2**), y en *L. major*, 2 transportadores de nucleobases (**LmaNT3** y **LmaNT4**) (Landfear 2011). En *T. brucei* se encontraron varios transportadores de nucleósidos: **TbAT1** y la familia **TbNT2** (formada por los transportadores **TbNT2**, **TbNT5**, **TbNT6**, **TbNT7** y **TbNT10**) y el transportador de nucleobases **TbNT8.1/TbNBT1** (Dean et al. 2014; Landfear 2011). Hasta el momento, no se han identificado molecularmente transportadores en *T. cruzi*.

Transportadores de Aminoácidos

Los aminoácidos, además de su rol como monómeros para la síntesis de proteínas, tienen varias funciones biológicas como reguladores del estrés osmótico, precursores de varias vías metabólicas (poliaminas, pirimidinas, etc.) y como fuente alternativa de energía y carbono (Dean et al. 2014). Recientemente, estudios analizando el genoma de varios tripanosomátidos indicaron que los parásitos carecen de enzimas que participan en las vías sintéticas de varios aminoácidos

esenciales (arginina, lisina, isoleucina, valina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina) y deben importarlos (Alves et al. 2013; Dean et al. 2014) (**Recuadro I-3**).

Estos transportadores también cumplen un papel importante en la susceptibilidad a drogas tripanocidas, encontrándose que parásitos de *T. brucei* que carecen del transportador **TbAAP24/TbAAT6** resultaron resistentes a eflornitina (Inbar et al. 2013).

Recuadro I-3. Transportadores de aminoácidos identificados molecularmente.

Hasta el momento, el número de transportadores de aminoácidos identificados es escaso. Entre ellos, se han identificado transportadores de arginina en *L. donovani* (**LdAAP3**) y en *T. cruzi* (**TcAAP3/TcCAT**) (Dean et al. 2014; Henriques et al. 2015); y transportadores de lisina en *L. donovani* (**LdAAP7**), *T. cruzi* (**TcAAP7**) y *T. brucei* (**TbAAP7**) (Inbar et al. 2012). Por otro lado, los tripanosomátidos tienen transportadores de prolina, que reciben el nombre **LdAAP24** para *L. donovani*, **TcAAP24/TcAAP069** para *T. cruzi* y **TbAAP24/TbAAT6** para *T. brucei* (Dean et al. 2014; Inbar et al. 2013; Sayé et al. 2014; Mathieu et al. 2014). Estos transportadores de prolina también fueron capaces de incorporar otros aminoácidos como alanina, apolares (valina, leucina e isoleucina), azufrados (cisteína y metionina) y aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) (Inbar et al. 2013; Mathieu et al. 2014). Estos transportadores pertenecen a la **familia AAAP** (**Amino Acid Auxin Permease**) (Dean et al. 2014) y, por lo menos **TbAAP24/TbAAT6**, serían co-transportadores de H⁺ (Inbar et al. 2013).

Transportadores de Hexosas

La glucosa es un metabolito altamente importante para los tripanosomátidos, la cual se incorpora a través de transportadores específicos (**Recuadro I-4**) y se metaboliza en los glicosomas para obtener ATP (**Recuadro I-1**). Particularmente, parásitos de *T. cruzi* que presentan una baja actividad del transportador de hexosa **TcrHT** muestran una mayor resistencia a benznidazol (dos Santos et al. 2012), y mutantes nulas de transportadores de glucosa en *L. mexicana* presentan una reducida capacidad infectiva (Landfear 2010).

Recuadro I-4. Transportadores de azúcares identificados molecularmente.

Entre ellos se destacan los transportadores de *L. enriettii* **Pro-1**, *L. donovani* **D2** y *L. mexicana* **LmGT1-4**, los transportadores de *T. brucei* **THT1** y **THT2** y el de *T. cruzi* **TcrHT** (Tetaud et al. 1997; Dean et al. 2014). Estos transportadores presentan algunas diferencias respecto de los descritos en mamíferos: son insensibles al inhibidor citocalacina B y son capaces de incorporar D-fructosa (además de D-glucosa y D-manosa) (Tetaud et al. 1997).

El mecanismo de acción de estos transportadores parece depender de la especie de tripanosomátido: los de *Leishmania* están acoplados a H^+ , mientras en *T. brucei* la dependencia de sus transportadores hacia H^+ decae con el aumento en la concentración de glucosa favoreciendo la difusión facilitada. Finalmente, el transportador de *T. cruzi* actúa a través de este último fenómeno (Landfear 2010; Tetaud et al. 1997).

Acuaporinas

Las acuaporinas son transportadores ubicuos en la naturaleza, encargados de mover agua y algunos solutos (como glicerol), favoreciendo que las células se adapten a los cambios osmóticos. En tripanosomátidos las acuaporinas (**Recuadro I-5**) son de gran importancia considerando los diferentes cambios de hospedadores.

Estos transportadores son interesantes desde el punto de vista terapéutico ya que el homólogo de **LdAQP1** en *L. major* (**LmAQP1**) y el transportador **TbAQP2** de *T. brucei* están relacionados con la susceptibilidad a antimonios pentavalentes y pentamidina/melarsoprol, respectivamente (Song et al. 2014).

Recuadro I-5. Acuaporinas identificadas molecularmente.

En *L. donovani* se encontraron 5 acuaporinas (**LdAQP1** y **LdAQP9**, **LdAQP2860**, **LdAQP2870** y **LdAQP** putativo), en *T. brucei* se caracterizaron 3 acuaporinas (**TbAQP1**, **TbAQP2** y **TbAQP3**) mientras en *T. cruzi* se identificaron 4 (**TcAQ**, **TcAQP β** , **TcAQP γ** y **TcAQP δ**) (Song et al. 2014). Estos transportadores están involucrados en la osmoregulación en tripanosomátidos, siendo esenciales para la supervivencia durante la transmisión de los parásitos entre los hospedadores, y durante el desarrollo en los mismos (Song et al. 2014).

Transportadores de Poliaminas

Las poliaminas son policationes alifáticos esenciales para cualquier tipo celular, participando en el crecimiento celular, desarrollo, síntesis de proteínas, etc. En tripanosomátidos solamente se

identificaron transportadores en *Leishmania* sp. y *T. cruzi* (**Recuadro I-6**). Estudios recientes muestran que el transporte de poliaminas puede ser inhibido por pentamidina en *L. major*, mientras que parásitos de *T. cruzi* sobre-expresando **TcPAT12/TcPOT1** resultaron resistentes a benznidazol y nifurtimox (Pereira et al. 2014; Reigada et al. 2016). Recientemente se identificaron posibles inhibidores del transportador **TcPAT12/TcPOT1**, con resultados promisorios a nivel preclínico (Alberca et al. 2016).

Recuadro I-6. Transportadores de poliaminas identificados molecularmente.

En los tripanosomátidos, *T. brucei* es capaz de sintetizar poliaminas *de novo* y tiene muy baja actividad de transporte, mientras *T. cruzi* solamente las obtiene incorporándolas a través de transportadores específicos (**TcPAT12/TcPOT1**) (Landfear 2011; Carrillo et al. 2006; Hasne et al. 2010). Sin embargo, ambas rutas son potenciales blancos terapéuticos (Landfear 2011). De hecho, en *T. brucei*, la eflornitina actúa inhibiendo una enzima esencial en la síntesis de poliaminas (ODC: ornitina decarboxilasa).

Por otro lado en el caso de *Leishmania* (*L. major*), tanto la síntesis *de novo* de poliaminas como la incorporación (a través de su transportador **LmpOT1**) son activas y complementariamente reguladas y compensadas, complejizando el posible efecto inhibitorio de drogas (Velez & Phillips 2015).

Transportadores de Vitaminas del Complejo B

Las vitaminas del complejo B comprenden a un grupo de nutrientes esenciales involucrados en numerosos procesos celulares. Entre ellas se destacan tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacinamida (vitamina B3), ácido pantoténico (vitamina B5), piridoxina (vitamina B6), biotina, ácido fólico (vitamina B9) y cobalamina (vitamina B12).

Los transportadores de ácido fólico de la familia **FBT** (**Recuadro I-7**) resultan de gran interés, pues se comprobó que son responsables de incorporar metotrexato (droga antineoplásica, análogo de ácido fólico), ejerciendo un efecto tripanocida (Dean et al. 2014).

Recuadro I-7. Transportadores de ácido fólico identificados molecularmente.

A pesar de su relevancia y su potencial aplicación terapéutica, solamente se conoce la identidad de transportadores de ácido fólico (involucrado en la biosíntesis de metionina y de timidina y conversión de glicina y serina) en *Leishmania* sp. y *T. brucei*. Los mismos pertenecen a la **familia FBT** (*Folate-Biopterin Transporter*). En *Leishmania* sp. se encontraron más de 10 miembros, mientras que en *T. brucei* se identificaron al menos 8. Esta familia también se encuentra en plantas y cianobacterias (Dean et al. 2014; Dewar et al. 2016).

De este modo, los transportadores participan de la incorporación de nutrientes esenciales para los tripanosomátidos y, en algunos casos, son fundamentales para la infección en el hospedador vertebrado. Además, estos transportadores median la internalización de compuestos tripanocidas, y la pérdida o sobre-expresión de los mismos conlleva a la resistencia a drogas (Pereira et al. 2014).

Metabolismo y transporte de riboflavina

La **riboflavina (vitamina B2)** es un compuesto esencial y ubicuo en la naturaleza, precursora de las flavinas flavin mononucleótido (**FMN**) y flavin adenina dinucleótido (**FAD**). Ambas flavinas actúan como cofactores de diversas proteínas (denominadas **flavoproteínas**) en una amplia variedad de reacciones bioquímicas relevantes tales como deshidrogenación de varios metabolitos, transferencia de electrones entre centros redox, activación de oxígeno por oxidación y reacciones de hidroxilación. Dichas reacciones impactan sobre procesos biológicos -como la reparación del ADN- y fisiológicos -como la bioluminiscencia y el mantenimiento del ritmo circadiano- (Fischer & Bacher 2006).

Síntesis de Riboflavina

Las plantas, hongos y la mayoría de los microorganismos son capaces de sintetizar riboflavina *de novo* (Abbas & Sibirny 2011). La **síntesis** de una molécula de riboflavina requiere de una molécula de GTP y dos moléculas de ribulosa-5-fosfato (**Figura I-12**), y sucede a través de los siguientes pasos:

Paso 1: descarboxilación de GTP (apertura del anillo de purina)

En todos los organismos, la síntesis de riboflavina comienza cuando una molécula de GTP sufre la remoción de un átomo de carbono (liberado como formato), por parte de la enzima **GTP ciclohidrolasa II** (Paso 1, EC 3.5.4.25).

Pasos 2 y 3: deaminación y reducción de la cadena de ribosil (apertura del anillo de ribosa)

Las siguientes dos reacciones consisten de la deaminación del grupo amino y la reducción del grupo ribosil a ribitol. El orden de estas dos reacciones es diferente en bacterias y plantas respecto de arqueas y hongos (Abbas & Sibirny 2011). En el primer grupo, sucede la deaminación (**2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinona 5' fosfato deaminasa** (Paso 2a, EC 3.5.4.26)) seguida de la reducción (**5-amino-6-ribosilamino-2,4 (1H, 3H)-primidinadiona-5' fosfato reductasa** (Paso 3a, EC 1.1.1.139)); mientras en arqueas y hongos, primero ocurre la reducción (**2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinona 5' fosfato reductasa** (Paso 2b, EC 1.1.1.139)) y luego la deaminación (**2,5-diamino-6-ribitolamino-4 (3H)-pirimidinadiona 5' fosfato deaminasa** (Paso 3b,

EC 3.5.4.26)). Independientemente del orden de los pasos 2 y 3, el resultado final en ambos casos es la obtención de 5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1H, 3H)-pirimidinadiona 5' fosfato (Abbas & Sibirny 2011).

Paso 4: desfosforilación de la cadena de ribitol

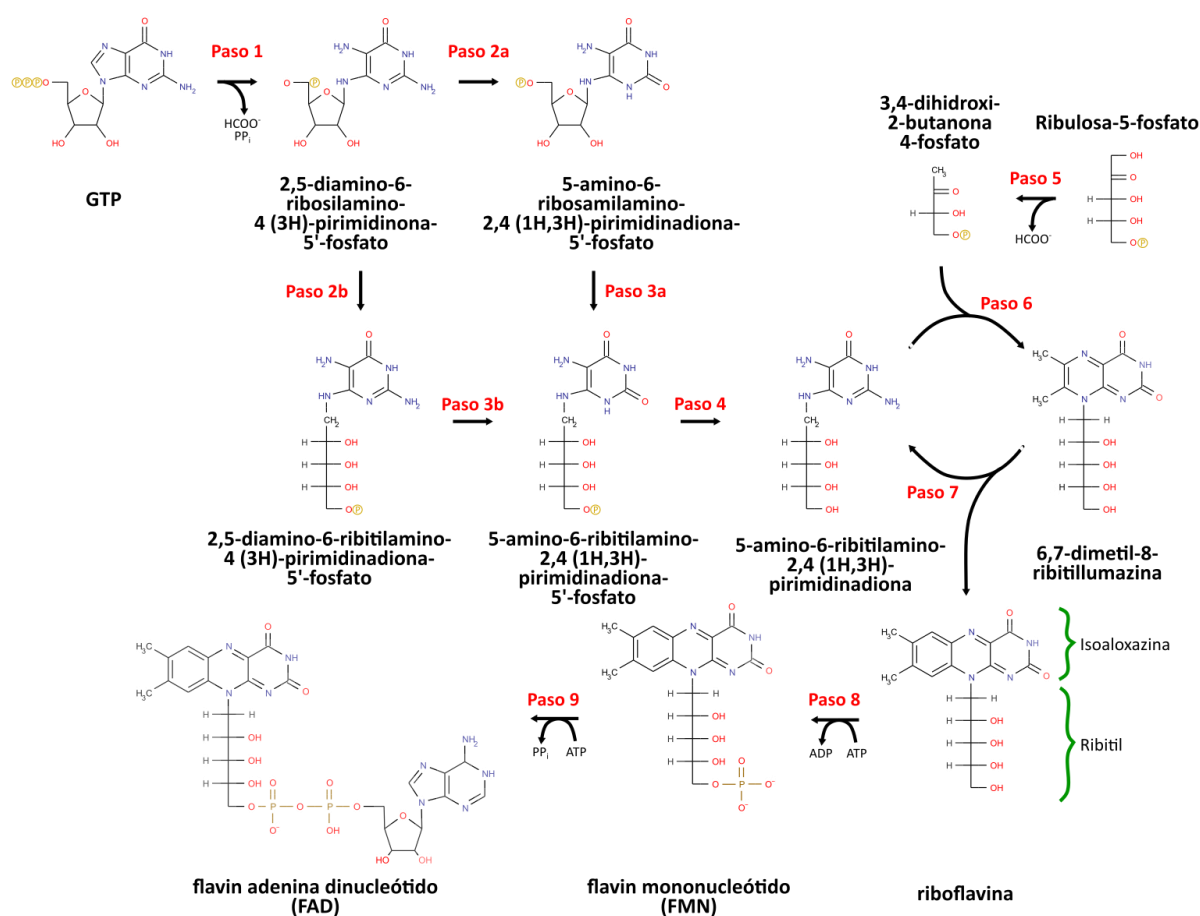
En este paso, la desfosforilación ocurre a través de una fosfatasa perteneciente a la superfamilia HAD (*Haloacid Dehalogenase*) cuya identidad se conoce desde hace relativamente poco en bacterias y en plantas (Sa et al. 2016).

Pasos 5 y 6: descarboxilación de la ribulosa-5-fosfato y condensación al precursor de riboflavina (formación del segundo anillo de la riboflavina)

Posteriormente, se adicionan 4 átomos de carbono, a partir del compuesto 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (proveniente de la eliminación de un átomo de carbono de la ribulosa-5-fosfato a cargo de la enzima **3,4-dihidroxi-2-butanona-fosfato sintasa** (EC 4.1.99.12)) (Abbas & Sibirny 2011). La enzima **lumazina sintasa** (EC 2.5.1.B6) cataliza la condensación del precursor 5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1H, 3H)-pirimidinadiona con 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato, formándose de esta manera el segundo anillo en el precursor de la riboflavina (6,7-dimetil-8-ribitillumazina) (Abbas & Sibirny 2011).

Paso 7: dismutación de 2 precursores de riboflavina (formación del tercer anillo de la riboflavina)

La enzima **riboflavina sintasa** (EC 2.5.1.9) cataliza el último paso de esta ruta biosintética formándose el tercer anillo de la riboflavina (llamada **isoaloxazina**). Para ello la enzima dismuta 2 moléculas de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, en donde una de ellas recibe una unidad de 4 carbonos de la otra. De esta manera, se obtienen como producto dos compuestos: siendo uno el precursor 5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1H, 3H)-pirimidinadiona (sustrato del lumazina sintasa) y, el otro, **riboflavina** (Abbas & Sibirny 2011).



Paso 1 GTP ciclohidrolasa II
(EC 3.5.4.25)

Paso 4 Fosfatasa de la
superfamilia HAD

Paso 7 Riboflavina sintasa
(EC 2.5.1.9)

Bacterias y Plantas

Paso 2a 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinona-5' fosfato deaminasa
(EC 3.5.4.26)

Paso 3a 5-amino-6-ribosilamino-2,4 (1H,3H)-pirimidinadiona-5' fosfato reductasa
(EC 1.1.1.193)

Arqueas y Hongos

Paso 2b 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinona-5' fosfato reductasa
(EC 1.1.1.193)

Paso 3b 2,5-diamino-6-ribitilamino-4 (3H)-pirimidinadiona-5' fosfato deamina
(EC 3.5.4.26)

Paso 5 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato sintasa
(EC 4.1.99.12)

Paso 6 Lumazina sintasa
(EC 2.5.1.86)

Paso 8 Riboflavina quinasa
(EC 2.7.1.26)

Paso 9 FAD sintetasa
(EC 2.7.7.2)

Figura I-12. Biosíntesis de riboflavina y flavo-coenzimas. Existen dos vías alternativas de síntesis de riboflavina dependiendo si ocurre primero la reacción de deaminación del grupo amino y luego la reducción de la cadena lateral (pasos 1-2a-3a-4), o viceversa (1-2b-3b-4). La primera vía es característica de plantas y bacterias, mientras la otra, es observada en hongos y arqueas. Las enzimas que componen este camino biosintético se muestran en el panel inferior. Adaptado de Abbas et al. (Abbas & Sibirny 2011).

Pasos 8 y 9: fosforilación de la cadena de ribitol y adenilación

Se cree que la riboflavina no tiene actividad biológica *per sé*, sino que se utiliza como sustrato para la síntesis de los cofactores **FMN** y **FAD** (formas activas). Para la formación del FMN, la riboflavina es fosforilada por acción de la enzima **riboflavina quinasa** (EC 2.7.1.26). La enzima **FAD sintetasa** (EC 2.7.7.2) cataliza la adenilación del FMN (Abbas & Sibirny 2011).

Transportadores de Riboflavina

Los metazoos y algunos procariotas (como las bacterias *Treponema pallidum* -agente responsable de la sífilis- y *Listeria monocytogenes* – responsable de la listeriosis) (Deka et al. 2013; Karpowich et al. 2015) son incapaces de sintetizar riboflavina *de novo*, y sólo la adquieren incorporándola de la dieta a través de **transportadores específicos** (Abbas & Sibirny 2011). En los últimos años, se han identificado varios transportadores de riboflavina.

Transportadores de Riboflavina en Bacterias Gram +

RibU/YpaA

Estos transportadores pertenecen a la familia ECF (*Energy-Coupling Factor*), y se encuentran formados por 4 módulos esenciales para su función: dos de ellos unen 1 molécula de ATP cada uno (llamados componentes A y A'), una proteína transmembrana que mantiene la integridad del complejo (componente T) y una proteína de unión específica a un sustrato (componente S) (Zhang et al. 2010). Transportadores de este tipo se identificaron en *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *L. monocytogenes* (Zhang et al. 2010; Burgess et al. 2006; Vogl et al. 2007; Karpowich et al. 2015). El componente S tiene 6 pasos transmembrana y, al menos en *B. subtilis*, resultó ser de gran afinidad (K_m aparente entre 5-20 nM) (**Figura I-13A**).

RibM/PnuX

Esta familia de transportadores es exclusiva de la clase Actinobacteria, pero solamente los transportadores de *Corynebacterium glutamicum* y *Streptomyces davawensis* fueron funcionalmente evaluados (Vogl et al. 2007; Hemberger et al. 2011). En estas proteínas se predicen entre 5-7 pasos transmembrana, y presentan una K_m aparente de 11 μ M (Vogl et al.

2007). Estos transportadores parecen incorporar riboflavina mediante difusión facilitada (Figura I-13A).

ImpX

Este transportador, que presentaría 9 pasos transmembrana, fue descripto bioinformáticamente en el genoma de la bacteria Gram – *Fusobacterium nucleatum*; luego se identificó un ortólogo en el genoma de *Desulfotobacterium halfniense* (Gram +) (Vitreschak et al. 2002). Recientemente, ensayos de complementación mostraron que ImpX de *F. nucleatum* es capaz de incorporar riboflavina (**Figura I-13A**) (Gutiérrez-Preciado et al. 2015).

Transportadores de Riboflavina en Bacterias Gram -

RfuABCD

Esta clase de transportadores es del tipo ABC dependiente de SBD (Substrate-Binding proteins or Domains), característico de diferentes espiroquetas (*Treponema pallidum*, *Treponema denticola* -responsable de enfermedades bucales en humanos- y *Borrelia burgdorferi* -agente causal de la Enfermedad de Lyme-) (Deka et al. 2013). El complejo está formado por 4 módulos: el componente de unión a sustrato (RfuA) asociado a membrana plasmática, cuyo dominio SBD se ubica en el espacio periplásmico, 2 componentes (RfuC y RfuD) que forman la permeasa, 1 componente RfuB que contiene el sitio de unión a ATP. De esta manera, la incorporación de riboflavina sucedería con gasto de energía (**Figura I-13A**) (Deka et al. 2013).

RibN

Estos transportadores se encuentran distribuidos en varias clases de bacteria (α -, β -, y γ -proteobacteria), de los cuales solamente fueron analizados los transportadores de *Rhizobium leguminosarum* (α -proteobacteria), *Ochrobactrum anthropi* (α -proteobacteria) y *Vibrio cholerae* (γ -proteobacteria) (García Angulo et al. 2013). El número de pasos transmembrana varía entre 7 y 9, y contiene un dominio del tipo EamA, el cual es encontrado en algunos transportadores secundarios (como transportadores de nucleótidos-azúcar) (García Angulo et al. 2013) (**Figura I-13A**).

RfnT

Esta familia de transportadores es exclusiva de bacterias del orden de los Rhizobiales: *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *O. anthropi* y *R. leguminosarum*. Estos 2 últimos organismos también expresan el transportador RibN, siendo los primeros casos en los que se demuestra la presencia de 2 transportadores de riboflavina en la misma especie de bacterias. Hasta el momento, solamente el transportador RfnT de *O. anthropi*, en cuya secuencia se predicen 11 pasos transmembrana, fue funcionalmente caracterizado (**Figura I-13A**) (Gutiérrez-Preciado et al. 2015).

RibXY

En un principio, este transportador fue caracterizado en bacterias pertenecientes al phylum Chlorofexi, pero también se encontraron en Actinobacteria y Thermobaculum (Gutiérrez-Preciado et al. 2015). La funcionalidad del transportador RibXY fue confirmada en *Chloroflexus aurantiacus*. Este transportador pertenece a la familia ABC (similar a RfuABCD), donde RibX formaría la permeasa y RibY es, posiblemente, el componente de unión a sustrato (Gutiérrez-Preciado et al. 2015). Sin embargo, este complejo carece de la subunidad de unión a ATP y se ha propuesto que este dominio podría ser intercambiable entre los distintos transportadores ABC (**Figura I-13A**) (Gutiérrez-Preciado et al. 2015).

RibZ y RibV

El transportador de RibZ es exclusivo de una especie de la clase Clostridia: *Clostridium difficile*; tiene un dominio MFS (*Major Facilitator Superfamily*), característico de transportadores sin consumo directo de energía. Su función como transportador de riboflavina fue validada (Gutiérrez-Preciado et al. 2015) (**Figura I-13A**).

En el caso de RibV, este transportador es específico de *Mesoplasma florum*, y se encontró un posible homólogo en *Mycoplasma* sp. Sin embargo su funcionalidad aún no fue confirmada empíricamente (**Figura I-13A**) (Gutiérrez-Preciado et al. 2015).

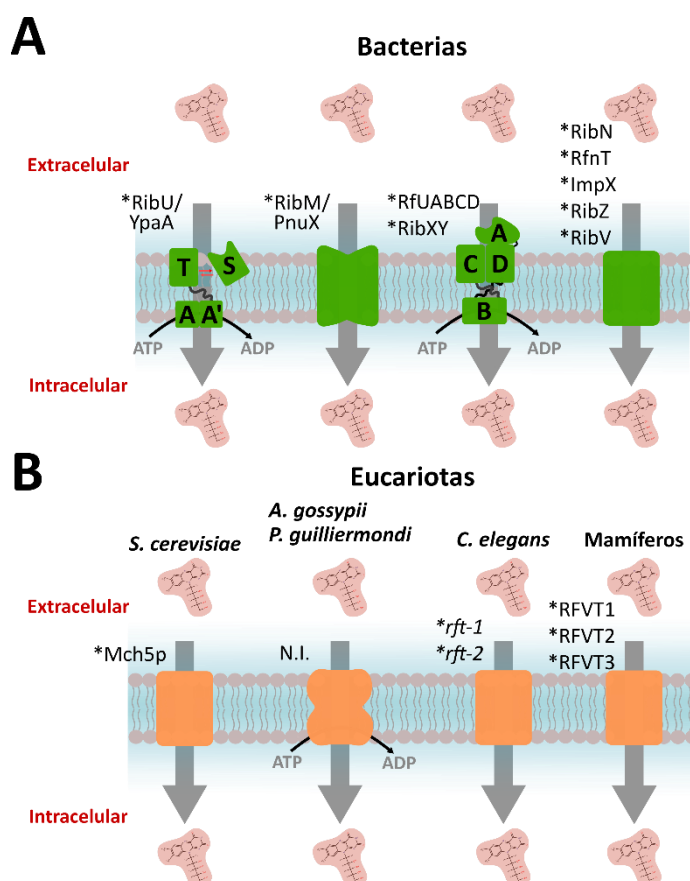


Figura I-13. Esquematización de los transportadores de riboflavina identificados. A) Transportadores correspondientes a bacterias. B) Transportadores identificados en eucariotas (N.I.: no identificados).

Transportadores de Riboflavina de Eucariotas

Hongos y levaduras

La biosíntesis de riboflavina y su regulación han sido extensamente estudiados en estos organismos, particularmente en algunos de ellos, como el hongo filamentoso *Ashbya gossypii*, que son usados para la producción industrial de la vitamina (Reihl & Stolz 2005). Análisis bioquímicos indican que *A. gossypii* y la levadura *Pichia guilliermondii* incorporan riboflavina a través de un transportador específico (K_m aparente: 40 μ M y 0,17 - 2 mM, respectivamente), a través de mecanismos dependientes de energía (**Figura I-13B**) (Forster et al. 2001).

Hasta el momento, en hongos solo se identificó a nivel molecular al transportador de riboflavina de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, llamado Mch5p. Este transportador Mch5p, con 12

pasos transmembrana y dominios MFS, presenta una K_m aparente = 17 μ M. A diferencia de los que sucede en los hongos anteriores, la incorporación sucedería a través de difusión facilitada (**Figura I-13B**) (Reihl & Stolz 2005).

Caenorhabditis elegans

El nematodo *C. elegans* tiene 2 transportadores de riboflavina: *rft-1* y *rft-2* (riboflavin transporter), 60,4 % idénticos entre sí, con 11 pasos transmembrana predichos (**Figura I-13B**). Estudios bioquímicos indican que *rft-1* tiene una K_m aparente = 1,4 μ M (Biswas et al. 2013).

Mamíferos

Los transportadores de riboflavina de mamíferos pertenecen a la familia SLC52A/RFVT (Solute Carrier Family) (Yonezawa & Inui 2013). Hasta el momento, en humanos se encontraron 3 transportadores: SLC52A1/RFVT1 (K_m aparente = 1,38 μ M), SLC52A2/RFVT2 (K_m aparente = 0,98 μ M) y SLC52A3/RFVT3 (K_m aparente = 0,33 μ M) (Yao et al. 2010), con 10-11 pasos transmembrana predichos; aunque también se caracterizaron algunos en *Rattus norvegicus* (**Figura I-13B**) (Yonezawa & Inui 2013).

Metabolismo y Transporte de Riboflavina como Blancos Terapéuticos

Dado que el hombre carece de la vía biosintética de riboflavina, y muchos de sus patógenos la obtienen únicamente a través de su síntesis *de novo*; esta ruta metabólica resulta interesante como blanco terapéutico. La mayoría de los estudios están focalizados en las enzimas lumazina sintasa y riboflavina sintasa, y permitieron el desarrollo de fuertes inhibidores actuando como anti-metabolitos (compuestos que compiten con el sustrato natural por el mismo sitio en la enzima). Sin embargo, la mayoría no tiene actividad antimicrobiana ya que, probablemente, no acceden a sus blancos moleculares dentro de la célula (Jortzik et al. 2014).

Por otra parte, los transportadores de vitaminas de los patógenos humanos también pueden considerarse potenciales blancos terapéuticos, ya que estos transportadores median la incorporación de varios análogos de sustrato que, de este modo, podrían acceder a sus blancos

intracelulares. Además, se estima que entre el 0,1 y el 3,5 % del genoma codifica para flavoproteínas en diferentes organismos, por lo que la vitamina y sus derivados interactúan con distintos tipos de componentes celulares. Esto sugiere que sus análogos podrían presentar múltiples blancos intracelulares (Jortzik et al. 2014).

Los transportadores de riboflavina son sensibles a algunos análogos como por ejemplo roseoflavina, lumiflavina, lumicromo e isoaloxazina, entre otros (**Figura I-14**) (Burgess et al. 2006; Vogl et al. 2007; Hemberger et al. 2011; Biswas et al. 2013; Reihl & Stolz 2005; Yamamoto et al. 2009; Yao et al. 2010). Sin embargo, de todos ellos, sólo roseoflavina (análogo natural de riboflavina sintetizado por *S. davawensis*) tiene actividad de antibiótico (Jortzik et al. 2014). Una vez en el citoplasma, roseoflavina es sustrato de la riboflavina quinasa y de FAD sintetasa, dando como producto 2 análogos de flavinas: roseoflavina mononucleótido (RoFMN) y roseoflavina adenina dinucleótido, respectivamente. Estos análogos se unen a algunas proteínas inhibiendo parcial o totalmente su actividad (Jortzik et al. 2014).

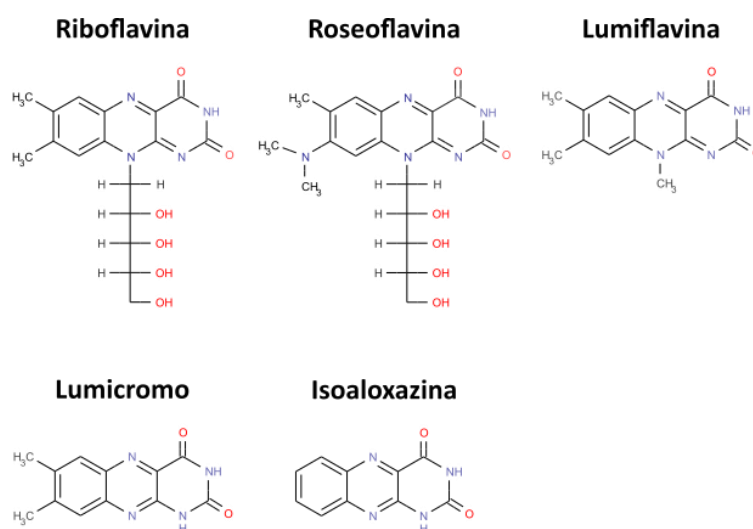


Figura I-14. Estructura química de algunos análogos de riboflavina que inhiben el transporte de riboflavina en bacterias, hongos y metazoos. Se incluye la estructura de la riboflavina para comparar las diferencias con sus análogos.

Flavoproteínas en Tripanosomátidos

Relevancia de flavinas

Es sabido que los **tripanosomátidos** expresan varias flavoenzimas esenciales y en muchos casos, como están ausentes en mamíferos, fueron propuestos como posibles blancos terapéuticos. Entre ellas, se destacan:

- **Tripanotiona reductasa**, que junto con el compuesto tripanotiona (bisglutathionil-espermidina), forman parte del principal mecanismo de detoxificación y en el mantenimiento del balance redox (Jortzik et al. 2014).
- **Lipoamida deshidrogenasa**, forma parte de varios complejos involucrados en el metabolismo energético, degradación de aminoácidos de cadena ramificada, y en la formación de metilentetrahidrofolato (componente donador de grupos metilos), y también participa en las defensas antioxidativas de los parásitos (Jortzik et al. 2014).
- **Galactonolactona oxirreductasa**, cataliza la última reacción de la síntesis de vitamina C, esencial para contrarrestar el estrés oxidativo (Jortzik et al. 2014).
- **NADH deshidrogenasa alternativa dependiente de FMN**, que mantiene el balance de NADH/NAD⁺ en la mitocondria de *T. brucei* (Fang & Beattie 2002).
- **UDP-galactopiranos mutasa**, convierte UDP-galactopiranos a UDP-galactofuranosa, precursor del azúcar galactofuranosa, componente de la superficie celular de *T. cruzi* (Oppenheimer et al. 2012).
- **Prolina deshidrogenasa**, cataliza la primera reacción en la degradación de prolina y confiriendo protección a antioxidantes (Paes et al. 2013).

Por lo tanto, se ha demostrado que la **riboflavina y sus cofactores son esenciales para los tripanosomátidos** pues cumplen un rol importante en varias de sus reacciones celulares.

Posibles mecanismos de obtención de flavinas en tripanosomátidos: esenciales en los estadios replicativos en insectos

Recientemente, estudios genómicos indican que los tripanosomátidos carecen de la mayoría de las enzimas involucradas en la biosíntesis de riboflavina, por lo que serían **incapaces de**

sintetizarla *de novo* (Klein et al. 2013). Sin embargo, se han identificado genes codificando para putativas **riboflavina quinasa** (TcCLB.510741.80) y **FAD sintetasa** (TcCLB.508241.60) (Klein et al. 2013). Más aún, a través del Consorcio de Genómica Estructural de Patógenos Protozoarios, se determinó la estructura tridimensional de la riboflavin quinasa de *T. brucei* (pdb: 3BNW), pero su función aún no fue corroborada (resultados no publicados). Esto parece indicar que los tripanosomátidos tienen la maquinaria necesaria para sintetizar los cofactores FMN y FAD a partir de riboflavina.

Sin embargo, existe **poca evidencia experimental relacionada con los mecanismos por los que los tripanosomátidos obtienen la riboflavina**. Las primeras evidencias surgieron en la década del 50, relacionadas con la formulación de medios para el cultivo *in vitro* de los tripanosomátidos. Gracias a esto se determinó que las vitaminas del complejo B (como riboflavina, entre otros nutrientes) son necesarios para el mantenimiento de estos cultivos, por lo que serían esenciales para el crecimiento y/o viabilidad de los parásitos (Klein et al. 2013).

Un caso particular son los tripanosomátidos del género *Strigomonas* y *Angomonas* que, a diferencia del resto, llevan una bacteria endosimbionte en su citoplasma. El genoma de este endosimbionte codifica para las enzimas responsables de la síntesis de aminoácidos esenciales, hemo y diversas vitaminas, y las provee al tripanosomátido hospedador (Alves et al. 2011; Klein et al. 2013; Alves et al. 2013). De esta manera, los cultivos de *Angomonas* spp. no requieren ser suplementados con vitaminas del complejo B y varios aminoácidos. Sin embargo, cuando los cultivos de *Angomonas* spp. son tratados con antibióticos específicos contra la bacteria endosimbionte, es necesario incluir varios nutrientes (como riboflavina) para su crecimiento (Klein et al. 2013). Esto sugiere que *Angomonas* spp. obtiene riboflavina de su endosimbionte o, alternativamente, del medio extracelular.

Por otra parte, en el insecto, los epimastigotes de *T. cruzi* utilizan prolina como la principal fuente de energía y carbono. La proteína prolina deshidrogenasa de *T. cruzi* es la primera enzima participando en la degradación de la prolina, y es dependiente de FAD (Paes et al. 2013).

Estos resultados sugirieron que los tripanosomátidos podrían incorporar flavinas desde el medio, y así satisfacer sus requerimientos metabólicos.

Flavinas y diferenciación a formas infectivas: principal enfoque en metaciclologénesis de *T. cruzi*

La metaciclologénesis es el proceso por el cual los epimastigotes de *T. cruzi* se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (forma infectiva de mamíferos). Este proceso biológico ocurre en el recto del vector insecto, aunque también puede ser estimulado *in vitro*. Aunque no se conocen en gran detalle todos los pasos moleculares involucrados en este proceso, se hicieron importantes avances en su comprensión. El estrés nutricional y la adhesión a la pared del recto (o un sustrato artificial) son factores importantes para iniciar la metaciclologénesis (Kollien & Schaub 2000). Por un lado, los epimastigotes sufren un importante cambio a nivel morfológico y funcional, acompañado por el incremento en la actividad de la cruzipaína (principal proteasa del *T. cruzi*) (Tomas et al. 1997), del proteasoma (Cardoso et al. 2011) y de las vías autofágicas (Alvarez et al. 2008).

Al mismo tiempo, disminuye la expresión génica global arrestándose el ciclo celular (da Silva Augusto et al. 2015), pero se incrementa la expresión de factores de virulencia como los sistemas de defensas antioxidantes (Piacenza et al. 2009). Entre ellos, las triparedoxinas peroxidases que son las encargadas de la eliminación del peróxido de hidrógeno de manera dependiente de tripanotiona (Machado-Silva et al. 2016). La regeneración de estas enzimas detoxificantes depende, en última instancia, de la flavoenzima tripanotiona reductasa NADPH-dependiente (Machado-Silva et al. 2016). De esta manera, se desprende que las flavinas tendrían cierta relevancia en la diferenciación de epimastigotes de *T. cruzi*.

Flavinas e infectividad: principal enfoque en tripomastigotes de *T. cruzi*

Una vez en el torrente sanguíneo, tanto los tripomastigotes metacíclicos como los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar un limitado rango de tipos celulares del hospedador, como células fagocíticas profesionales (macrófagos) como no-profesionales (principalmente, células de músculo estriado o liso, fibroblastos) (Romano et al. 2012). Los mecanismos de invasión varían de acuerdo a la cepa de *T. cruzi* y del tipo de célula hospedadora, de manera tal que intervienen distintos componentes moleculares (Romano et al. 2012; Maeda et al. 2012). Actualmente, se establecieron varios modelos de infección: **(i)** similar a fagocitosis en macrófagos, **(ii)** dependiente del lisosoma o **(iii)** independiente del lisosoma o **(iv)** por autofagia en células no-fagocíticas

(Romano et al. 2012). Como característica general, existen 2 eventos importantes: primero, los parásitos se asocian a la superficie de la célula hospedadora; y segundo, los tripomastigotes ingresan a la célula hospedadora formando una vacuola parasitófora, la cual se desensambla y los parásitos alcanzan el citoplasma (Romano et al. 2012).

Por su parte, los tripomastigotes tienen mecanismos que estimulan la invasión **(i)** como la adhesión a la célula hospedadora a través glicoproteínas de la familia GP85, GP82, GP35/50, **(ii)** trans-sialidasas (enzimas de *T. cruzi* que remueven al ácido siálico de la célula hospedadora, se la adiciona a sus mucinas reforzando la interacción con el hospedador), **(iii)** proteasas como cruzipaina y oligopeptidasa B; y **(iv)** factores que estimulan el escape de la vacuola parasitófora (Osorio et al. 2012; Maeda et al. 2012).

Aquellos tripomastigotes sanguíneos que infectan macrófagos, primero deben superar las defensas oxidativas de estas células (principalmente O_2^- producido por NADPH oxidasa, H_2O_2 por la superóxido dismutasa, radical hidroxilo $\bullet OH$ obtenido por reacciones no-enzimáticas, óxido nítrico $\bullet NO$, peroxinitrito $ONOO^-$, etc.) (Machado-Silva et al. 2016). Por otra parte, también existen reportes en los que se sugirió que una defensa oxidativa moderada es necesaria para estimular el proceso de infección de los macrófagos (Goes et al. 2016).

En cardiomiocitos (células no-fagocíticas profesionales) también se observaron aumentos en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Gupta et al. 2009).

En comparación con las formas sanguíneas de cepas avirulentas de *T. cruzi*, las cepas virulentas tienen aumentadas las defensas antioxidativas dependiente de flavinas, correlacionando con un aumento en la sobrevivencia y en la capacidad infectiva de los tripomastigotes (Zago et al. 2016). Por lo tanto, los parásitos también tienen estrategias para evadir los mecanismos de defensa de las células hospedadoras, a través de un aumento en sus defensas antioxidantes que contrarrestarían el ataque oxidativo de las células hospedadoras.

Flavinas y replicación intracelular: principal enfoque en amastigotes *T. cruzi*

Se ha visto que los amastigotes obtienen la mayoría de sus nutrientes (nucleósidos, entre otros) desde la célula hospedadora, lo cual se acompaña de un aumento en la expresión de transportadores en comparación con los tripomastigotes (Li et al. 2016; Caradonna et al. 2013).

En este sentido, se ha visto que algunos transportadores, como el de poliaminas, cumplen un papel importante en la replicación intracelular (Hasne et al. 2016).

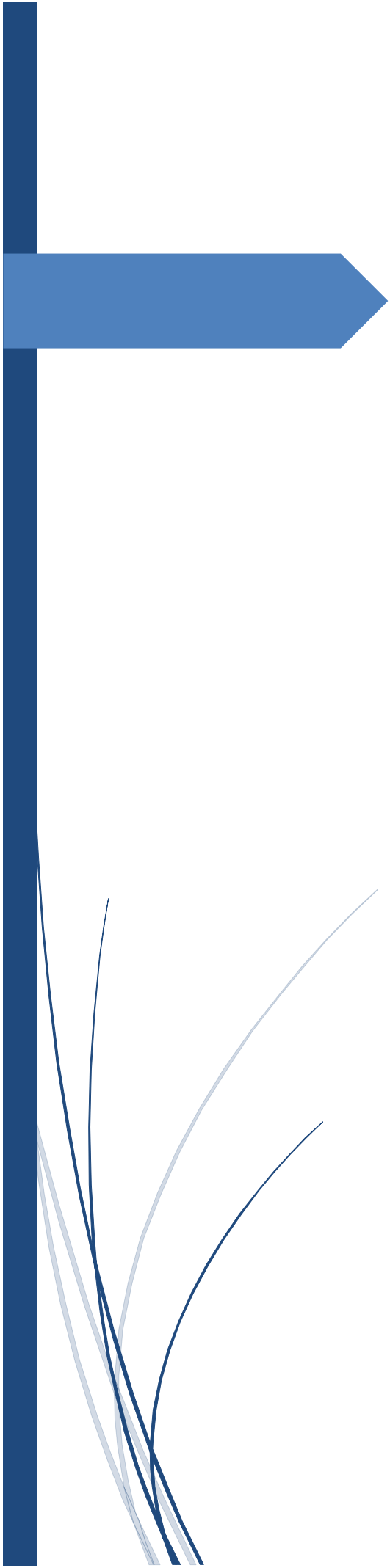
Se ha observado que los amastigotes también tienen aumentadas las defensas antioxidantes (como lipoamida deshidrogenasa) (Díaz et al. 2011). Más aún, estas formas tienen un metabolismo energético basado en el consumo de ácido grasos a través de la β -oxidación (Li et al. 2016), donde participarían flavoenzimas (flavoproteína transportadora de electrones deshidrogenasa, que comunica la β -oxidación con la cadena respiratoria). Por lo tanto, las flavinas serían necesarias para la replicación y mantenimiento de los amastigotes.

Efecto de análogos de riboflavina en tripanosomátidos

Por otro lado, se ha desarrollado el sistema Mirasol (Navigant Biotechnologies Inc., CO, USA), que permite la inactivación de patógenos en sangre. Este sistema se basa en la fotosensibilidad de la riboflavina que por irradiación con luz UV se descompone en los análogos lumiflavina o lumicromo. De esta manera, muestras de sangre contaminadas con patógenos son inoculadas con altas concentraciones de riboflavina (aproximadamente 50 μ M) e irradiadas con luz UV, por lo que la vitamina y sus derivados ingresan a los patógenos, se intercalan en el ADN y generan daño oxidativo. Este sistema fue efectivo para descontaminar sangre infectada con promastigotes de *Leishmania* sp. y tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, y otros patógenos no relacionados (Wainwright & Baptista 2011).

A pesar de ello, se desconoce el efecto de bajas concentraciones de los análogos de riboflavina sobre los tripanosomátidos. Sobre todo, el efecto de roseoflavina, que podría resultar de gran interés debido a su conocida actividad antimicrobiana (Pedrolli et al. 2013).

De esta manera, resulta interesante evaluar los mecanismos de obtención de riboflavina en tripanosomátidos así como el efecto de sus análogos sobre estos mecanismos y sobre la viabilidad de los parásitos.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

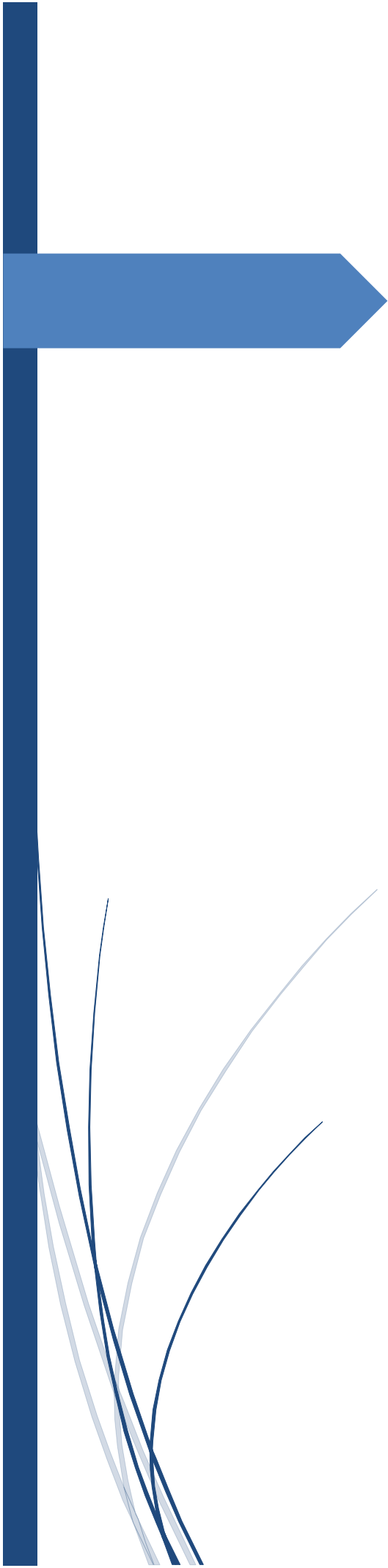
Nuestros estudios sobre la bioquímica y biología molecular de los tripanosomátidos se basan en buscar diferencias entre el metabolismo entre los parásitos y las células hospedadoras, con el propósito de detectar blancos específicos para el diseño de estrategias quimioterapéuticas específicas y más efectivas a las actualmente disponibles para tratar las tripanosomiasis.

OBJETIVOS PARTICULARES

Puesto que el metabolismo y transporte de riboflavina ha mostrado ser esencial en otros tipos celulares y poco se ha descrito en tripanosomátidos, en este trabajo proponemos:

- Estudiar el rol de la riboflavina, análogos y derivados, en los tripanosomátidos de importancia sanitaria como *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana*, como así también en el fitoparásito *Phytomonas* Jma y en parásitos exclusivos de insecto como *C. fasciculata*.
- Evaluar si los tripanosomátidos efectivamente incorporan riboflavina extracelular, a través de transportadores específicos.
- Identificar y caracterizar transportadores de riboflavina en tripanosomátidos, y corroborar su funcionalidad como tal.
- Profundizar en *T. cruzi*, el estudio de la relevancia de riboflavina en los procesos biológicos de viabilidad, proliferación, diferenciación, infectividad y replicación intracelular.

El conocimiento de esta vía, con sus características específicas y vitales para el parásito, permitiría **identificar / proponer nuevos blancos terapéuticos** para el desarrollo de nuevas terapias para la Enfermedad de Chagas y de otras tripanosomiasis.



MATERIALES y MÉTODOS

Tripanosomátidos: Medios de cultivo y Parásitos utilizados

Los epimastigotes de *T. cruzi*, promastigotes de *L. mexicana*, coanomastigotes de *C. fasciculata* y promastigotes de *Phytomonas* Jma, se cultivaron en medio BHT (*Brain Heart Infusion*: 33 gr/lts, Triptosa: 3 gr/lts, Na₂HPO₄·2H₂O: 4gr/lts, KCl: 0.4 gr/lts, glucosa 0.3 gr/lts) suplementado con 10 % SFB (Suero Fetal Bovino), hemina 20 µg/ml, antibióticos (100 µg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina); la concentración de riboflavina en este medio rico se estima en un rango entre 0,7 y 0,9 µM. Para el mantenimiento de los *T. brucei* procíclicos se utilizó un medio **semi-definido SDM-79** (Brun & Schönenberger 1979) suplementado con 10 % SFB, hemina 7,5 µg/ml y antibióticos (100 µg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina) (Vercesi et al. 1992).

Las cepas de parásitos utilizadas, se detallan en **Tabla MyM-1**. En el caso de *T. cruzi* se utilizaron las cepas Y transfectada con el plásmido pTEX-GFP, y se construyó una cepa MJ Levin transfectada con los vectores pRIBOTEX-GFP o pRIBOTEX-TcRibJ (ver detalles en “**Vectores recombinantes construidos**”).

Tabla MyM-1. Cepas de tripanosomátidos utilizados en este trabajo.

Tripanosomátido	Forma	Cepa	Referencia
<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes	MJ Levin	(Miranda et al. 2012)
<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes	MJ Levin pRIBOTEX-GFP	Este trabajo
<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes	MJ Levin pRIBOTEX-TcRibJ	Este trabajo
<i>T. cruzi</i>	Epimastigote	Y-GFP	(Barclay et al. 2011)
<i>T. brucei</i>	Procíclicos	29-12	(Pereira et al. 2002)
<i>L. mexicana</i>	Promastigotes	Costa Rica	(García Liñares et al. 2012)
<i>C. fasciculata</i>	Coanomastigotes	ATCC 11745	(Carrillo et al. 1999)
<i>Phytomonas</i> Jma	Promastigotes	Aislado del látex de <i>Jatropha macrantha</i> (Euphorbiaceae) y obtenidas originalmente del “Trypanosomatid Culture Collection”	(Canepa et al. 2011)

El medio **SDM-79** fue utilizado en algunos ensayos de la tesis, explícitamente indicados, pues por defecto, contiene riboflavina a una concentración final de 300 nM. Por otra parte, preparamos un medio SDM-79 modificado, por reemplazar componentes de su fórmula para reducir el contenido de riboflavina tanto como fuese posible. Para ello, se preparó una solución de vitaminas similar a la comercial (Invitrogen, Catálogo: 11120037) pero sin la adición de riboflavina; sin embargo, el componente “Medio 199” (Invitrogen, Catálogo: 31100019) no pudo ser sustituido ni modificado y aporta trazas de riboflavina a una concentración final de 20 nM. Este nuevo medio SDM-79 con 20 nM riboflavina fue **llamado SDM20**.

Ambos medios se suplementaron con 10 % suero, 7,5 µg/ml hemina y antibióticos (100 µg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina) y 1 mM putrescina.

Ensayos de proliferación

Las curvas de crecimiento se realizaron en medio SDM20 suplementado según se indica en el pie de cada figura. Cada ensayo comenzó con una densidad inicial determinada según el parásito estudiado: todas las cepas de *T. cruzi* se iniciaron a 10 millones/ml; mientras *T. brucei*, *L. mexicana*, *C. fasciculata* y *Phytomonas* Jma a 1 millón/ml. Se realizó el recuento de parásitos diariamente por conteo en cámara de Neubauer. Cada vez que los cultivos alcanzaban la fase estacionaria, se determinó la densidad máxima para la condición específica en estudio y se reinició el cultivo por re-dilución a la densidad inicial.

Las curvas de crecimiento se realizaron en presencia de distintas concentraciones de las flavinas: riboflavina, FMN y FAD (solubles en agua); o de los análogos de riboflavina: lumiflavina, lumicromo, roseoflavina (solubilizados en DMSO). También se analizó el efecto de dos drogas anti-cancerígenas como daunomicina y doxorubicina (solubilizadas en DMSO), debido a la leve similitud estructural con la riboflavina. Las curvas control se efectuaron con DMSO o con agua, según correspondiera, sin superar en ningún caso el 2 % v/v.

Análisis bioinformáticos

Búsqueda de flavoproteínas anotadas en el genoma de los tripanosomátidos

Para el análisis de un potencial flavoproteoma en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana* se utilizó la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>) utilizando FMN y FAD como palabras claves. De esta manera se obtuvo un listado de flavoproteínas con sus respectivas funciones anotadas (**Apéndice 1**).

Búsqueda de potenciales transportadores de riboflavina en tripanosomátidos

La secuencia de un potencial transportador de riboflavina en *T. cruzi* se obtuvo utilizando la herramienta BLASTP en la base de datos de los tripanosomátidos TriTrypDB, comparando con la secuencia de aminoácidos de varios transportadores de riboflavina previamente identificados: RibU/YpaA (Burgess et al. 2006), RibM/PnuX (Hemberger et al. 2011), ImpX (Gutiérrez-Preciado et al. 2015), RibN (García Angulo et al. 2013), RfnT (Gutiérrez-Preciado et al. 2015), RibXY (Gutiérrez-Preciado et al. 2015), RfuABCD (Deka et al. 2013), Mch5p (Reihl & Stolz 2005), *rft-1* y *rft-2* (Biswas et al. 2013), SLC52A/RFVT de mamíferos (Yonezawa & Inui 2013); y otros predichos como RibV de *M. florum* y RibZ de *C. difficile* (Gutiérrez-Preciado et al. 2015). Al potencial transportador lo llamamos “TcRibJ”, siendo TcCLB.509885.70 y TcCLB.508397.70 los códigos identificatorios de ambos alelos en esta base de datos.

Los potenciales transportadores de riboflavina de *T. brucei* y *L. mexicana* se obtuvieron utilizando la misma metodología, pero en este caso, se utilizó TcRibJ como secuencia de referencia. Los potenciales transportadores se denominaron “TbRibJ” (Tb927.5.470) y “LmiRibJ” (LmxM.05.0480) respectivamente. El alineamiento de secuencia entre TcRibJ, TbRibJ, LmiRibJ y Mch5p se realizó mediante el algoritmo MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Posteriormente, también se identificaron potenciales transportadores de riboflavina similares a TcRibJ en otros tripanosomátidos, cuyos genomas se encuentran total o parcialmente ensamblados (depositados en la base de datos Trityps, <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>, y en la base de datos NCBI assembly, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>, respectivamente). Por otro lado, se analizaron los genomas parcialmente ensamblados de especies cercanas al orden

Tripanosomatida, como *Bodo saltans* (orden Eubodonida) y *Trypanoplasma borreli* (orden Parabodonida). Estos genomas se encuentran depositados en el sitio de *Sanger Institute* (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/>).

El porcentaje de similitud entre *TcRibJ* y todos los potenciales transportadores de riboflavina fue obtenido con el algoritmo ClustalW del programa Geneious (<http://www.geneious.com/>). Para la determinación de la secuencia consenso de la familia RibJ, se realizó un alineamiento múltiple por el algoritmo MUSCLE y los resultados se representaron con su forma de secuencia LOGO, construido con el programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

La búsqueda de potenciales pasos transmembrana se realizó mediante el algoritmo TM-Coffee, el cual se basa en la extensión por homología (Chang et al. 2012). Brevemente: **1)** Para cada secuencia de interés (todas las secuencias RibJ identificadas en este trabajo) se realizaron búsquedas por BlastP de acuerdo a una base de datos no redundante, formada por proteínas con pasos transmembrana conocidos. **2)** El programa elige aquellas secuencias que mostraron una identidad entre 50 % - 90 %, y una cobertura de al menos el 70 %. **3)** Los resultados de las búsquedas se transforman en patrones conformados por secuencias similares. De esta manera, cada una de las posiciones se convierte en un alineamiento múltiple. Estos patrones contienen información acerca de los cambios de aminoácidos aceptables y reflejan las posiciones conservadas. **4)** Dichos patrones son alineados entre sí a través de Modelos Ocultos de Markov basados en probabilidades posteriores (cada columna se alinea si muestran una probabilidad posterior de ser alineada más alta que 0,99). De esta manera, se obtienen secuencias de proteínas (en este caso, RibJ) con pasos transmembrana alineadas y se resaltan las regiones que se corresponden con estos dominios.

Para la identificación de posibles dominios proteicos sobre las secuencias de RibJ se utilizó el consorcio InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), el cual utiliza modelos predictivos provenientes de diferentes bases de datos: PFAM de EMBL-EBI (<http://pfam.xfam.org/>), CDD de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) y *Superfamily* (<http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/index.html>). Estas bases de datos tienen distintas formas de predicción de dominios sobre la secuencia de interés. En la base de datos PFAM, los

dominios proteicos se almacenan como alineamientos múltiples y Modelos Ocultos de Markov mientras CDD solo contiene los alineamientos múltiples representados en matrices de puntaje sitios específicas. La base de datos Superfamily también se basa en los Modelos Ocultos de Markov, pero en este caso se utilizan dominios proteicos de estructura tridimensional conocida, agrupándose de acuerdo a cierto nivel de similitud estructural y por estar relacionadas evolutivamente.

Construcción del árbol filogenético de transportadores de riboflavina con el método *Neighbor-Joining*

Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron las secuencias de varios transportadores de riboflavina ya caracterizados experimentalmente y otros que sólo fueron predichos por análisis *in silico*. Entre ellos, se utilizó la secuencia de la familia de transportadores de RibU/YpaA (Burgess et al. 2006), RibM/PnuX (Hemberger et al. 2011), ImpX (Gutiérrez-Preciado et al. 2015), RibN (García Angulo et al. 2013), RfnT (Gutiérrez-Preciado et al. 2015), RibXY (Gutiérrez-Preciado et al. 2015), RfuA (Deka et al. 2013), Mch5p (Reihl & Stolz 2005), *rft-1* (Biswas et al. 2013), SLC52A/RFVT de mamíferos (Yonezawa & Inui 2013); y otros predichos como RibV de *M. florum* y RibZ de *C. difficile* (Gutiérrez-Preciado et al. 2015), y del alga *Nannochloropsis gaditana* (Corteggiani Carpinelli et al. 2014) (**Apéndice 2**).

Para ello, primero se realizó un alineamiento múltiple con el programa MEGA 6.0 (<http://en.bio-soft.net/tree/MEGA.html>), con el algoritmo MUSCLE. A partir de este alineamiento múltiple, se obtuvo una matriz de distancia ("protdist"), en donde los *gaps* no fueron descartados. Luego, se generó un árbol filogenético sin enraizar basado en el método de *Neighbor-Joining*, con un *Bootstrap* de 1000 para estimar estadísticamente la distribución de la data.

Para identificar otros posibles transportadores pertenecientes a la novel familia RibJ: **(i)** se construyó un Modelo Oculto de Markov de esta familia, utilizando el programa HMMBUILD basado en el algoritmo hmmer 3.0 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::hmmbuild>); **(ii)** este modelo se usó para comparar con la base de datos UniprotKB usando el algoritmo hmmsearch del server HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmsearch>). De esta manera se obtuvieron 13.693 secuencias con cierto grado de similitud a RibJ; **(iii)** se seleccionaron las secuencias que

tuvieran un *e-value* < 10⁻¹⁰, un taxón y una putativa función o dominio/s proteico/s asociados, y se descartó a aquellas secuencias repetidas. Con estos filtros, el número de secuencias se redujo a 329, incluidas las de RibJ (**Apéndice 3**).

Finalmente, utilizando estas secuencias se construyó un árbol filogenético sin enraizar basado en el método de *Neighbor-Joining*, tal como se explicó anteriormente.

Construcción del árbol filogenético de transportadores de riboflavina de kinetoplástidos con el método de máxima verosimilitud

Primero se realizó un alineamiento múltiple con el programa MEGA 6.0, por MUSCLE, utilizando las secuencias de los potenciales transportadores de riboflavina de varios tripanosomátidos y especies relacionadas, en donde los *gaps* fueron descartados.

Luego, el mejor modelo evolutivo para este alineamiento múltiple fue establecido por el mismo programa MEGA 6.0. Gracias a esto, para la construcción del árbol filogenético se eligió el modelo evolutivo establecido por Le et al. (Le & Gascuel 2008), con un *bootstrap* de 1000, utilizando el método de máxima verosimilitud.

Modelado de la estructura tridimensional de TcRibJ

Los sitios *on-line* Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) y Robbeta (<http://robeta.bakerlab.org/>) permiten predecir la estructura tridimensional de una proteína de interés, a través de modelados computacionales. Brevemente, ambos métodos: **(i)** buscan en la secuencia de interés, regiones homólogas (remotas o no) a otras proteínas con estructura conocida (templados); **(ii)** se modela la estructura de la proteína de interés en base a los templados; y **(iii)** aquellas regiones de la secuencia de interés que no tuvieran posibles homólogos se modelan por diferentes métodos *ab initio*.

En Phyre2 (Kelly et al. 2015), el proceso se desarrolla mediante los siguientes pasos: **1)** Identificación de secuencias homólogas; **2)** predicción de estructura secundaria; **3)** construcción de modelos ocultos de Markov (*Hidden Markov Model*, HMM) de la secuencia de interés y sus homólogos con estructuras predichas; **4)** comparación de este HMM con una base de datos conteniendo diferentes HMMs correspondientes a proteínas cuyas estructuras han sido experimentalmente determinadas, siendo utilizados como templados; **5)** construcción de

modelos tridimensionales del esqueleto carbonado de la secuencia de interés, basándose en las comparaciones anteriores entre HMMs de la proteína de interés y los templados; y **6)** modelado de *loops* localizados en la proteína de interés.

Para mejorar el modelado, además: **7)** se examinan otros templados para maximizar el *coverage* (cobertura de alineamiento) y *confidence* (confianza en la predicción), y se construyen nuevos modelos para cada templado; todos estos modelos proveen información acerca de las restricciones entre los carbonos alfa; **8)** realiza una síntesis virtual de la proteína de interés teniendo en cuenta todas estas restricciones, obteniéndose la estructura final de la proteína de interés.

El programa Robetta (Kim et al. 2004): **1)** busca dominios proteicos en la secuencia de interés que son homólogos a dominios con estructuras determinadas experimentalmente, por el método GINZU (basado en búsquedas por BLAST, PSIBLAST, FFAS03 o 3D-Jury); **2)** busca regiones de la proteína de interés sin homólogos. Si estas tienen menos de 50 aminoácidos son considerados como *linkers* entre los dominios; de lo contrario, se buscan homólogos remotos por otras estrategias (HMMER en PFAM). **3)** Para determinar dominios putativos en las regiones de la proteína sin homólogos aparentes, realiza un alineamiento múltiple basado en PSI-BLAST contra la base de datos no-redundantes de proteínas de NCBI. Aquellas regiones de la proteína con cierto número de *hits* son consideradas como dominios proteicos putativos; finalmente **4)** las secuencias de la proteína sin homólogos asignados son analizadas de acuerdo a si forman parte de extremos terminales o de *loops* y son modelados por métodos *ab initio*.

Para corroborar los homólogos remotos a TcRibJ encontrados por estos servidores, se utilizó el programa HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred#>), que compara la secuencia de interés con HMMs conteniendo información de diferentes dominios proteicos.

Finalmente, la comparación entre los modelos de TcRibJ y la estructura de GlpT (pdb: 1PW4) usada como templado se realizó por la alineación de ambas entidades y determinación del RMSD (Root Mean Square Deviation: indica la desviación promedio en un alineamiento estructural) por el servidor PDBeFol (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/cgi-bin/ssmserver).

Identificación de posibles sitios de interacción entre *TcRibJ* y flavinas por *Docking*

Para evaluar posibles interacciones de las flavinas con *TcRibJ* y, en caso afirmativo, determinar los aminoácidos involucrados, se realizó un *docking* utilizando el sitio *Swissdock on-line* (<http://www.swissdock.ch/>).

Este programa es de libre uso y se basa en cuatro pasos: **1)** determinación de los posibles sitios de unión del ligando en la proteína blanco; **2)** optimización estructural del ligando dentro de los sitios de unión encontrados; **3)** cálculo de la energía de interacción entre el ligando y el sitio de unión; y **4)** optimización de los modelos generados por: 4.a- minimización de la energía de interacción a grandes rasgos; 4.b- agrupamientos de modelos similares estructuralmente; 4.c- consideración de la energía de solvatación del complejo proteína-ligando; 4.d- aplicación de operadores de optimización fina de las interacciones; y 4.e- re-agrupamiento de estos nuevos modelos generados. De esta manera, el programa arroja varios modelos, agrupados en *clusters* por similitud estructural, favorables desde el punto de vista energético.

En estos ensayos bioinformáticos también se incluyeron moléculas estructuralmente no relacionadas con las flavinas, como putrescina y treonina.

Visualización de los resultados

La visualización y análisis de las estructuras y resultados de *docking* se realizaron con el programa VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

Construcción de vectores recombinantes

Purificación de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*, de procíclicos de *T. brucei* y de promastigotes de *L. mexicana*

Para la purificación de ADN genómico de estos parásitos se utilizó el protocolo descrito por Medina-Acosta et al. (Medina-Acosta & Cross 1993). Brevemente, ~50 millones de parásitos se centrifugaron a 3000 rpm a temperatura ambiente y se lavaron con PBS. El *pellet* se resuspendió en líquido residual y se agregó 500 µl de *buffer* TELT (50 mM Tris HCl pH 8, 62,5 mM EDTA pH 9, 2,5 mM LiCl, 4 % v/v Tritón X-100). Luego de mezclar suavemente, se incubó 5 min a temperatura ambiente. La extracción se realizó con 500 µl de fenol: cloroformo (1:1 v/v), se mezcló por inversión e incubó nuevamente 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, y la fase acuosa (fase superior) se separó y transfirió a tubos tipo eppendorf de 2 ml.

Luego de medir el volumen de la fase acuosa, se agregó 2 volúmenes de etanol 100 %, mezclándose por inversión, y se incubó 5 min a temperatura ambiente. La precipitación del ADN genómico se realizó centrifugando a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C. El *pellet* se lavó con 1 ml de etanol 100 %, se dejó secar al aire y se resuspendió en *buffer* EB (10 mM Tris-HCl pH 8,5). El ADN obtenido fue cuantificado por absorbancia en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Purificación de ADN plasmídico a partir de *E. coli* DH5α

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la **Tabla MyM-2**. La extracción y purificación de los plásmidos se realizó a partir de un cultivo ON de *E. coli* DH5α, creciendo en medio LB con el antibiótico correspondiente, a través de *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Construcción de los vectores recombinantes de expresión en *T. cruzi*

Reacciones de PCR y purificación de los productos obtenidos

En todos los casos, las reacciones de PCR se realizaron siguiendo el programa: 94°C 10 min, 30 ciclos de (94 °C - 45 s, 58 °C - 35 s, 72 °C - 1:50 min) y 72 °C 5 min. En el caso de amplificar a partir de:

- ADN genómico: se utilizaron ~200 ng como templado;
- Plásmido: se agregó ~1 ng a la reacción.

La enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y los demás reactivos se emplearon siguiendo las instrucciones del fabricante. Los *primers* en cada caso se detallan en el párrafo correspondiente (**Tabla MyM-3**).

Los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1 % con bromuro de etidio, y los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador con luz UV.

Los productos de PCR se purificaron utilizando el *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Digestión de los vectores de expresión en *T. cruzi* y de los productos de PCR

Vector pRIBOTEX-TcRibJ: se amplificó la secuencia de *TcRibJ* a partir de ADN genómico de *T. cruzi*, utilizando los *primers* F-EcoRI-*TcRibJ* y R-HindIII-*TcRibJ* (**Tabla MyM-3**). El producto de amplificación y el vector de expresión de *T. cruzi* pRIBOTEX fueron digeridos con EcoRI y HindIII (New England) a 37 °C por 3 h.

Vector pRIBOTEX-GFP: se amplificó la secuencia de GFP del vector pTREX-GFP (donado por el Dr. Claudio Pereira), utilizando los *primers* F-EcoRI-GFP y R-HindIII-GFP (**Tabla MyM-3**). El producto de amplificación y el vector de expresión de *T. cruzi* pRIBOTEX fueron digeridos con EcoRI y HindIII (New England) a 37 °C por 3 h.

Vector pTREX(higromicina)-TcPAT12: el inserto *TcPAT12* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *T. cruzi*, utilizando los *primers* F-XmaI-*TcPAT12* y R-HindIII-*TcPAT12* (**Tabla MyM-3**). El producto de amplificación y el vector de expresión pTREX(higromicina) fueron digeridos con XmaI y HindIII (New England) a 37 °C por 3 h.

A diferencia del resto de los vectores construidos en este trabajo, el plásmido pTREX(higromicina)-*TcPAT12* solo se utilizó como intermediario para el clonado de *TcPAT12* en el vector de expresión pET24d de *E. coli* (ver sección “**Construcción de vectores recombinantes de expresión en bacterias *E. coli*”**).

Tabla MyM-2. Vectores empleados en este trabajo

Plásmidos	Descripción	Referencias
Plásmidos para <i>T. cruzi</i>		
pRIBOTEX	Vector de expresión en <i>T. cruzi</i> . Contiene el promotor de ADN _r y los genes de resistencia a G418 y ampicilina	(Martínez-Calvillo et al. 1997)
pRIBOTEX-GFP	Expresa la proteína GFP, usado como control	Este trabajo
pRIBOTEX- <i>TcRibJ</i>	Expresa el transportador de riboflavina de <i>T. cruzi</i>	Este trabajo
pTREX(higromicina)	Vector de expresión en <i>T. cruzi</i> . Contiene el promotor de ADN _r y una región intergénica que incrementa aún más el nivel de expresión. Tiene resistencia a higromicina y ampicilina	(Bouvier et al. 2013)
pTREX(higromicina)- <i>TcPAT12</i>	Expresa el transportador de poliaminas de <i>T. cruzi</i> , solamente utilizado como intermediario para la construcción de otros vectores	Este trabajo
Plásmidos para <i>S. pombe</i>		
pREP3x	Vector de expresión en <i>S. pombe</i> . Contiene el gen <i>LEU2</i> (Beta-isopropilmalato deshidrogenasa) de <i>S. cerevisiae</i> , que complementa la auxotrofia <i>leu1-32</i> de <i>S. pombe</i>	(Maundrell 1993)
pREP3x- <i>TcRibJ</i>	Expresa la secuencia codificante de <i>TcRibJ</i>	Este trabajo
pREP3x- <i>TbRibJ</i>	Expresa la secuencia codificante de <i>TbRibJ</i>	Este trabajo
pREP3x- <i>LmiRibJ</i>	Expresa la secuencia codificante de <i>LmiRibJ</i>	Este trabajo
pFAa-KanMX6	Vector de expresión en <i>S. Pombe</i> . Contiene el gen de resistencia a G418	(Bähler et al. 1998)
Plásmidos para <i>E. coli</i>		
pET24a y pET24d	Vectores de expresión en <i>E. coli</i> , con diferente marco de lectura. Contienen el gen de resistencia a kanamicina	Comercial
pET24a-RibM	Expresa el transportador de riboflavina RibM, utilizado como control positivo	(Hemberger et al. 2011)
pET24a- <i>TcRibJ</i>	Expresa la secuencia codificante de <i>TcRibJ</i>	Este trabajo
pET24a- <i>TbRibJ</i>	Expresa la secuencia codificante de <i>TbRibJ</i>	Este trabajo
pET24a- <i>LmiRibJ</i>	Expresa la secuencia codificante de <i>LmiRibJ</i>	Este trabajo
pET24d- <i>TcPAT12</i>	Expresa el transportador <i>TcPAT12</i> , utilizado como control negativo	Este trabajo

Tabla MyM-3. Primers utilizados para la amplificación de los fragmentos correspondientes. En rojo se resaltan los sitios de restricción.

Primer	Secuencia 5' a 3'
Plásmidos de <i>T. cruzi</i>	
F-EcoRI- <i>TcRibJ</i>	CGGAATTCATGTTGCCATGTTTCACACGG
R-HindIII- <i>TcRibJ</i>	CCCAGCTTTTACGCAAGTTTGCTTCTGC
F-EcoRI-GFP	CCGGAATTCATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTG
R-HindIII-GFP	CCCAGCTTTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAAT
F-BamHI- <i>TcRibJ</i>	CGGGATCCATGTTGCCATGTTTCACACG
F-XmaI- <i>TcPAT12</i>	CCCGGGATGAATCCCGGTGGTGAATC
R-HindIII- <i>TcPAT12</i>	CCCAGCTTGTTTACGTGTGGGCATTTG
Plásmidos de <i>S. pombe</i>	
F-pREP3X- <i>TcRibJ</i>	GTCGCTTTGTAAATGGCCTCGAGATGTTGCCATGTTTCACACGG
R-pREP3x- <i>TcRibJ</i>	CAAGGGAGACATTCCTTTACCCGGGTAAAGATCTCGCAAGTTTGCTTCTGCTG
F-pREP3X- <i>TbRibJ</i>	GTCGCTTTGTAAATGGCCTCGAGATGCTTCCAAGTTTCACCCG
F-pREP3X- <i>TbRibJ</i>	CAAGGGAGACATTCCTTTACCCGGGTAAAGATCTCATAATCTCAACAAGTTTGCTTCTC
F-pREP3X- <i>LmiRibJ</i>	GTCGCTTTGTAAATGGCCTCGAGATGCAAATCTACGAGGCATGCAAG
F-pREP3X- <i>LmiRibJ</i>	CAAGGGAGACATTCCTTTACCCGGGTAAAGATCTCGCCTGCCTCACCACGCGCA
Mutantes <i>S. pombe</i> $\Delta rib5$	
Fwd-(5'-UTR) <i>RIB5</i>	GGCACAATTAATTACCGTGAGTGAGTTCTTCCTTCAACC
Rev-(5'-UTR) <i>RIB5</i> KanMX6	TAATTAACCCGGGGATCCGCAACAAGACCTGTAAACATCT
Fwd-(3'-UTR) <i>RIB5</i> KanMX6	GTTTAAACGAGCTCGAATTCGAAAACCCAAGCTTGAATGCGC
Rev-(3'-UTR) <i>RIB5</i>	CCCCATTCTTCACAAATTTGTCAAGTGAAGTGAAGG
Fwd-KanMX6-(5'-UTR) <i>RIB5</i>	GGTCTTGTTGCGGATCCCCGGGTAAATTAAGGCGCGCCAG
Rev-KanMX6-(3'-UTR) <i>RIB5</i>	TTGGGTTTTCGAATTCGAGCTCGTTTAACTGGATGGCGG
Plásmidos para <i>E. coli</i>	
F-NdeI- <i>TcRibJ</i>	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCACCACCACCACCTTGCCATGTTTCACACGGAA
R-BamHI- <i>TcRibJ</i>	AGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTTACGCAAGTTTGCTTCTGC
F-NdeI- <i>TbRibJ</i>	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCACCACCACCACCTTCCAAGTTTCACCCGTAA
R-BamHI- <i>TbRibJ</i>	AGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTCACATAATCTCAACAAGTTT
F-NdeI- <i>LmiRibJ</i>	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCACCACCACCACCAGATCTACGAGGCA TGCAAG
R-BamHI- <i>LmiRibJ</i>	AGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTCACGCCTGCCTCACCACGCG

Reacción de desfosforilación

La desfosforilación de los vectores digeridos se llevó a cabo utilizando la enzima CIAP (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de prevenir la recircularización y religación del vector.

Reacción de ligación

Una vez que los plásmidos (digeridos y desfosforilados) y los insertos (digeridos) fueron purificados utilizando el *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN), el clonado se llevó a cabo con la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen) utilizando una relación molar inserto: vector 3:1, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Construcción de vectores recombinantes de expresión en levaduras *S. pombe* y bacterias *E. coli*:

Las construcciones pREP3x-*TcRibJ*, pREP3x-*TbRibJ* y pREP3x-*LmiRibJ* para *S. pombe* y pET24a-*TcRibJ*, pET24a-*TbRibJ* y pET24a-*LmiRibJ* para *E. coli* (**Tabla MyM-2**) se obtuvieron utilizando una estrategia diferente a lo explicado anteriormente.

Primera ronda de PCR (Amplificación desde ADN genómico de tripanosomátidos)

La primera reacción de PCR se utilizó para amplificar los potenciales transportadores de riboflavina de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana* a partir del ADN genómico correspondiente. Para ello, se utilizaron los pares de *primers*: F-pREP3x-*TcRibJ* / R-pREP3x-*TcRibJ*, F-pREP3x-*TbRibJ* / R-pREP3x-*TbRibJ*, F-pREP3x-*LmiRibJ* / R-pREP3x-*LmiRibJ* para el vector pREP3x, y F-NdeI-*TcRibJ* / R-BamHI-*TcRibJ*, F-NdeI-*TbRibJ* / R-BamHI-*TbRibJ* y F-NdeI-*LmiRibJ* / R-BamHI-*LmiRibJ* para pET24a (**Tabla MyM-3**).

En todos los casos, las reacciones de PCR se realizaron con la enzima DNA polimerasa Pfx (Invitrogen), según indicación del fabricante. El programa empleado fue: 94°C - 5 min, 30 ciclos de (94°C - 45 s, 58°C - 35 s, 68°C - 2:00 min) y 68°C - 5 min.

Los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1 % con bromuro de etidio, y los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador con luz UV.

Los productos de PCR se purificaron utilizando el *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Segunda ronda de PCR: clonado en los vectores pREP3x o pET24a

En este caso, el clonado en los vectores pREP3x o pET24a se realizó mediante una segunda ronda de PCR con la enzima Q5 DNA polimerasa (New England), donde los productos de PCR anteriores se usaron como *primers* (ver esquema en la **Figura MyM-1**). El programa utilizado fue: 94 °C - 5 min, 18 ciclos (94 °C - 50 s, 60 °C - 35 s, 72 °C - 3:30 min) y 72 °C - 2 min.

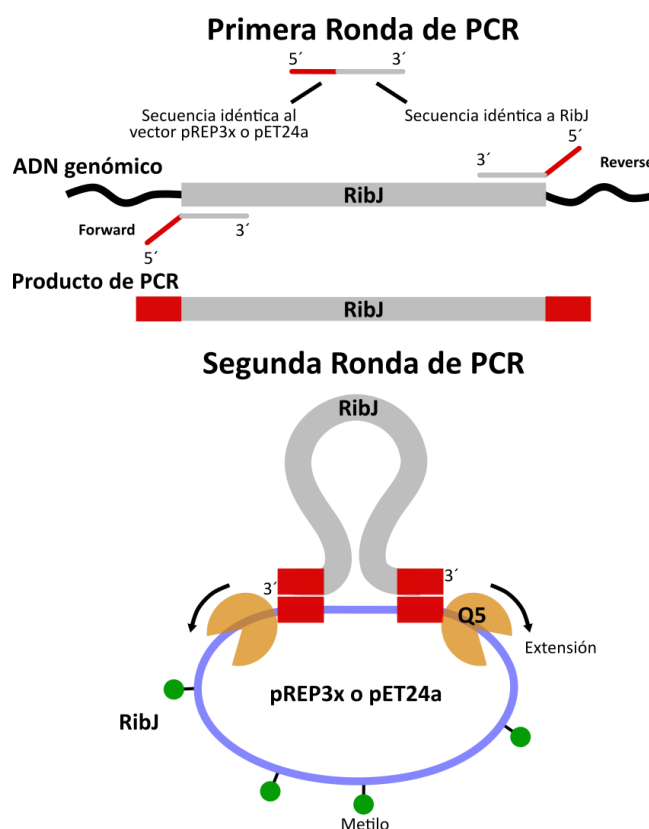


Figura MyM-1. Representación del clonado de *TcRibJ*, *TbRibJ* y *LmiRibJ* en el vector de expresión de *S. pombe* pREP3x o de *E. coli* pET24a mediante la enzima Q5 DNA polimerasa.

Digestión de ADN plasmídico metilado: pREP3x o pET24a vacíos

El producto de la segunda reacción de PCR se incubó con la enzima de restricción DpnI (New England), que reconoce y corta ADN metilado. De esta manera, el plásmido purificado de *E. coli*

– no recombinante- es digerido mientras que el vector obtenido por PCR, al no estar metilado, no es digerido por la enzima. De esta manera, se elimina el *background* generado por los plásmidos pREP3x o pET24a vacíos.

Construcción del vector recombinante pET24d-TcPAT12

Para la construcción del pET24d-TcPAT12 (que codifica para el transportador de poliaminas de *T. cruzi* (Carrillo et al. 2006)), el inserto TcPAT12 se extrajo del vector pTREX(higromicina)-TcPAT12, a través de su digestión con las enzimas BamHI y HindIII (New England) a 37 °C por 3h.

La reacción de digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1 % con bromuro de etidio, y el fragmento correspondiente se purificó utilizando *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

En paralelo, el plásmido pET24d vacío se digirió con las mismas enzimas de restricción y, posteriormente, se desfosforiló con la enzima CIAP (Promega), tal como lo indica el fabricante.

La ligación se realizó con T4 DNA ligasa (Invitrogen), en una relación molar inserto: vector 3:1.

Preparación de *E. coli* electrocompetentes y electroporación

Bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α se estriaron en placas de LB (extracto de levadura 0,5 %, peptona 1 %, NaCl 1 %, agar 2 %), de manera tal de obtener colonias aisladas. Se repicaron 10 colonias en 25 ml de LB líquido fresco y se incubaron a 37 °C, ON con agitación. Al día siguiente, 5 ml de este cultivo se utilizó para inocular 500 ml de LB sin sal (DO inicial: ~0.02) y se incubaron a 37 °C con agitación, hasta alcanzar una DO final: 0.4-0.6. Luego, las bacterias se incubaron en hielo por 10 min, se centrifugaron a 3000 rpm a 4 °C y lavaron 3 veces con glicerol al 10 % frío. Posteriormente se resuspendieron en 1,5 - 2 ml de glicerol 10%, se alicuotaron de a 50 μ l en *ependorfs* estériles, rápidamente se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C.

Para la electroporación, las bacterias se descongelaron en hielo y se agregó plásmido (4 μ l de ligación o 1 μ l del clonado por PCR con Q5 DNA polimerasa). Se trasvasaron a cubetas de 0,2 cm de gap (BioRad Laboratories), previamente enfriadas, y la electroporación se realizó mediante un único pulso a 2,5 kV, 25 μ FA y 200 Ω . Rápidamente, se agregó 1 ml de medio SOB (extracto de levadura 0,5 %, peptona 2 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucosa 20 mM), se trasvasaron a tubos *ependorfs* estériles e incubaron 1 h a 37 °C.

Luego las bacterias se sembraron en LB agar con ampicilina (200 µg/ml, para pRIBOTEX, pTREX y sus derivados) o kanamicina (50 µg/ml, para pET24a y sus derivados), y se incubaron en estufa a 37 °C ON. Finalmente, algunas colonias se repicaron en placas de LB frescas con el respectivo antibiótico, para facilitar el *screening* de colonias positivas.

Verificación de los clonados por *Colony PCR*

La verificación de la transformación de las bacterias resistentes a los antibióticos, que contuvieran los plásmidos con los insertos correspondientes, se realizó por PCR de colonias en crudo o “*Colony PCR*”. Esta reacción se llevó a cabo con la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen) según lo indica el fabricante. En este caso, las colonias de *E. coli* transformadas se picaron con un escarbadiantes estéril y se agregó al tubo de reacción como fuente de ADN molde. Los *primers* fueron los mismos que se utilizaron previamente (**Tabla MyM-3**). Los productos de la *colony PCR* se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio.

Las colonias que dieron positivas en el *screening* se conservaron en glicerol 15 % a -80°C.

Las secuencias de las regiones clonadas se analizaron por secuenciación para corroborar la ausencia de mutaciones.

Construcción de cepas de *S. pombe* $\Delta rib5$ que expresan los potenciales transportadores de riboflavina

Cepa de *S. pombe* y Medios de cultivo

En este trabajo se utilizó la levadura *Schizosaccharomyces pombe* cepa Sp61 (h-, *ade1*, *ade6-M210*, *leu1-32*, *ura4-D18*) la cual es auxótrofa para adenina, leucina y uracilo. Para su crecimiento, se utilizó el medio YEA (glucosa 3 %, extracto de levadura 0,5 % y adenina 0,07 mg/ml) o YES (igual que YEA pero suplementado con adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina a 225 mg/ml cada uno). También se preparó medio mínimo Edinburgh (Forsburg & Rhind 2006). Estos medios también se prepararon en forma sólida con agar 2 %. En todos los casos, las levaduras se incubaron a 28 °C.

Extracción de ADN genómico de *S. pombe*

Las levaduras se cultivaron en medio YEA (10 ml) ON. Luego se cosecharon y lavaron con agua bidestilada, se resuspendieron en 0,5 ml de agua, se centrifugó y resuspendió en el líquido residual. Para la lisis, se agregó 0,2 ml de buffer conteniendo SDS 1 %, Triton-X100 2 %, NaCl 100 mM, Tris (pH 8,0) 10 mM, EDTA (pH 8,0) 1 mM, 0,2 ml de fenol: cloroformo (1:1) y esferas de vidrio lavadas con ácido. Se agitó vigorosamente por 2 - 5 min a temperatura ambiente, se agregó 0,2 ml de *buffer* TE y se centrifugó 5 min a máxima velocidad. La fase acuosa se transfirió a un tubo *eppendorf* nuevo y se agregaron 2 volúmenes de etanol para la precipitación del ADN. Luego, se centrifugó 15 min a máxima velocidad a 4 °C y el *pellet* se resuspendió en 0,4 ml de *buffer* TE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA). La cuantificación del ADN genómico se realizó con NanoDrop 2000.

Preparación del fragmento de ADN conteniendo el gen *KanMX6* flanqueado por secuencias de *RIB5*

Se generó un fragmento de ADN conteniendo una parte de la región 5'-UTR y 3'-UTR (ambas próximas a la secuencia codificante de *RIB5*) flanqueando al gen de resistencia a G418 (*KanMX6*) y su promotor constitutivo (Bähler et al. 1998). El esquema de trabajo se representa en la **Figura MyM-2**. Básicamente, se realizaron varias reacciones de PCR sucesivas para obtener: **1)** la región 5'-UTR de *RIB5* fusionado al extremo 5' del gen *KanMX6* (*primers*: Fwd-(5'-UTR)*RIB5* / Rev-(5'-

UTR)*RIB5*KanMX6); **2)** la región 3'-UTR de *RIB5* fusionado al extremo 3' del gen *KanMX6* (*primers*: Fwd-(3'-UTR)*RIB5*KanMX6 / Rev-(3'-UTR)*RIB5*); **3)** el gen *KanMX6* fusionado a los extremos de la región 5'-UTR y de la región 3'-UTR de *RIB5* (*primers*: Fwd-KanMX6-(5'-UTR)*RIB5* / Rev-KanMX6-(3'-UTR)*RIB5*). **4)** La última reacción de PCR se realizó con el fin de fusionar los 3 productos anteriores (*primers*: Fwd-(5'-UTR)*RIB5* / Rev-(3'-UTR)*RIB5*). Las secuencias de los *primers* se detallaron en la **Tabla MyM-3**.

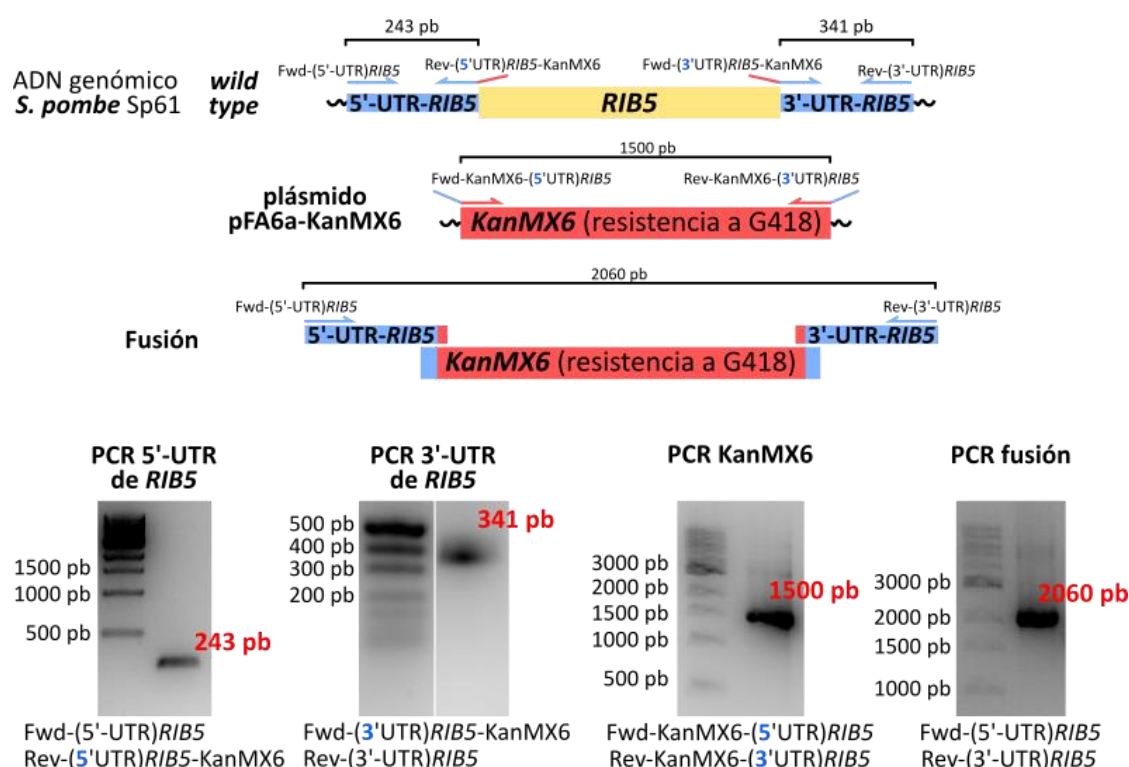


Figura MyM-2. Esquema de trabajo realizado para la obtención del fragmento de ADN conteniendo el gen *KanMX6* flanqueado por las secuencias de 5'-UTR y 3'-UTR de *RIB5* (panel superior). En el panel inferior se muestran los resultados de las diferentes reacciones de PCR realizadas.

De esta manera, en levaduras de *S. pombe* Sp61 transformadas con este fragmento, el gen *RIB5* se reemplazaría con nuestra construcción por recombinación homóloga.

Los programas de PCR fueron:

- para **1)** y **2)**, 10 min a 94 °C /30 ciclos de: 35 s a 94 °C, 25 s a 60 °C, 35 s a 72 °C / 2 min a 72 °C, y se usaron 200 ng de ADN genómico de *S. pombe*.

- Para **3**), 5 min a 94 °C / 30 ciclos de: 45 s a 94 °C, 35 s a 60 °C, 1:45 min a 72 °C / 5 min a 72 °C, y se usaron 1 ng de ADN plasmídico.
- Para **4**), 5 min a 94 °C / 30 ciclos de: 45 s a 94 °C, 35 s a 60 °C, 2:30 min a 72 °C / 5 min a 72 °C, y se usaron 20 ng de fragmentos 5'UTR-*RIB5* y 3'UTR'*RIB5* y de fragmento KanMX6.

Con fines analíticos, una alícuota de los productos obtenidos fue sometida a electroforesis en geles de agarosa 1 % con bromuro de etidio, y los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador con luz UV. Los productos de fusión por PCR cuyas alícuotas mostraron un resultado positivo (banda de 2060pb en el gel) se juntaron en un único tubo que se llevó a un volumen final de 0,2 ml. Luego se agregó 20 µl de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 500 µl de etanol, y se incubó 1 h a -20 °C. Posteriormente se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4 °C. El *pellet* se lavó con etanol 70 % y se centrifugó 5 min a 13000 rpm a 4 °C. El *pellet* se secó al aire y finalmente se resuspendió en 20 µl de *buffer* TE.

Preparación de *S. pombe* electrocompetentes y electroporación

Levaduras *S. pombe wild type* se cultivaron en medio YEA durante 48 h a 28 °C con agitación. Una alícuota del cultivo sobrecrecido se inoculó en medio YEA (dilución 1/50 aproximadamente) y se incubó en las mismas condiciones durante 18 h, alcanzando una DO₆₀₀ entre 1 y 1,5. Posteriormente, las levaduras se cosecharon y lavaron 2 veces con agua bidestilada estéril fría, y una vez con sorbitol 1 M frío. Luego, el *pellet* se resuspendió en el líquido residual, se trasvasó a tubo *ependorf* estéril, y nuevamente se lavó con sorbitol 1 M. Finalmente, las levaduras se resuspendieron en 0,15 ml de sorbitol 1 M. Durante todo el proceso las levaduras se mantuvieron en frío. Para la transformación, la suspensión se alicuotó de a 50 µl en tubos *ependorf*, las levaduras se incubaron con ADN plasmídico o producto de PCR y se trasvasó a cubetas de electroporación. La transformación se realizó con un pulso a 1,5 KV, 200 Ω y 25 µFa (T ~ 5 ms). La recuperación se realizó con sorbitol 1 M a 28 °C. Finalmente, se sembraron en placas de medio YES agar con exceso de riboflavina (> 750 µM), y se incubaron a 28 °C durante 2 días. Luego, estas placas se sometieron a *replicate plate* de manera tal de transferir las células a YES agar con riboflavina y G418 (200 mg/lts), y se incubaron a 28 °C durante 5 días. Las colonias obtenidas se cultivaron en YES agar con riboflavina y G418, y se congelaron a -80 °C con glicerol 15 %.

Chequeo de levaduras *S. pombe* mutantes $\Delta rib5$

Análisis fenotípico

Para confirmar la sustitución del gen *RIB5* por el de resistencia a kanamicina, se realizaron ensayos de crecimiento. Para ello, las colonias obtenidas (llamadas $\Delta rib5$) y la cepa *wild type* se cultivaron en medio YES con exceso de riboflavina a 28 °C, hasta alcanzar la fase logarítmica media. Luego de medir la DO_{600} , los cultivos se lavaron con PBS estéril y se resuspendieron en medio YES fresco hasta una DO final = 0,6. A partir de este cultivo se realizaron diluciones seriadas al décimo, hasta alcanzar un orden de 10^{-5} . Finalmente, se tomaron 10 μ l de cada dilución y se sembraron en placas de YES conteniendo 750 μ M de riboflavina o sin vitamina (0 μ M).

Análisis molecular

Para corroborar que la auxotrofia observada fenotípicamente se debía al reemplazo en el gen *RIB5* de *S. pombe* Sp61, se extrajo ADN genómico de las cepas $\Delta rib5$ y *wild type* y se realizaron diversas reacciones de PCR. Para ello, se utilizaron los *primers* Fwd-(5'-UTR)*RIB5-KanMX6* / Rev-(5'-UTR)*RIB5-KanMX6* o el par Fwd-(5'-UTR)*RIB5-KanMX6* / Rev-(3'-UTR)*RIB5* o el par de *primers* Fwd-(5'-UTR)*RIB5* / Rev-(3'-UTR)*RIB5*.

Los productos de PCR se sometieron a corrida electroforética en gel de agarosa 1 % y los resultados se visualizaron con transiluminador con luz UV.

Electroporación de *S. pombe* $\Delta rib5$ con las construcciones pREP3x - RibJ

Un cultivo de las levaduras $\Delta rib5$ chequeadas por fenotipo y PCR fue preparado y electroporado tal como se explicó anteriormente. En este caso, la selección se realizó en medio mínimo de Edinburgh con adenina y uracilo (225 mg/lts), riboflavina en exceso (> 750 μ M) para complementar la auxotrofia, en presencia de la vitamina tiamina (5 μ g/ml) para inhibir al promotor que controla la expresión de los genes de interés, y en ausencia de leucina para seleccionar a las transformantes (Reihl & Stolz 2005).

Ensayos funcionales de RibJ en el sistema heterólogo *E. coli* $\Delta ribB$ auxótrofas para riboflavina

Para estos ensayos se utilizó la cepa de *E. coli* $\Delta ribB$, desarrollada por García Angulo et al. (García Angulo et al. 2013), que se caracteriza por ser auxótrofa para riboflavina pues, por un lado, el gen

ribB de *E. coli* (codificando para la enzima 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato sintasa, esencial para la síntesis de riboflavina) fue reemplazada por recombinación homóloga con el gen de resistencia a cloranfenicol; y por el otro lado, naturalmente *E. coli* carece de transportadores de riboflavina endógenos.

Medio de cultivo para el crecimiento de *E. coli* Δ *ribB*

Debido a la auxotrofía de *E. coli* Δ *ribB*, el medio LB (sólido o líquido) tuvo que ser suplementado con riboflavina en exceso (concentración final > 750 μ M).

Preparación de *E. coli* Δ *ribB* electrocompetentes y electroporación

Los protocolos de preparación de *E. coli* Δ *ribB* electrocompetentes y de electroporación fueron los mismos que se utilizaron para *E. coli* DH5 α .

Estas bacterias se transformaron con los plásmidos pET24a-vacío, pET24a-*TcRibJ*, pET24a-*TbRibJ*, pET24a-*LmiRibJ*, pET24a-*RibM* y pET24d-*TcPAT12* y se seleccionaron en placas de LB sólido con 50 μ g/ml de kanamicina y exceso de riboflavina.

Las bacterias *E. coli* Δ *ribB* transformadas con estos plásmidos se almacenaron en LB líquido con kanamicina, riboflavina en exceso y glicerol al 15 %, a -80 °C.

Ensayos de complementación de crecimiento de *E. coli* Δ *ribB* expresando *RibJ*

Para estos ensayos, colonias de *E. coli* Δ *ribB* transformadas con los plásmidos pET24a-vacío, pET24a-*TcRibJ*, pET24a-*TbRibJ*, pET24a-*LmiRibJ*, pET24a-*RibM* y pET24d-*TcPAT12* se utilizaron para inocular cultivos de LB con 50 μ g/ml kanamicina y riboflavina en exceso y se incubaron a 37 °C ON. Al día siguiente, los cultivos se cosecharon y lavaron con PBS estéril. Luego se estrieron 10 μ l de una solución de bacterias (DO₆₀₀: 0,025) en placas LB agar conteniendo 50 μ g/ml kanamicina, 0,1 mM IPTG y distintas concentraciones de riboflavina (0, 5 y 750 μ M), según se indica en cada pie de figura. Las placas se cultivaron 18 h a 37°C.

Para analizar el efecto de los cofactores FMN y FAD, los ensayos de complementación se realizaron en medio LB líquido. Para ello, colonias de *E. coli* Δ *ribB* transformadas con los plásmidos pET24a-vacío, pET24a-*TcRibJ*, pET24a-*TbRibJ*, pET24a-*LmiRibJ* y pET24a-*RibM* se utilizaron para

inocular cultivos de LB con 50 µg/ml kanamicina y riboflavina en exceso y se incubaron a 37 °C ON. Aproximadamente 2 ml de estos cultivos se cosecharon y lavaron con PBS y se utilizaron para inocular cultivos (2 ml con DO₆₀₀ inicial = 0,01) de LB fresco conteniendo 50 µg/ml kanamicina, 0,1 mM IPTG y distintas concentraciones de flavinas descritas en cada pie de figura. Estos cultivos se incubaron a 28 °C durante 18 h con agitación y el crecimiento se determinó a través de la medición de la DO₆₀₀.

Ensayos de transporte de riboflavina en *E. coli* Δ ribB expresando RibJ

Para estos ensayos, colonias de *E. coli* Δ ribB transformadas con los plásmidos pET24a-vacío, pET24a-TcRibJ, pET24a-TbRibJ y pET24a-RibM se utilizaron para inocular cultivos de LB con 50 µg/ml kanamicina y riboflavina en exceso y se incubaron a 37 °C ON. Al día siguiente, los cultivos se cosecharon y lavaron con PBS estéril y se tomaron alícuotas para inocular 100 ml de LB fresco con 50 µg/ml kanamicina, 0,1 mM IPTG a una DO₆₀₀inicial = 0,01. Estos cultivos se mantuvieron a 28 °C hasta que alcanzaron la fase logarítmica media (DO₆₀₀final = 0,8 - 1,2). Además, estos cultivos no fueron suplementados con riboflavina para disminuir los niveles intracelulares de flavinas.

Luego, las bacterias se cosecharon a 4000 rpm y los *pellets* se lavaron 3 veces con PBS conteniendo glucosa 1 mM (*buffer* de transporte). Los *pellets* se resuspendieron a una DO₆₀₀final = 5 en este mismo *buffer* y, previamente al ensayo, se mantuvieron durante 15 min a 37 °C.

El ensayo de transporte comenzó con el agregado de una solución 2 µM de ³H-riboflavina (actividad específica: 0,85 Ci/mmol); y la reacción se detuvo, a cada tiempo, tomando una alícuota (0,2 ml) y adicionándole 1 ml de *stop solution* (500 µM riboflavina no marcada en PBS, enfriada en hielo). Las bacterias se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 min y se lavaron 3 veces con 1 ml de *stop solution*. Finalmente, los *pellets* se resuspendieron en ~50 µl de líquido residual y se trasvasaron a 1 ml de líquido de centelleo UltimaGold XR (Packard Instrument Co., Meriden CT, USA). Los tiempos en los que se tomaron las alícuotas se detallan en cada pie de figura.

Desplazamiento del transporte de riboflavina en *E. coli* $\Delta ribB$

Los ensayos de desplazamiento se realizaron con las mismas bacterias anteriores, usando [^3H]-riboflavina a 0,3 μM (actividad específica: 6,2 Ci/mmol) y, en simultáneo, se agregó riboflavina fría a 3 μM y 30 μM . Las alícuotas se tomaron al tiempo 0 y 120 min.

Para el análisis de estos resultados, los valores obtenidos en el control (pET24a- vacío) -producto de un pegado inespecífico de riboflavina radioactiva a la superficie- fueron restados de los datos correspondientes a las otras transformantes.

Análisis de susceptibilidad a antibióticos en *E. coli* $\Delta ribB$ expresando RibJ

Para controlar que la permeabilidad de las membranas bacterianas no se viera afectada por la expresión de las proteínas transmembrana heterólogas, se realizaron ensayos de permeabilidad / toxicidad con drogas no relacionada con riboflavina, como el ácido nalidíxico y acriflavina, en dos tipos de medio: **a-** en medio sólido y **b-** en medio líquido.

a- Medio sólido: Para estos ensayos, las bacterias *E. coli* $\Delta ribB$ se cultivaron en medio LB líquido con exceso de riboflavina y 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamicina a 37 °C durante 18 h. Luego, se tomaron 200 μl como inóculo ($\text{DO}_{600} = 0,2$) y se sembraron en placas de LB agar, 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamicina, 0,1 mM IPTG y 750 μM riboflavina. Luego, pequeños discos de papel de filtro estériles se dispusieron en las placas, y sobre estos se agregó distintas concentraciones de ácido nalidíxico (100, 150, 200, 250, 300 y 350 $\mu\text{g/ml}$). Las placas se cultivaron 24 h a 37°C. Finalmente, las placas se tiñeron con una solución de 0,005 % cristal violeta para aumentar el contraste de las bacterias. La susceptibilidad al ácido nalidíxico se estimó midiendo el radio del halo de inhibición formado alrededor del disco de papel de filtro, y se determinó la concentración a partir de la cual se distinguía el halo.

b- Medio líquido: Por otra parte, se determinó la Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) de estas bacterias transformantes frente al ácido nalidíxico o acriflavina en medio líquido. Para ello, estas bacterias *E. coli* $\Delta ribB$ se incubaron en medio LB líquido con exceso de riboflavina y 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamicina a 37 °C durante 18 h. Luego se tomaron alícuotas ($\text{DO}_{600\text{inicial}} = 0,02$) para inocular 2 ml de medio LB fresco (exceso de riboflavina, 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamicina y 0,1 mM IPTG) conteniendo

distintas concentraciones de ácido nalidíxico (0 – 40 µg/ml) o acriflavina (0 – 250 µg/ml). Estos cultivos se incubaron a 37 °C durante 18 h. con agitación, donde el crecimiento se determinó a través de la medición de la DO₆₀₀.

Determinación de la expresión de RibJ en *E. coli* BL21 por Western blot

Obtención de extractos proteicos de *E. coli*

Para la preparación de los extractos proteicos se utilizaron bacterias *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pET24a vacío o expresando TcRibJ, TbRibJ o LmiRibJ en fusión con una secuencia “flag” de polihistidina en el extremo 3’ (Tabla MyM-2). Las bacterias se pre-cultivaron en 10 ml de medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/ml, ON a 37 °C. Al día siguiente, estos pre-cultivos se utilizaron para inocular 50 ml de LB fresco con kanamicina 50 µg/ml, partiendo de una DO₆₀₀ inicial = 0,1; y se incubaron a 37 °C, hasta que los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ = 0,5. Luego se adicionó el inductor IPTG a 0,5 mM y se incubaron a 28 °C durante 5 h. Luego, se cosecharon solamente 10 ml del cultivo y se resuspendieron en 500 µl de *cracking buffer* 1x (SDS 2 %, glicerol 6,6 % v/v, azul de bromofenol 0,01 %, Tris-HCl pH 6,8 0,02 M) suplementado con β-mercaptoetanol (dilución 1:5, v/v) y con urea 8 M. Finalmente, las muestras se incubaron a 98 °C durante 30 min.

Para cada ensayo se sembraron 35 µl de extracto/*well*.

Electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia

Para cada gel de poliacrilamida, la región separadora se preparó al 12% final, con 4 ml de la solución de monómero (29.2 % acrilamida y 0,8 % bis-acrilamida), *buffer* de separación (Tris-HCl pH 8,8 0,375 M), SDS 1 %, APS 1 % y TEMED 0,05 % (v/v) y agua hasta alcanzar 10 ml. La región concentradora se preparó con 0,44 ml de solución de monómero, *buffer* de separación (Tris-HCl pH 6,8 0,125 M), SDS 1 %, APS 0,05 % y TEMED 0,075 % (v/v), y se llevó a 3,3 ml con agua.

La separación se realizó con *buffer* TANK 1x (Tris 0,3 %, Glicina 1,44 %, SDS 0,1 %), durante 2 h a 120 V.

Se realizó una transferencia húmeda utilizando membrana de *blotting* PVDF (GE Healthcare Life Sciences) con TRANSFER *buffer* 1x (Tris 0,3 %, Glicina 1,5 %) en metanol 20 %, a 90 V durante 1,5 h a 4 °C. Luego, la membrana de PVDF se bloqueó en PBS-leche 5 %, a 4 °C, ON.

Revelado de *Western blot*

Luego del bloqueo, se lavó con PBS-tween 20 a 0,05 % (v/v) durante 5 min, a temperatura ambiente, 3 veces. Como anticuerpo primario monoclonal se utilizó anti-polihistidina obtenido en ratón (Sigma), disuelto en una relación 1:3000 en PBS-BSA 1 %. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS-tween 20 a 0,05 %. El anticuerpo secundario policlonal fue anti-IgG de ratón hecho en conejo, fusionado a peroxidasa de rabanito (HRP). La incubación se realizó durante 2 h a temperatura ambiente; y luego se lavó con PBS-tween 20 a 0,05 % (v/v), 3 veces.

El revelado se realizó con el reactivo SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante; y se utilizó el equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences), utilizando el *software* provisto por el fabricante (ImageQuant LAS 4000 Control Software).

Preparación de cepas transgénicas de *T. cruzi*

Purificación de ADN plasmídico

Para transfectar parásitos, el primer paso consistió en obtener masa suficiente de los vectores recombinantes de interés mediante minipreps a partir de las colonias de *E. coli* DH5 α portadoras de dichos vectores. Para ello, las bacterias fueron inoculadas en 10 ml de medio LB con el correspondiente antibiótico de selección y se incubó a 37 °C ON con agitación. Al día siguiente, se cosecharon centrifugando a 13000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El *pellet* se resuspendió en 400 μ l de *buffer* P1 (50 mM Glucosa, 25 mM Tris HCl pH 8,00, 10 mM EDTA pH 8,00) y se dividió en dos tubos *ependorfs*. Luego se agregó 300 μ l de *buffer* P2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) y mezcló suavemente por inversión. La neutralización se realizó con el agregado de 300 μ l de *buffer* P3 (3 M Acetato de Potasio pH 4,80), y nuevamente se mezcló por inversión. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad (13000 rpm) por 10 min a 4 °C, para separar los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a tubos *ependorfs* nuevos, y se agregó 2 μ l de una solución de RNasa 10 mg/ml por tubo (concentración final: ~20 μ g/ml). La reacción se incubó a 37 °C durante 20 min. El sobrenadante se extrajo 2 veces con 400 μ l de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1. En cada extracción, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min, para separar la fase acuosa (superior) de la orgánica (inferior). La fase acuosa se trasvasó a *ependorfs* nuevos. La precipitación del plásmido se realizó con un volumen de isopropanol (~700 μ l), se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó, mientras el *pellet* se lavó con 500 μ l de etanol 70%. Nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 4 °C. Luego de descartar el sobrenadante, se dejó evaporar el líquido residual. Finalmente el *pellet* se resuspendió en 25 μ l de *buffer* TE y se congeló -80 °C, al menos, por un día.

Antes de la electroporación, los plásmidos se incubaron a 80 °C durante 10 min. El rendimiento de ADN plasmídico siguiendo este protocolo es cercana a los 50 μ g.

Preparación de epimastigotes de *T. cruzi* electrocompetentes y electroporación

Los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa MJ Levin cultivaron en medio BHT suplementado hasta alcanzar la fase logarítmica media. Los parásitos se cosecharon y lavaron con PBS; se

resuspendieron en 350 μ l de PBS conteniendo 0,5 mM de $MgCl_2$ y 0,1 mM $CaCl_2$ y se incubaron con 50 μ g de plásmido. En el caso de la cepa MJ Levin se incubaron con el vector recombinante pRIBOTEX-*TcRibJ* o pRIBOTEX-GFP.

La electroporación se llevó a cabo en cubetas de 0,2 cm de *gap* (BioRad Laboratories), aplicando un único pulso de 400 V y 500 μ Fa, con una constante de tiempo $\sim$ 5 ms.

Luego del pulso eléctrico, los epimastigotes se cultivaron a 28 °C en BHT suplementado, y al día siguiente se agregó 250 μ g/ml de G418 para la cepa MJ Levin.

La cepa MJ Levin-GFP (transfectada con el vector pRIBOTEX-GFP) se utilizó como control de la cepa MJ Levin-*TcRibJ* pues presentan un mismo *background* genético y un perfil transcripcional similar de sobre-expresión y resistencia a G418.

Verificación de epimastigotes de *T. cruzi* MJ-Levin sobre-expresando *TcRibJ*

Determinación de la presencia de *TcRibJ* por *Southern blot*

Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

El ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa MJ Levin transfectada con pRIBOTEX-GFP o pRIBOTEX-*TcRibJ* se extrajo tal como se explicó anteriormente. Luego de su cuantificación, 10 μ g de ADN genómico se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI o BamHI y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0,9 %, a 70 V en *buffer* TBE (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA) 0,5x durante 4 h. Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel se trató con una solución de HCl 0,25 M durante 30 min, se enjuagó con agua y se neutralizó con solución de NaOH 0,4 M durante 30 min con agitación. La transferencia del ADN se realizó en esta misma solución ON a temperatura ambiente. Para ello, se construyó un sistema de transferencia a membrana de nylon (Hybond N+, Amersham, previamente activada con agua bidestilada) por capilaridad con papeles Whatman (Green & Sambrook 2012). Al día siguiente se retiraron los papeles absorbentes superiores y se marcó la posición de siembra en la membrana, y se lavó con agua bidestilada para remover las trazas de NaOH.

Preparación de la sonda de ^{32}P -ADN

La preparación de la sonda radioactiva se realizó por PCR, en donde se usó la enzima Taq DNA polimerasa siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de los deoxi-nucleótidos dATP,

dGTP y dTTP se agregaron a una concentración final de 0,25 mM, mientras la concentración de dCTP no radioactivo fue de 0,6 μ M. Además se incorporaron 5 μ l de 32 P-dCTP (50 μ Ci), siendo el volumen final de reacción = 50 μ l. Los *primers* utilizados fueron F-EcoRI-TcRibJ y R-HindIII-TcRibJ (**Tabla MyM-3**) y como molde se agregó 1 ng de plásmido pRIBOTEX-TcRibJ.

El programa de PCR fue: 94°C 5 min, 30 ciclos de (94 °C - 45 s, 58 °C - 35 s, 72 °C - 5:00 min) y 72 °C 2 min.

Para evaluar la eficiencia de marcación, antes de purificar la sonda, se separó una alícuota de 0,5 μ l de la reacción que se llevó, con agua, a un volumen final de 100 μ l. A la mitad de este volumen (50 μ l) se le agregó 1 ml de líquido de centelleo UltimaGold XR (Packard Instrument Co., Meriden CT, USA) y se midió la radioactividad total (referenciada como TOTAL*).

La purificación de la sonda se llevó a cabo con ilustra MicroSpin G25 columns (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Nuevamente se tomaron 0,5 μ l de la sonda pura, se llevó a 100 μ l con agua y se midió su radioactividad tal como se describió anteriormente (referenciada como INCORPORADA*).

De esta manera, se determinó el porcentaje de incorporación del radioactivo = (radioactividad INCORPORADA / radioactividad TOTAL) x 100% (idealmente debería ser de al menos el 60 %).

Hibridación de la membrana de nylon conteniendo el ADN genómico

Primero se llevó a cabo la pre-hibridación; para ello, la membrana de nylon se colocó en el tubo de pre/hibridación y se agregaron 2 - 4 ml de la solución SuperHyb (previamente homogeneizada a 42 °C) conteniendo ADN de espermatozoos de salmón. Este paso se realizó durante 3 h a 45 °C.

Luego de este período, se llevó a cabo la hibridación por agregado de la sonda radioactiva (previamente desnaturalizada a 95°C por 10 min), y se dejó incubando a 45 °C ON.

Al día siguiente, la membrana de nylon hibridada se lavó 6 veces con *buffer* SSC 1x (Na₃Citrato 15 mM/ NaCl 150 mM) – 0,1 % SDS a temperatura ambiente durante 5 min; posteriormente, se lavó otras 4 veces con *buffer* SSC 0,1x (Na₃Citrato 1,5 mM/ NaCl 15 mM) – 0,1 % SDS a 55 °C por 10 min. Finalmente, la membrana de nylon se escurrió, se envolvió en papel film y se expuso sobre Storage Phosphor Screen (GE Healthcare) ON. El resultado se observó usando el equipo Storm Image and Detection system (Molecular Dynamics).

Determinación de la presencia de *TcRibJ* por PCR semi-cuantitativa

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando distintas cantidades de ADN genómico (100 ng, 10 ng, 1 ng y 0,1 ng) de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa MJ-Levin transfectada con pRIBOTEX-GFP y pRIBOTEX-*TcRibJ*. Para ello se utilizaron los *primers* F-EcoRI-*TcRibJ* y R-HindIII-*TcRibJ* (**Tabla MyM-3**), utilizando la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de la expresión de *TcRibJ* por RT-PCR semi-cuantitativa

Cultivos de epimastigotes de parásitos de *T. cruzi* (MJ Levin-GFP y MJ Levin-*TcRibJ*) en la fase logarítmica se cosecharon y el ARN se extrajo con el reactivo Trizol® de Invitrogen de acuerdo a sus instrucciones. Para eliminar los restos de ADN genómico contaminante, las muestras se trataron con DNasa RQ1 de Promega siguiendo sus instrucciones. Finalmente, la concentración de ARN se cuantificó por NanoDrop 2000 y, para evaluar su integridad, una alícuota del ARN obtenido se trató con formamida y calor y se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1 %.

La reacción de retrotranscripción se realizó con la enzima retrotranscriptasa reversa M-MLV de Promega (siguiendo sus instrucciones), *primers* hexaméricos diseñados al azar (Promega) y 2 µg de ARN como templado.

Finalmente, se realizaron 2 reacciones de PCR: una específica para *TcRibJ* (*primers*: F-EcoRI-*TcRibJ* y R-HindIII-*TcRibJ*, **Tabla MyM-3**) y otra para ARNr de la subunidad 18S, como control de carga. El programa de PCR en ambos casos fue: 2 min a 94 °C / 30 ciclos de: 45 s a 94 °C, 35 s a 58 °C, 1:45 min a 72 °C / 2 min a 72 °C. Los productos se sometieron a corrida electroforética en geles de agarosa 1 % y los resultados se observaron por transiluminador con luz UV.

Cuantificación de flavinas intracelulares en epimastigotes de *T. cruzi*

Preparación de los extractos de epimastigotes de *T. cruzi*

Epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa Y, cultivados en medio BHT suplementado con SFB 10 % fueron cosechados en fase logarítmica (30 -40 millones/ml) por centrifugación a 3000 rpm, 10 min a temperatura ambiente. El *pellet* de parásitos se lavó 3 veces con PBS y, a partir de ese

momento, se siguió el protocolo establecido por Hühner et al. (Hühner et al. 2015). Brevemente, los parásitos se resuspendieron en 1 ml de metanol/cloruro de metileno (9:10, v/v), y se agitó vigorosamente durante 1 min a temperatura ambiente. Luego se neutralizó con 0,45 ml de una solución 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, mezclando vigorosamente durante 1 min. Finalmente, se centrifugó a 13000 rpm por 20 min a 4 °C. Se tomó la fase acuosa (aproximadamente 0,4 ml) y se congeló a -80 °C. Al día siguiente, las muestras se liofilizaron ON y se resuspendieron en 150 µl de solución A (10 mM KH_2PO_4 y 15 mM de acetato de magnesio ajustado a pH: 3,4 con ácido ortofosfórico). Este mecanismo de extracción tiene la particularidad que permite extraer flavinas libres o fuertemente unidas a proteínas de manera no-covalente (Hühner et al. 2015).

Antes de cada corrida, las muestras se filtraron por centrifugación en tubos eppendorf de 2 ml conteniendo filtros de 0,2 µM.

Separación de flavinas por HPLC

Para esta separación se siguió el protocolo de HPLC establecido por Capo-chichi et al. (Capo-Chichi et al. 2000). Brevemente, se utilizó como fase móvil una mezcla de 85 % de solución A y 15 % de acetonitrilo. Esta solución se filtró con membranas de 0,45 µM y se desgaseó en vacío. Las corridas se hicieron de manera isocrática, durante 20 min con un flujo de 0,8 ml/min y a temperatura ambiente. Se utilizó una columna de fase reversa C18 (Luna, 5 µM, 250 mm x 4 mm) montada en un equipo Agilent Technologies 1200 Series (Santa Clara, CA, USA) conectado a un detector de fluorescencia FLD G1321A.

Para la curva de calibración y la estimación de los tiempos de retención de cada flavina se corrieron distintas cantidades de estándares disueltos en la solución A (20, 40, 200, 400 y 800 pmoles).

La concentración de cada flavina en los estándares y en las muestras se determinó por fluorescencia, excitando a 445 nm y midiendo la emisión a 530 nm.

Los diferentes cromatogramas se visualizaron con el software Agilent Ezchrom Elite.

Ensayos de Transporte de Riboflavina en Tripanosomátidos

Preparación de los cultivos y medición del transporte de riboflavina en epimastigotes de *T. cruzi*

Los ensayos de transporte de riboflavina fueron realizados utilizando [^3H]-riboflavina radioactiva (6.2 Ci/mmol) (Movarek Biochemicals Inc.). Brevemente, los parásitos fueron pre-cultivados hasta la fase estacionaria en medio BHT o SDM20 suplementado, según se indica en el pie de figura. Luego se cosecharon y resuspendieron en medio SDM20 suplementado fresco y se incubaron a 28 °C hasta la fase logarítmica media. Después se cosecharon, lavaron con PBS - glucosa 2 %, se resuspendieron en este mismo *buffer* e incubaron a 28 °C durante 3 h para hambrearlos. Finalmente, los parásitos fueron cosechados y resuspendidos en PBS - glucosa 2 % en una densidad entre 300 - 400 millones de parásitos/ml (30 - 40 millones de parásitos/tubo), y se mantuvieron a 37 °C durante 15 min. El ensayo de transporte comenzó con el agregado de la solución conteniendo ^3H -riboflavina radioactiva. La concentración final y la actividad específica de la ^3H -riboflavina así como el tiempo de ensayo de cada alícuota se detallan en los pies de figura.

Para cada punto se tomaron alícuotas de 0,1 ml de parásitos y se agregó 1 ml de *stop solution* (PBS con 500 μM de riboflavina, mantenido en hielo), con el fin de detener el transporte. Los parásitos se centrifugaron 1 min a 13000 rpm y los *pellets* se lavaron 3 veces con 1 ml de *stop solution*. Finalmente, se resuspendieron en el líquido residual y se agregó 1 ml de líquido de centelleo UltimaGold XR (Packard Instrument Co., Meridien CT, USA).

Los parámetros cinéticos (K_m aparente y Velocidad máxima - $V_{\text{máx}}$) fueron determinados con el programa GraphPad Prism 6, mediante un ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.

Ensayos de desplazamiento del transporte de riboflavina en *T. cruzi*

Los ensayos de desplazamiento del transporte de riboflavina en *T. cruzi* fueron realizados con ^3H -riboflavina radioactiva a 0,3 μM (actividad específica: 6.2 Ci/mmol) (concentración cercana a la K_m aparente de riboflavina estimada en este trabajo), y a la vez se agregaron flavinas, análogos de riboflavina, o acriflavina, o las drogas daunomicina y doxorubicina, en una concentración 10 y 100 veces mayor a la de la ^3H -riboflavina usada.

Ensayos de metaciclologénesis

Epimastigotes de la cepa Y- GFP se cultivaron en medio SDM20 con riboflavina 20 nM o 300 nM, según se indica, durante 7 días. Luego, se cosecharon y se resuspendieron (25 millones de parásitos en 50 µl para cada tratamiento) en medio TAU base (por "*Triatomine Artificial Urine*", *buffer* fosfato 8 mM pH 6.0, 190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂) para iniciar la inducción a metaciclologénesis y se incubaron 2 h a 37°C. Luego, cada alícuota de 25 millones de parásitos se incubó a 28°C por 48 h en 3 ml de medio TAU modificado (TAU base suplementado con 10 mM L- prolina, 50 mM L- glutamato de sodio, 2 mM L- aspartato de sodio y 10 mM D- glucosa). Cuando se indica, se agregó riboflavina, FMN o FAD o bien los análogos lumiflavina, lumicromo, roseoflavina, o las drogas daunomicina y doxorubicina. La concentración de los solventes - DMSO o agua - fue del 2 %, tanto en los cultivos ensayados como en los controles correspondientes sin droga.

Finalizado este período, se cosecharon y resuspendieron en suero humano fresco (que por su actividad de Complemento lisa los epimastigotes) y se cuantificaron los tripomastigotes metacíclicos obtenidos por recuento en cámara de Neubauer (Ferreira et al. 2004).

Sobrevida de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*

Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo de trabajo de la Dra. Catalina Alba Soto y de la Dra. María Laura Sbaraglini, en el Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPam), Facultad de Medicina, UBA-CONICET.

Los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* de la cepa RA, se obtuvieron de ratones BALBc infectados, en el máximo de parasitemia, purificándose de sangre periférica. Se sembraron 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos por *well* en placa de 96 *wells*, en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% SFB y en presencia o ausencia (control) de análogos de riboflavina. Finalmente los cultivos se incubaron a 37 °C ON. Luego, los parásitos móviles se cuantificaron en cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron como el número de tripomastigotes sanguíneos viables ($\times 10^4$ parásitos/ml).

Ensayos sobre monocapa de células H9C2

Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo de trabajo de la Dra. Patricia Romano, junto con la Dra. María Cristina Vanrell, en el Instituto de Histología y Embriología Animal (IHEM), Universidad Nacional de Cuyo – CONICET, Mendoza.

Para los ensayos de infectividad se usaron tripomastigotes derivados de tejidos (TCT, *Tissue Culture Trypomastigotes*) de la cepa Y-GFP, obtenidos de células VERO (línea celular derivada de riñón de mono africano). El mantenimiento de este co-cultivo se realizó en medio D-MEM de alta glucosa (Invitrogen) - 3% suero.

Infectividad y Replicación intracelular de amastigotes

Antes del paso de infectividad propiamente dicho, parásitos TCTs se preincubaron 30 minutos a 37°C en medio D-MEM – 10 % suero, en ausencia/presencia de los análogos o de las drogas daunomicina y doxorubicina. El control se hizo con 1 % DMSO.

Por otro parte, se cultivaron células H9C2 (provenientes de tejido muscular cardíaco de rata) en medio D-MEM de alta glucosa - 10 % suero fetal bovino. Para la infección, estas células se inocularon con los TCTs pre-tratados y se incubaron por 12 h a 37°C (se utilizaron 50.000 células/tratamiento, de manera tal de obtener un MOI = 10). Finalizado este tiempo de infección, se removió el sobrenadante, se lavó con PBS y se adicionó medio fresco D-MEM - 3 % suero conteniendo los análogos a la misma concentración anterior. De esta manera, se descartaron a aquellos TCTs que no hubieran ingresado a alguna célula hospedadora durante este lapso.

Finalmente, se incubó por 48 h a 37°C y se fijó con 4% para-formaldehído por 10 min a temperatura ambiente. Luego, se bloqueó con 50 mM NH₄Cl en PBS y, subsecuentemente, se permeabilizó con 0,05% saponina en PBS - 0,5% BSA. El citoesqueleto de actina de las células H9C2 se tiñó con rodamina-faloidina y los parásitos se visualizaron por la expresión de GFP (Barclay et al. 2011). El montaje se realizó con Mobicol sin DAPI. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Nikon C1 y el análisis se realizó con el programa ImageJ. En cada campo fotografiado se contabilizó el porcentaje de células infectadas y la cantidad de amastigotes por célula H9C2

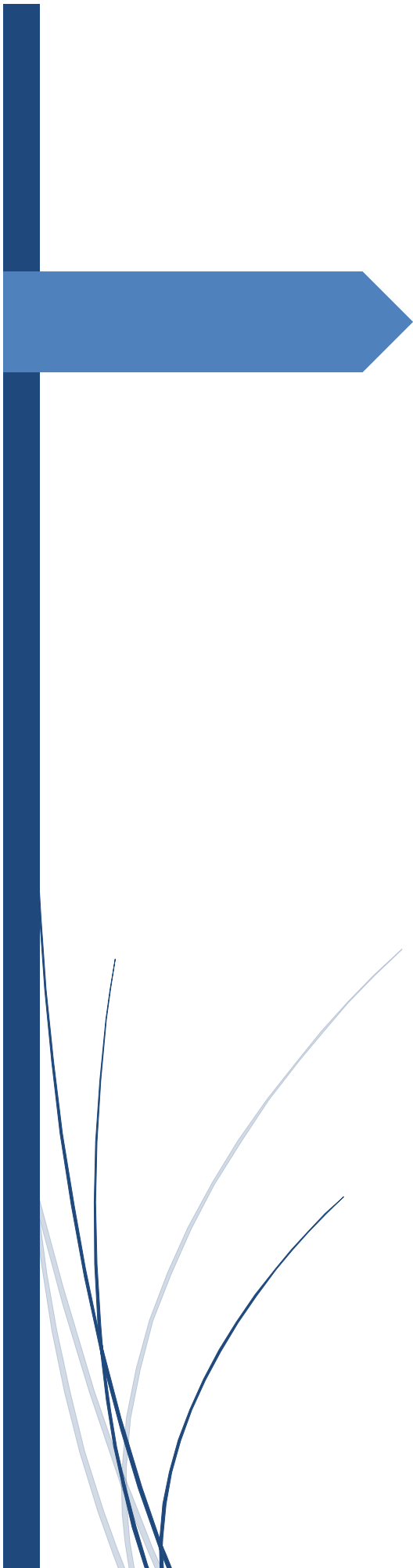
infectada, parámetros que indican la capacidad de ingresar a la célula y la capacidad de proliferar dentro de ella, respectivamente.

Cabe aclarar que en estos experimentos se utilizó suero al 3% para limitar la proliferación de las células hospedadoras, lo que favoreció el seguimiento del proceso de infección y proliferación intracelular del parásito (Barclay et al. 2011).

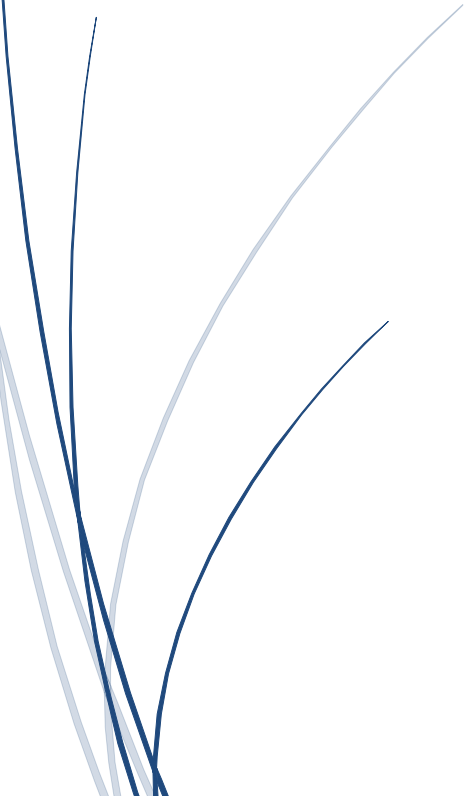
Toxicidad de los análogos de riboflavina sobre las células H9C2

Para determinar posibles efectos tóxicos de los análogos sobre las células hospedadoras H9C2, se utilizó el sistema de Alamar Blue®, en donde la viabilidad correlaciona positivamente con los niveles de la actividad reductora de la célula.

Para el ensayo se utilizaron 5.000 células H9C2/tratamiento en medio 3% D-MEM, a las cuales se agregó cada análogo a la misma concentración de los ensayos anteriores de infectividad y replicación de amastigotes y se adicionó Alamar Blue®. Las células se incubaron 24 h a 37°C y se midió la absorbancia a 530 nm.



RESULTADOS



Flavinas y potencial flavoproteoma de tripanosomátidos

Si bien se han descripto varias flavoenzimas importantes en tripanosomátidos, aún se desconoce su flavoproteoma y, por ende, el grado de relevancia de las flavinas en estos parásitos. Como primera aproximación, se decidió analizar las flavoproteínas inferidas en los genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana* utilizando las bases de datos de tripanosomátidos TriTrypDB. En el genoma de *T. cruzi* se detectaron 56 potenciales flavoproteínas, representando un 0,54 % del total de proteínas estimadas (**Figura R-1A**). La mayor cantidad de flavoproteínas estuvo relacionada con funciones desconocidas y con las vías biosintéticas de ergosterol seguido de diversas vías esenciales para el parásito, incluyendo la obtención de energía, de nutrientes e involucradas en la integridad del ADN y en la expresión génica.

En *T. brucei* y *L. mexicana* el número de flavoproteínas, y el porcentaje respecto del total, resultaron similares a las de *T. cruzi*, encontrándose un 64 flavoproteínas (0,58 %) y 67 flavoproteínas (0,81 %), respectivamente. Además, se registraron leves diferencias entre sí. Una de ellas radicó en la capacidad de síntesis de aminoácidos (metionina), que está solamente presente en diversas especies de *Leishmania* (Vickers et al. 2006; Alcolea et al. 2016). La otra diferencia consistió en la presencia de una proteína asociada al citoesqueleto con dominios de unión a FAD que se detectó solamente en *T. cruzi* y *L. mexicana*. Estos resultados sugieren que las flavinas cumplen varios papeles en los tripanosomátidos que podrían estar asociados con el estilo de vida parasitario (ver discusión).

A partir de estas evidencias de roles metabólicos de flavoproteínas en tripanosomátidos se decidió evaluar los niveles intracelulares de flavinas. Para ello, se realizaron ensayos de separación y cuantificación por cromatografía en alta presión (HPLC). Las primeras corridas de HPLC se realizaron con soluciones estándar de flavinas para determinar los tiempos de retención para FAD ($5,14 \pm 0,10$ min), FMN ($6,64 \pm 0,03$ min) y riboflavina ($11,06 \pm 0,03$ min) bajo nuestras condiciones de ensayo así como la curva de calibración de concentración vs. área para cada una de las flavinas (R^2 : 0,99) (se grafica un cromatograma representativo en la **Figura R-1B**). Se estimó que la concentración de flavinas era de $0,45 \pm 0,11$, $0,35 \pm 0,14$ y $0,23 \pm 0,17$ fmoles/ 10^6 parásitos para FAD, FMM y riboflavina, respectivamente (**Figura R-1C**). Estos resultados confirman la presencia de flavinas en los epimastigotes de *T. cruzi*.

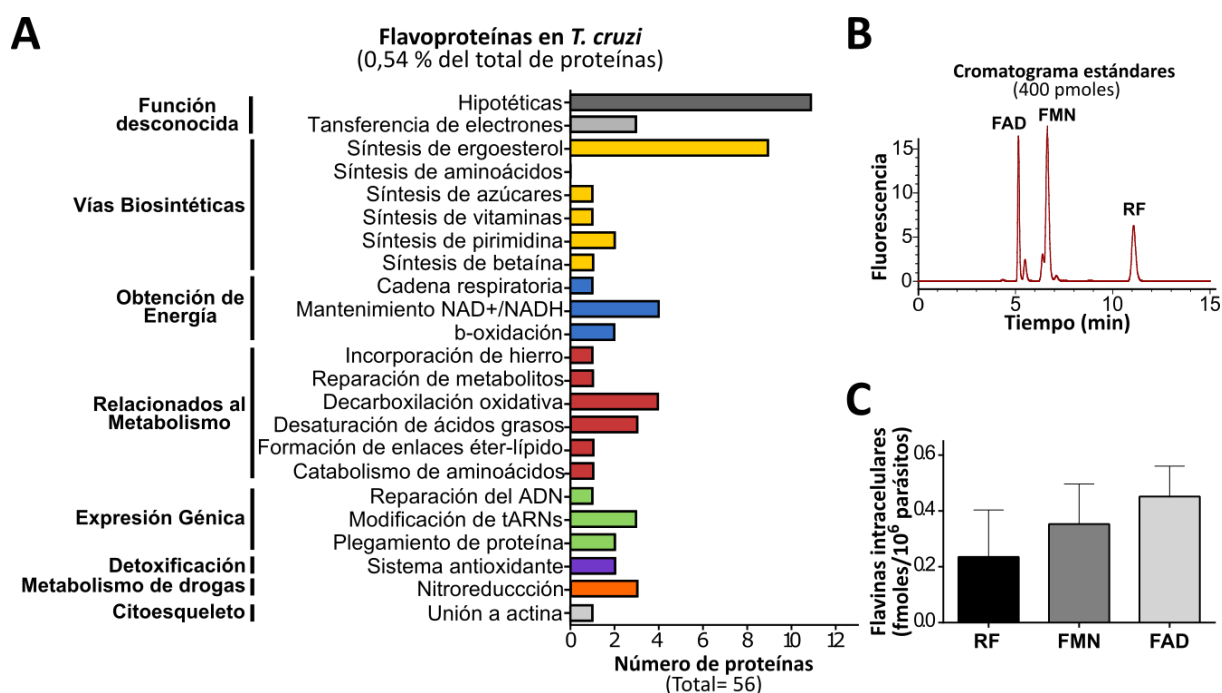


Figura R-1. Representación del flavoproteoma y estimación de la concentración intracelular de flavinas en epimastigotes de *T. cruzi*. A) Flavoproteoma estimado de *T. cruzi* a través de la base de datos TriTrypDB. B) Representación del cromatograma obtenido con los estándares de flavinas (400 pmoles de cada uno), medidos por fluorescencia: λ de excitación a 445 nm y λ de emisión a 530 nm. C) Cuantificación de las flavinas intracelulares de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y-GFP, previamente cultivados en medio BHT suplementado con SFB 10 %.

Flavinas: efectos en la proliferación de tripanosomátidos

Luego de identificar bioinformáticamente flavoproteínas con posibles funciones esenciales en tripanosomátidos y habiendo detectado concentraciones de flavinas intracelulares, comenzamos a estudiar el posible rol de riboflavina y otras moléculas relacionadas (derivados y análogos) en los parásitos mediante el estudio de proliferación de cultivos en medio axénico.

El cultivo axénico de tripanosomátidos permite, de modo relativamente sencillo y eficiente, conservar a los parásitos a lo largo del tiempo, en tanto material de estudio. Por otro lado, permite evaluar el efecto de diversas condiciones y compuestos sobre el estado proliferativo del cultivo. Existen dos criterios de evaluación, habitualmente complementarios, que se utilizan como parámetros cinéticos para caracterizar la proliferación:

a)- densidad máxima: número máximo de parásitos/ml alcanzado en estado estacionario temprano.

b)- tiempo de duplicación: indica velocidad de replicación del cultivo en estado logarítmico.

Durante el desarrollo del trabajo, el tiempo de duplicación resultó muy variable entre un ensayo y otro por lo que este parámetro se consideró, en todo caso, para comparar cualitativamente curvas intra-ensayo. Mientras nos centramos en el análisis de densidad máxima, cuyos valores fueron altamente reproducibles, para los estudios comparativos de distintas condiciones y tratamientos, a lo largo de la tesis.

Efecto de las flavinas en la proliferación de *T. cruzi*

Con el fin de determinar si las flavinas afectan la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, se cultivaron parásitos de la cepa Y-GFP en medio SDM20 con concentraciones crecientes de riboflavina (**Figura R-2**). Al analizar las curvas de crecimiento de los epimastigotes, se observó que el aumento en la disponibilidad de la vitamina producía un aumento tanto en la velocidad de replicación (pendiente de las curvas) como en la densidad máxima de los cultivos, alcanzándose un máximo a 300 nM de riboflavina. A concentraciones mayores de la vitamina (600 nM), la densidad máxima del cultivo se reducía a valores similares, o incluso inferiores, a los de la curva control (20 nM) (**Figura R-2A y B**).

Este efecto proliferativo dependiente de la concentración de riboflavina es especialmente notorio a partir del quinto día, tiempo en el que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria temprana. De esta manera, a bajas concentraciones de vitamina (control a 20 nM y a 40 nM), los cultivos alcanzaron una densidad de $54,5 \pm 2,5 \times 10^6$ parásitos/ml. A concentraciones mayores, 100 nM y 300 nM, se vio un aumento progresivo en la proliferación alcanzando una densidad de $72,6 \pm 5,6$ y $92,3 \pm 4,0 \times 10^6$ parásitos/ml, respectivamente (50,3 y 74,2 % más respecto de la condición control). A 600 nM de riboflavina la densidad máxima alcanzada por el cultivo fue de $35,2 \pm 1,6 \times 10^6$ parásitos/ml (33,6 % menos respecto de la condición control) (**Figura R-2C**).

Estos resultados de densidad al quinto día de cultivo indican que la riboflavina es un metabolito importante para la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi*, y su disponibilidad efectivamente influye en el crecimiento, mostrando un efecto estimulante dentro de un rango acotado de concentraciones (20 nM - 300 nM).

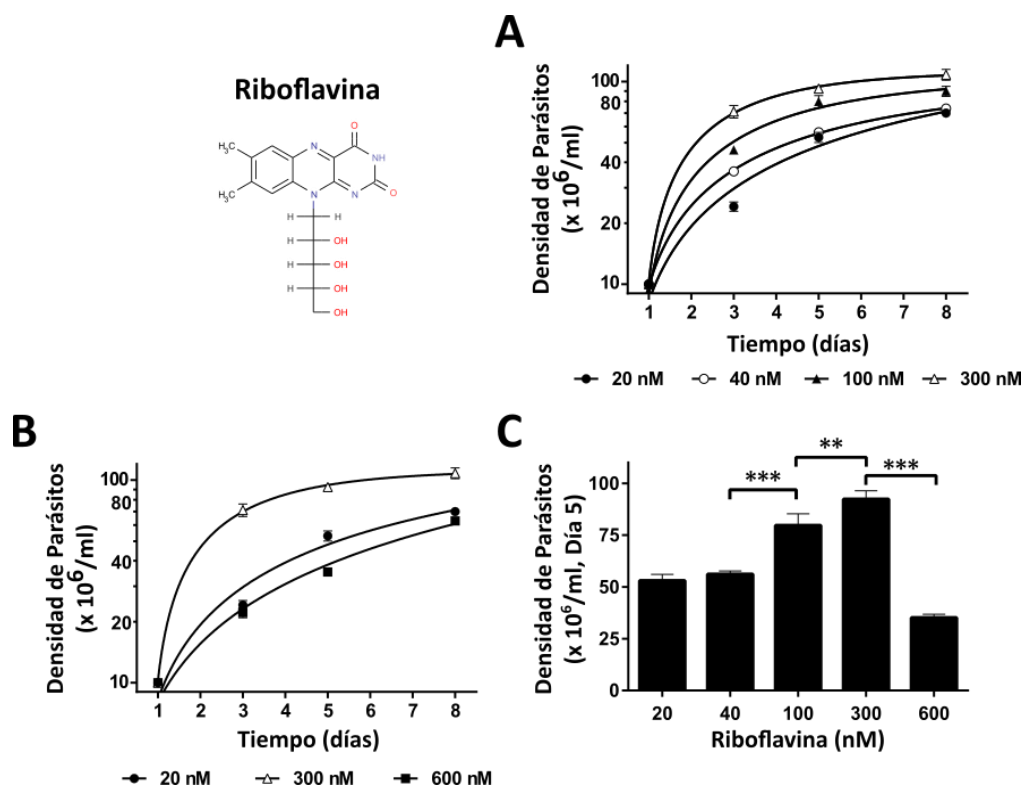


Figura R-2. La riboflavina estimula la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. A-B) Curvas de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y-GFP cultivados en medio SDM20 con concentraciones crecientes de riboflavina (20, 40, 100, 300 y 600 nM). El eje Y se encuentra en escala logarítmica. C) Análisis de densidad de parásitos al quinto día de cultivo, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

El efecto nocivo de un metabolito esencial cuando está en exceso ya ha sido observado en otros casos, tanto en nuestro laboratorio (concentraciones de putrescina mayores a 1 mM –resultados no publicados) como por otros grupos (nicotinamida mostró una $LC_{50} \sim 37 \mu\text{M}$ para epimastigotes de *T. cruzi* (Soares et al. 2012)).

Considerando que varios organismos han mostrado ser capaces de crecer utilizando las flavinas FMN y FAD (García Angulo et al. 2013), se analizó si la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y-GFP) se veía modificada por la presencia de los cofactores FMN y FAD (**Figura R-3**). Para ello, los parásitos se cultivaron en medio SDM20 con FMN o FAD, a 20, 40, 100, 300 y 600 nM (y una concentración residual de riboflavina de 20 nM).

Observamos que cultivos en algunas condiciones (por ejemplo a 300 y 600 nM) alcanzaban la fase estacionaria temprana al quinto día mientras que en otras condiciones la fase estacionaria era alcanzada al octavo día, con valores de densidad máxima de $81,3 \pm 1,2$ y $70,0 \pm 2,0 \times 10^6$ parásitos/ml para 40 nM de FMN y FAD, respectivamente (37,9 % y 18,0 % más respecto de sus correspondientes controles) (**Figura R-3A y B** - se graficaron solamente las curvas de crecimiento a 20 nM, 300 nM y 600 nM de cada flavina, para una mejor visualización de los resultados). El efecto de FMN y FAD fue levemente menor y algo posterior al presentado por riboflavina.

Para unificar el tiempo de cultivo al cuál analizar los resultados de las curvas de proliferación en presencia de las flavinas, seleccionamos el quinto día, donde los cultivos alcanzaban la fase estacionaria temprana o bien estaban por alcanzarla (estadío de fase logarítmica tardía). En ese punto, aumentando la concentración de FMN de 20 a 40 nM se observó un aumento pequeño pero significativo (16,2 %) en la densidad del cultivo (de $38,2 \pm 1,0$ a $44,3 \pm 1,3 \times 10^6$ parásitos/ml con FMN a 20 nM y 40 nM, respectivamente). Estos valores se mantuvieron hasta los 300 nM de FMN; pero al aumentar la concentración a 600 nM, la densidad de los cultivos decayó a niveles similares a los del control ($33,7 \pm 2,6 \times 10^6$ parásitos/ml) (**Figura R-3C**).

Con respecto a FAD, y a diferencia de los casos anteriores, los cultivos mostraron un mayor crecimiento que el control recién a 100 nM ($36,0 \pm 3,0$ y $47,3 \pm 2,1 \times 10^6$ parásitos/ml a 20 nM y 100 nM, respectivamente), y la tendencia se mantuvo hasta los 600 nM, donde se registró el mayor valor de densidad ($59,2 \pm 1,3 \times 10^6$ parásitos/ml) (**Figura R-3D**).

De esta manera, las flavinas -particularmente riboflavina- resultaron un suplemento que estimula la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (**Figura R-2 y Figura R-3**).

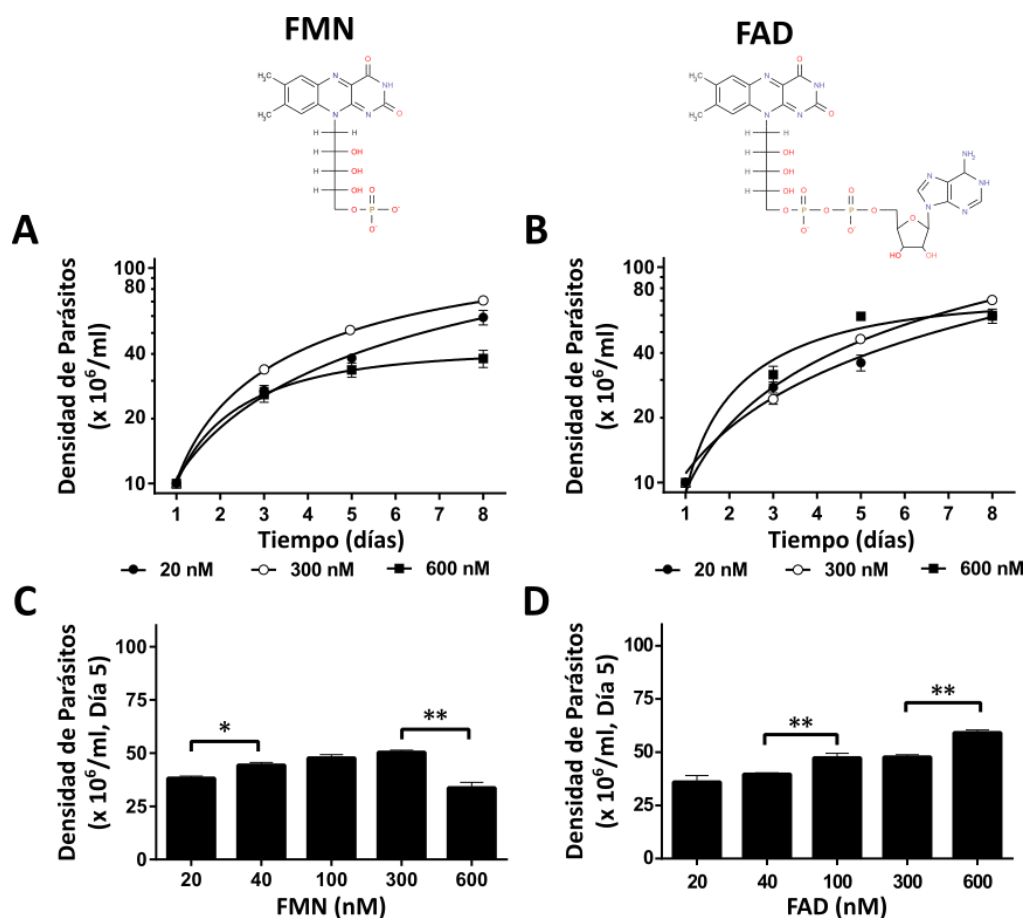


Figura R-3. Los cofactores FMN y FAD estimulan la proliferación de *T. cruzi*. En el panel superior se muestra una representación de los cofactores FMN y FAD. A-B) Curvas de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y-GFP cultivados en medio SDM20 con concentraciones crecientes de FMN o FAD (20, 40, 100, 300 y 600 nM; sólo se graficaron las concentraciones de 40, 300 y 600 nM para facilitar la visualización de los resultados). El eje Y se encuentra en escala logarítmica. C-D) Análisis de densidad de parásitos ($\times 10^6/\text{ml}$) al quinto día de cultivo a distintas concentraciones de FMN o FAD, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Efecto de flavinas en la proliferación de parásitos patógenos de humanos relacionados a *T. cruzi*

Con el objetivo de extender el análisis del efecto de las flavinas sobre la proliferación de otros tripanosomátidos, se estudió el crecimiento de los patógenos humanos *T. brucei* y *L. mexicana*.

Trypanosoma brucei

En el caso de *T. brucei*, se cultivaron tripomastigotes procíclicos en medio SDM20 con distintas concentraciones de flavinas, y se evaluó la densidad de los cultivos durante varios días. Al analizar

la densidad obtenida al quinto día de cultivo, se observó un incremento del 137 % en el número de parásitos con 100 nM de riboflavina ($15,3 \pm 0,8$ y $36,2 \pm 3,8 \times 10^6$ parásitos/ml con 20 nM y 100 nM de riboflavina, respectivamente) (**Figura R-4A y B**). Esta tendencia se sostuvo hasta los 300 nM de riboflavina, en donde se registró la máxima densidad ($42,0 \pm 2,2 \times 10^6$ parásitos/ml). Sin embargo, al elevar la concentración de vitamina a 600 nM, la cantidad de parásitos decayó levemente, pero se mantuvo superior a la condición control ($34,2 \pm 2,1 \times 10^6$ parásitos/ml).

Con FMN, *T. brucei* mostró un comportamiento similar al observado en *T. cruzi* (**Figura R-4C y D**). En este caso, la densidad aumentó un 97,2 % a 40 nM ($35,8 \pm 1,3 \times 10^6$ parásitos/ml), y siguió incrementándose hasta los 300 nM ($39,1 \pm 1,1$ y $46,5 \pm 2,6 \times 10^6$ parásitos/ml, para 100 y 300 nM, respectivamente); a 600 nM FMN se registró un leve, pero significativo, descenso en el crecimiento ($34,5 \pm 1,7 \times 10^6$ parásitos/ml) (**Figura R-4D**).

En el caso de FAD, la proliferación de los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* fue estimulada un 65,2 % al incrementarse la concentración de 20 nM a 40 nM de flavina ($14,8 \pm 2,5$ vs $24,5 \pm 2,6 \times 10^6$ parásitos/ml, respectivamente); pero concentraciones mayores (100 nM y 300 nM), ya produjeron un brusco descenso en la densidad de parásitos (-30,3 % y -86,5 %, respectivamente, en comparación con la condición control). Sin embargo, y algo inesperadamente, a 600 nM de FAD, la proliferación de los parásitos fue estimulada nuevamente (56,2 % en comparación con la condición control) (**Figura R-4E y F**).

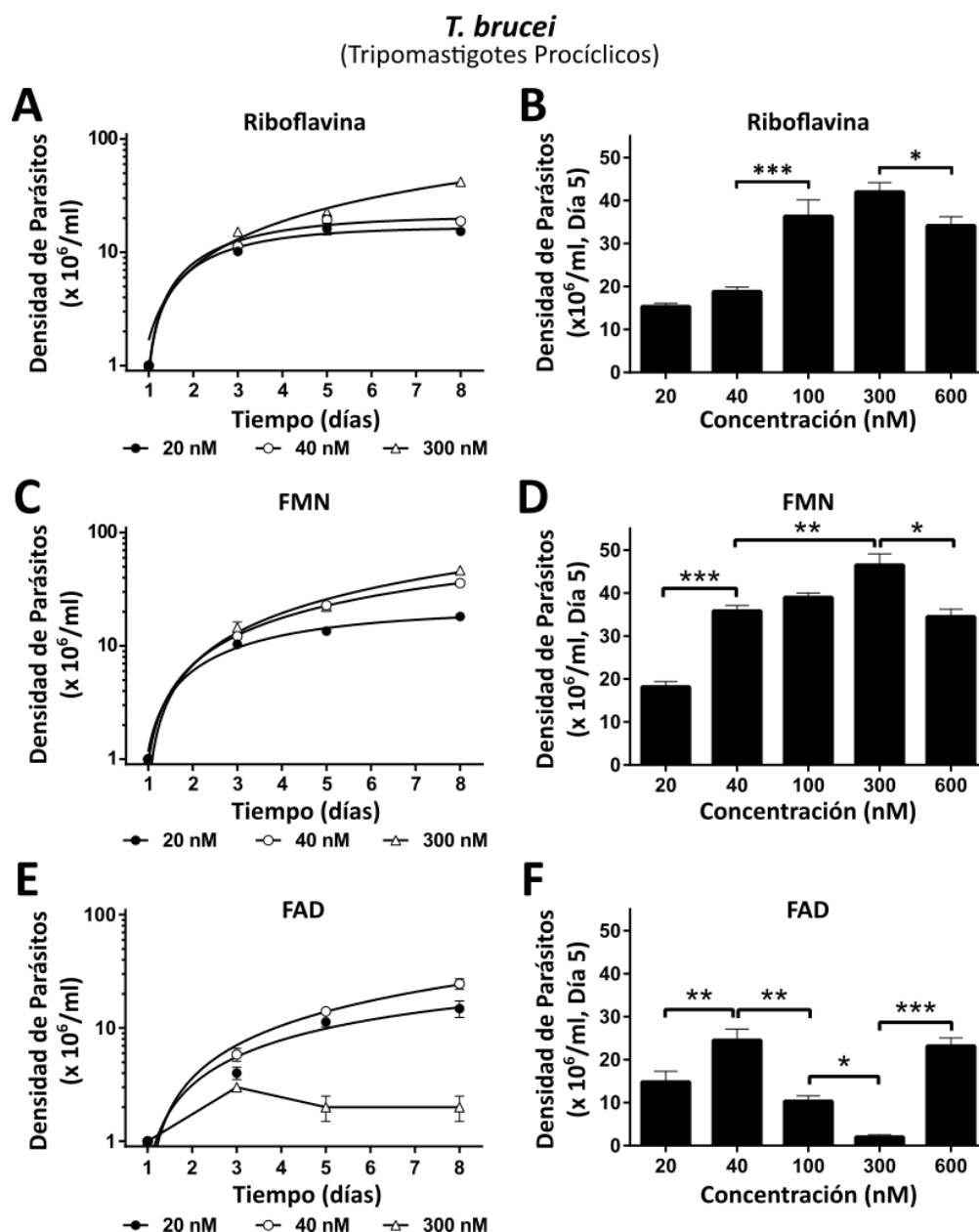


Figura R-4. Las flavinas estimulan la proliferación de tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*. A), C) y E) Curvas de crecimiento de tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* cultivados en medio SDM20 con concentraciones crecientes de A) riboflavina, C) FMN y E) FAD a 20, 40, 100, 300 y 600nM. El eje Y se encuentra en escala logarítmica. B), D) y F) Análisis de densidad de parásitos al quinto día de cultivo, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Leishmania mexicana

Posteriormente, se estudió la proliferación de promastigotes procíclicos de *L. mexicana* en función de concentraciones crecientes de flavinas. En presencia de 40 nM de riboflavina, el crecimiento de estos parásitos aumentó un 31,7 % respecto del control a 20 nM ($27,8 \pm 1,1$ vs. $21,0 \pm 0,9 \times 10^6$ parásitos/ml, respectivamente). Este valor se mantuvo hasta los 300 nM; al aumentar la concentración de la vitamina a 600 nM, la densidad de parásitos aumentó levemente (a $32,8 \pm 0,7 \times 10^6$ parásitos/ml) (**Figura R-5A y B**).

Curiosamente, cuando los cultivos de *L. mexicana* fueron suplementados con FMN, la densidad de parásitos decreció progresivamente hasta los 100 nM de flavina, pasando de $36,3 \pm 1,5 \times 10^6$ parásitos/ml en la condición control (20nM) a $32,0 \pm 1,5 \times 10^6$ parásitos/ml (-11,9 %) con 40 nM y, más notoriamente, a $20,8 \pm 1,9 \times 10^6$ parásitos/ml (-42,7%) con 100 nM. Pero a partir de los 300 nM de FMN, el crecimiento de estos parásitos fue re-estimulado, hasta que con 600 nM se alcanzaron valores similares a los registrados en el control ($27,8 \pm 1,0 \times 10^6$ y $31,5 \pm 1,3 \times 10^6$ parásitos/ml) (**Figura R-5C y D**).

Finalmente, la proliferación de los promastigotes procíclicos de *L. mexicana* también se vio estimulada por la disponibilidad de FAD, de manera tal que a 300 nM, la densidad máxima aumentó un 35,5 % ($26,7 \pm 1,8 \times 10^6$ parásitos/ml), y este porcentaje se mantuvo con 600 nM ($31,2 \pm 3,2 \times 10^6$ parásitos/ml). Por otra parte, concentraciones menores, de 40 nM y 100 nM, no afectaron la capacidad proliferativa de estos parásitos, ya que los valores de densidad de parásitos registrados fueron similares a los observados en la condición control (**Figura R-5E y F**).

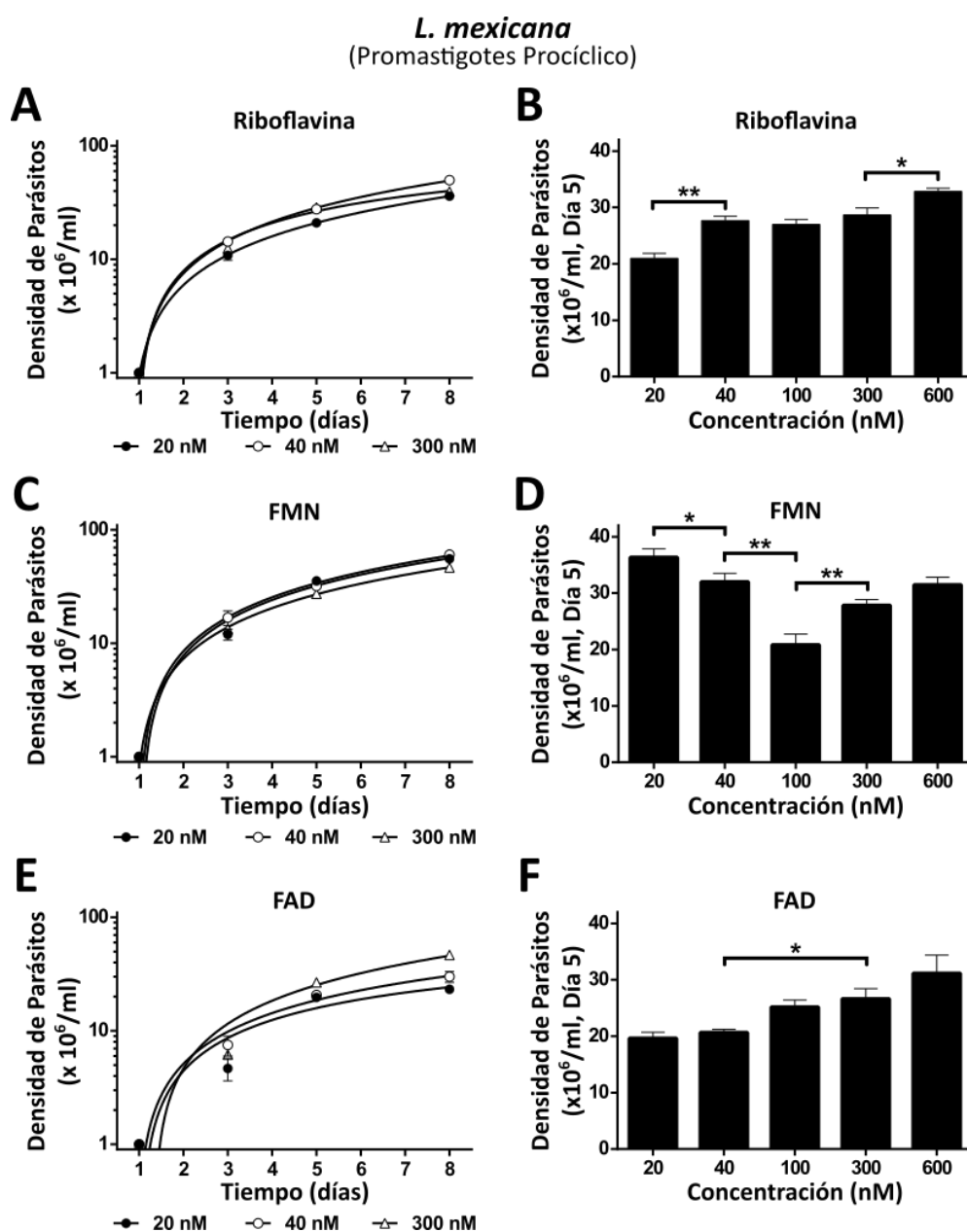


Figura R-5. Las flavinas estimulan la proliferación de promastigotes procíclicos de *L. mexicana*. A), C) y E) Curvas de crecimiento de promastigotes procíclicos de *L. mexicana* cultivados en medio SDM20 con concentraciones crecientes de A) riboflavina, C) FMN y E) FAD a 20, 40, 100, 300 y 600nM. El eje Y se encuentra en escala logarítmica. B), D) y F) Análisis de densidad de parásitos al quinto día de cultivo, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Efecto de flavinas en la proliferación de parásitos no-patógenos de humanos relacionados a *T. cruzi*

Paralelamente, se analizó la influencia de las flavinas sobre el crecimiento de tripanosomátidos no patógenos para el hombre.

Crithidia fasciculata

Con respecto al tripanosomátido *C. fasciculata*, su crecimiento fue estimulado por concentraciones crecientes de riboflavina, de manera tal que a 40 nM, se obtuvo una densidad de parásitos levemente mayor que la condición control ($18,0 \pm 1,5$ vs. $12,5 \pm 1,5 \times 10^6$ parásitos/ml, respectivamente), y esta tendencia se sostuvo hasta los 300 nM de vitamina (a 100 nM se incrementó a $21,5 \pm 1,8 \times 10^6$ parásitos/ml, y a 300 nM, $28,5 \pm 1,3 \times 10^6$ parásitos/ml). Sin embargo, al incrementar la concentración de riboflavina a 600 nM, el crecimiento decayó con respecto a los valores anteriores, pero se mantuvo superior al control ($19,5 \pm 1,8 \times 10^6$ parásitos/ml) (**Figura R-6A y B**).

Al suplementar los cultivos de *C. fasciculata* con FMN, se observó un incremento a 40 nM ($26,0 \pm 1,7 \times 10^6$ parásitos/ml) respecto al control. Sin embargo, al aumentar el FMN a 100 nM, la densidad de parásitos decayó bruscamente a valores similares al control ($19,2 \pm 1,6 \times 10^6$ parásitos/ml). En contraparte, el crecimiento se estimuló con FMN a 300 nM y 600 nM ($27,3 \pm 2,1$ y $28,0 \pm 2,6 \times 10^6$ parásitos /ml, respectivamente) (**Figura R-6C y D**).

Finalmente, el crecimiento de los coanomastigotes recién aumentó levemente con 300 nM de FAD, pasando de $17,5 \pm 2,2 \times 10^6$ parásitos/ml a 20 nM a $23,3 \pm 1,9 \times 10^6$ parásitos/ml (33,3 % respecto del control), y se mantuvo a 600 nM ($29,7 \pm 2,0 \times 10^6$ parásitos/ml). Por otro lado, concentraciones menores a 300 nM, no mostraron efecto significativo en la densidad de parásitos con respecto al control (**Figura R-6E y F**).

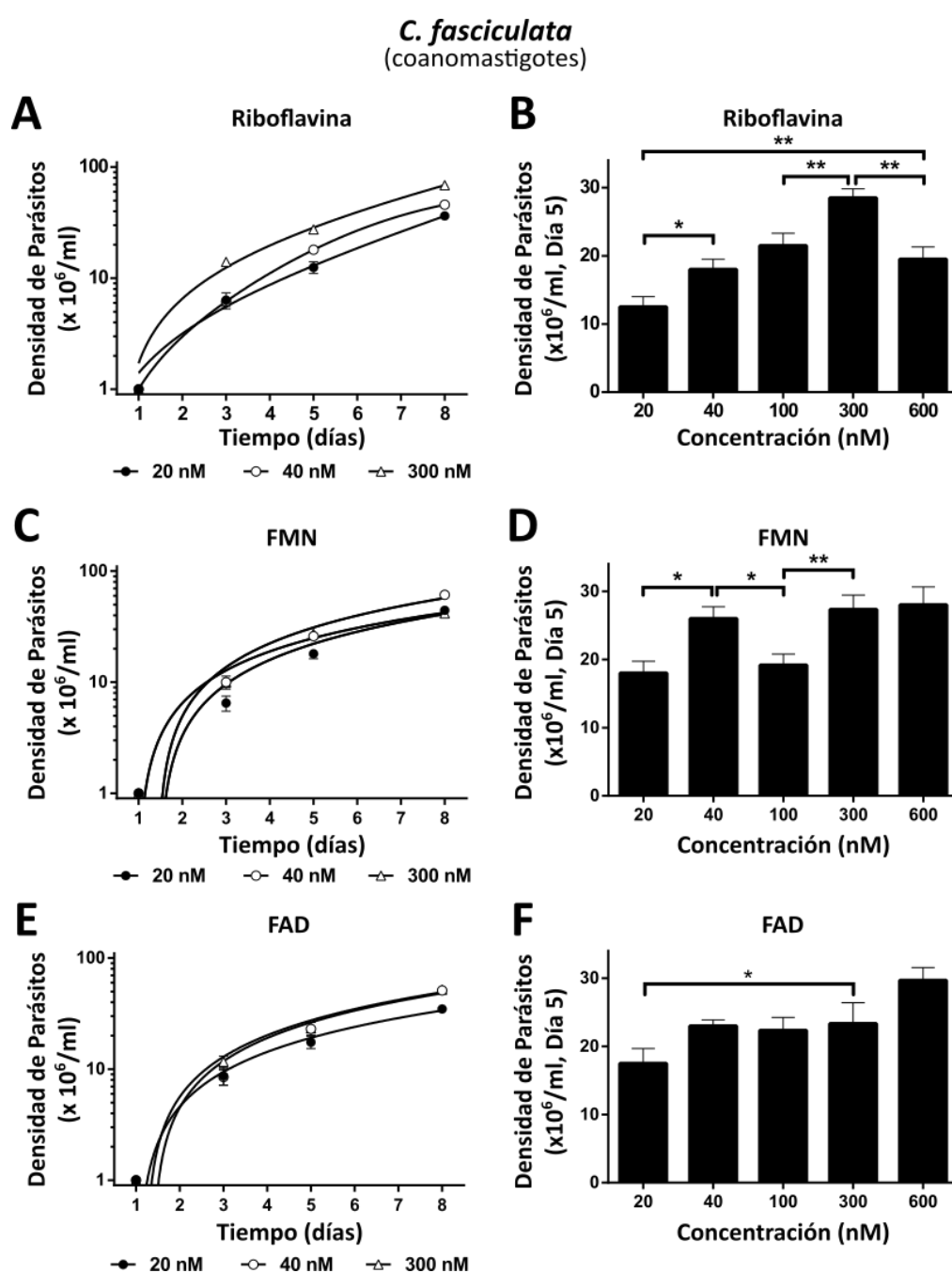


Figura R-6. Las flavinas estimulan la proliferación de coanomastigotes de *C. fasciculata*. A), C) y E) Curvas de crecimiento de coanomastigotes de *C. fasciculata* cultivados en medio SDM20 con concentraciones crecientes de A) riboflavina, C) FMN y E) FAD a 20, 40, 100, 300 y 600nM. El eje Y se encuentra en escala logarítmica. B), D) y F) Análisis de densidad de parásitos al quinto día de cultivo, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Phytomonas Jma

Finalmente, se analizó el efecto de las flavinas en la proliferación del tripanosomátido fitopatógeno *Phytomonas Jma*. La proliferación de estos promastigotes se vio estimulada levemente a 100 nM de riboflavina ($46,3 \pm 1,9 \times 10^6$ parásitos/ml, respecto de la densidad $37,7 \pm 2,0 \times 10^6$ parásitos/ml alcanzados con el control). Concentraciones por encima y por debajo de 100 nM mantuvieron los valores basales de densidad (**Figura R-7A y B**).

Por otro lado, cuando los cultivos de *Phytomonas Jma* se suplementaron con concentraciones crecientes de FMN, se registró un aumento en la densidad de parásitos del 48,3 % a 40 nM ($44,0 \pm 1,9 \times 10^6$ parásitos/ml) y de 78,1 % a 100 nM ($52,8 \pm 3,2 \times 10^6$ parásitos/ml) respecto de la condición control ($29,7 \pm 2,3 \times 10^6$ parásitos/ml). Por otra parte, concentraciones mayores de FMN (300 nM y 600 nM) llevaron a un decrecimiento en la proliferación, alcanzado valores similares a los del control (**Figura R-7C y D**).

Por último, en presencia de FAD, la densidad del cultivo de *Phytomonas Jma* se incrementó desde los 40 nM (31,0 %) hasta los 100 nM (57,5 %) ($38,0 \pm 2,2 \times 10^6$ y $45,7 \pm 3,1 \times 10^6$ parásitos/ml, respectivamente), en comparación con el control ($29,0 \pm 3,6 \times 10^6$ parásitos/ml). Sin embargo, con 300 nM la densidad de parásitos decayó a valores similares a la condición control (**Figura R-7E y F**).

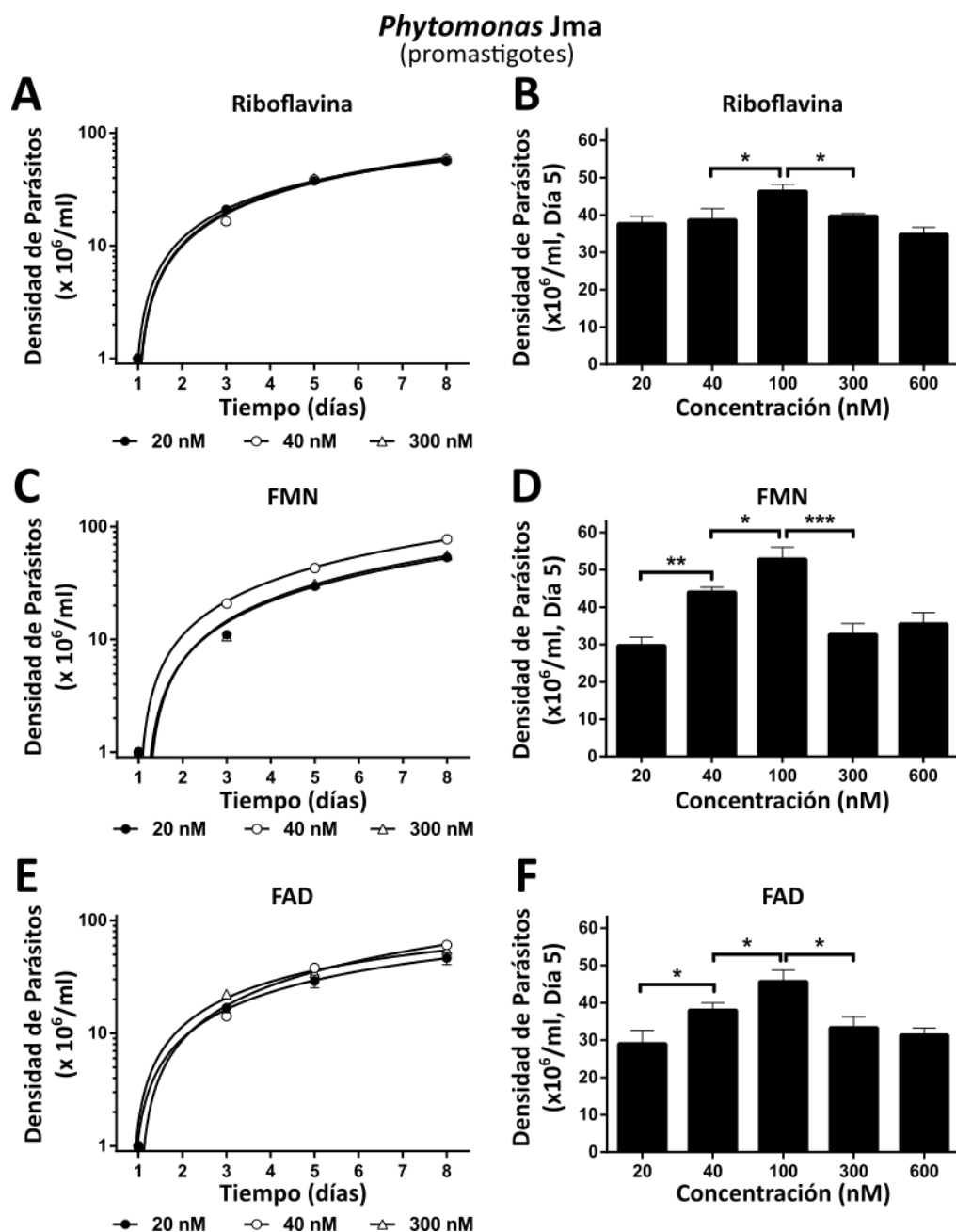


Figura R-7. Las flavinas estimulan la proliferación de promastigotes de *Phytomonas Jma*. A), C) y E) Curvas de crecimiento de promastigotes de *Phytomonas Jma* cultivados en medio SDM20 con concentraciones crecientes de A) riboflavina, C) FMN y E) FAD a 20, 40, 100, 300 y 600nM. El eje Y se encuentra en escala logarítmica. B), D) y F) Análisis de densidad de parásitos al quinto día de cultivo, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Si bien las flavinas del medio impactaron en la capacidad proliferativa de todos los tripanosomátidos ensayados, tanto el grado como la concentración a la cual se obtuvo la densidad máxima, dependió de cada parásito:

- Los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* y coanomastigotes de *C. fasciculata*, presentaron un gran aumento en la densidad de los cultivos con riboflavina. En cambio, los promastigotes de *L. mexicana* y de *Phytomonas* Jma mostraron cambio menores a 20 - 300 nM de riboflavina. Por otro lado, altas concentraciones de riboflavina (600 nM) modificaron sustancialmente el patrón de crecimiento, por causas que hasta el momento desconocemos: en la mayoría de los tripanosomátidos analizados la proliferación se vio disminuida, mientras que *L. mexicana* fue levemente estimulada.

- Con FMN, los epimastigotes de *T. cruzi*, tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, coanomastigotes de *C. fasciculata* y promastigotes de *Phytomonas* Jma fueron estimulados por incrementos en la concentración de esta flavina. Pero en ciertas concentraciones se redujo la densidad de estos cultivos (600 nM de FMN para *T. cruzi* y *T. brucei*, 300 nM para *Phytomonas* Jma y 100 nM para *C. fasciculata*). Por otra parte, el crecimiento de *L. mexicana* fue inhibido por 100 nM de FMN; pero, y tal como sucede con *C. fasciculata*, con concentraciones mayores (300 nM y 600 nM) se logró una re-estimulación en la proliferación.

- Respecto del efecto de FAD, el crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi*, tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, coanomastigotes de *C. fasciculata* y promastigotes de *L. mexicana* y *Phytomonas* Jma fue estimulado con la adición de esta flavina. Sin embargo, en el caso de *T. brucei* y *Phytomonas* Jma, el crecimiento fue inhibido con 100 nM y 300 nM de FAD, respectivamente. Pero en el caso de *T. brucei*, su crecimiento fue re-estimulado con 600 nM de FAD.

En todos los casos, se observó que las flavinas extracelulares tuvieron un efecto dual sobre el crecimiento de los tripanosomátidos, donde hay rangos de concentraciones estimulantes y otros inhibitorios. El hecho de que las flavinas afecten la proliferación de estos parásitos sugiere la existencia de posible/s transportador/es de flavinas cuya/s actividad/es modularía/n los niveles de crecimiento.

Efecto de análogos de riboflavina en la capacidad proliferativa de *T. cruzi*

Para profundizar el estudio sobre el rol de riboflavina en los tripanosomátidos, se analizó el efecto de los análogos roseoflavina, lumiflavina y lumicromo sobre la proliferación de los tripanosomátidos.

En el caso de *T. cruzi*, epimastigotes se cultivaron en medio SDM20 suplementado con 300 nM de riboflavina, en presencia de distintas concentraciones de cada análogo (**Figura R-8**). Este ensayo se realizó con riboflavina a 300 nM para que el efecto observado sobre la proliferación sea por los análogos y no por la deprivación de la vitamina. Por otra parte, el rango de concentraciones de análogos ensayadas fue de 0 μ M a 20 μ M dado que su baja solubilidad no permitía concentraciones mayores en soluciones acuosas.

De esta manera, roseoflavina mostró un efecto inhibitorio tempranamente durante la primera semana de cultivo, en donde se registró que a una concentración de 5 μ M de análogo, la proliferación se redujo un 25,8 % ($44,0 \pm 3,6 \times 10^6$ parásitos/ml) respecto del control ($59,3 \pm 0,8 \times 10^6$ parásitos/ml) (**Figura R-8A**). El efecto se mantuvo a 10 μ M de droga ($46,7 \pm 1,0 \times 10^6$ parásitos/ml). En la máxima concentración de roseoflavina ensayada, se obtuvo la mayor inhibición en la proliferación de los epimastigotes, alcanzando una densidad de $27,0 \pm 2,3 \times 10^6$ parásitos/ml (equivalentes a un 54,5 % menos que el control).

Por otra parte, con lumiflavina también se observó un efecto inhibitorio en la primera semana, pero a partir de una concentración de 10 μ M (la densidad al quinto día de cultivo fue de $44,0 \pm 1,0 \times 10^6$ vs. $55,2 \pm 4,3 \times 10^6$ parásitos/ml para los cultivos tratados con 10 μ M de lumiflavina y sin tratar, respectivamente). Este efecto fue más pronunciado a los 20 μ M de análogo, lográndose una inhibición del 53,2 % (densidad de $25,8 \pm 0,8 \times 10^6$ parásitos/ml) (**Figura R-8B**). Esta tendencia se mantuvo a lo largo del tiempo, haciéndose más evidente a la tercera semana.

Finalmente, con lumicromo, no se registraron diferencias significativas sino hasta la tercera semana de cultivo (Día 19) (**Figura R-8C**). A una concentración de lumicromo de 5 μ M, la densidad de los cultivos decayó un 20,2 % respecto del control ($42,0 \pm 2,0 \times 10^6$ vs. $52,7 \pm 1,8 \times 10^6$ parásitos/ml). Estos valores se mantuvieron a 10 μ M del análogo ($37,7 \pm 2,4 \times 10^6$ parásitos/ml).

Sin embargo, al incrementar la concentración de lumicromo a 20 μM , se registró un nuevo descenso en la densidad de epimastigotes, alcanzándose valores de $27,2 \pm 1,4 \times 10^6$ parásitos/ml (equivalente a un decrecimiento del 48,4 % respecto del control).

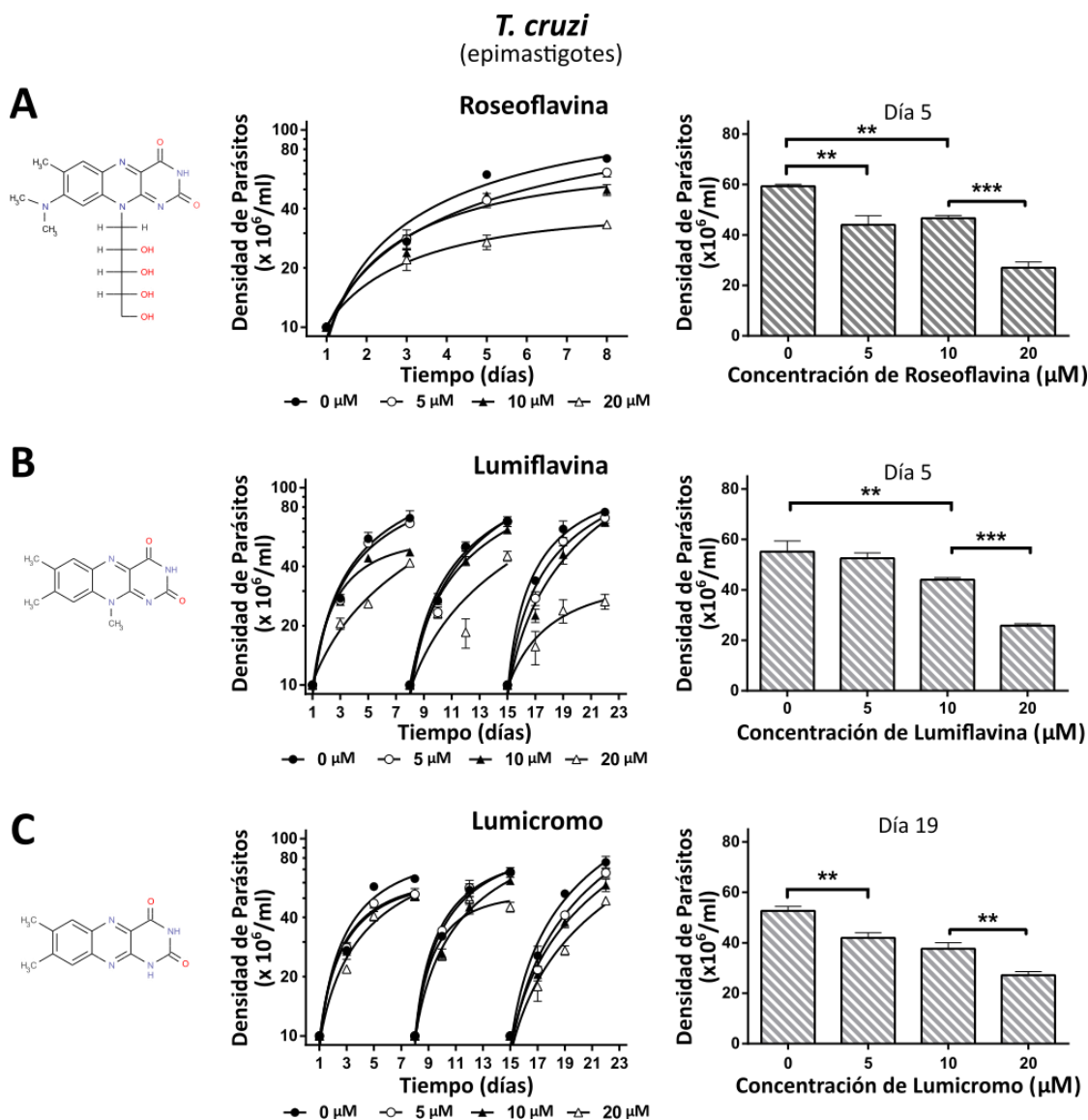


Figura R-8. Los análogos de riboflavina afectan negativamente la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. Panel A) Roseoflavina, B) Lumiflavina y C) Lumicromo. A la izquierda de cada panel se muestra la estructura de los análogos de riboflavina ensayados. En el centro de cada panel, se muestran las curvas de crecimiento de parásitos que se realizaron en medio SDM20 conteniendo 300 nM de riboflavina en presencia de distintas concentraciones de los análogos (0, 5, 10 y 20 μM). A la derecha de cada panel, se representa la densidad alcanzada al quinto día 5 para roseoflavina y para lumiflavina, o al día 19 para lumicromo, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005).

Estos resultados indican que los análogos de riboflavina interrumpieron la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi*, y la sensibilidad a estas drogas podría estar dada por un potencial efecto sobre la incorporación de la vitamina y/o su metabolismo.

Efecto de análogos de flavinas en la proliferación de parásitos patógenos de humanos relacionados a *T. cruzi*

Posteriormente, probamos el posible efecto de los análogos de riboflavina sobre la proliferación del resto de los tripanosomátidos patógenos para el hombre. En todos los casos se probaron los análogos a 10 μ M.

Trypanosoma brucei

Para los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, la roseoflavina resultó ser el inhibidor más efectivo ya que la densidad de los parásitos decayó un 68,2 % en la primera semana de cultivo (Día 5) (pasando de $33,8 \pm 6,9 \times 10^6$ a $10,7 \pm 4,7 \times 10^6$ parásitos/ml, en los cultivos control y tratado con 10 μ M de droga, respectivamente) (**Figura R-9A**).

Los análogos lumiflavina y lumicromo también tuvieron un efecto negativo sobre la proliferación de los procíclicos, pero recién en la segunda semana de cultivo (Día 10). En ambos casos, el control mostró una densidad de parásitos alrededor de $31,8 \pm 1,5 \times 10^6$ parásitos/ml, y en presencia de lumiflavina o lumicromo, el número decayó un 44,1 % y un 60,5 %, respectivamente (los valores de densidad fueron de $17,8 \pm 2,5 \times 10^6$ parásitos/ml para lumiflavina, y de $12,5 \pm 2,2 \times 10^6$ parásitos/ml para lumicromo) (**Figura R-9B y C**).

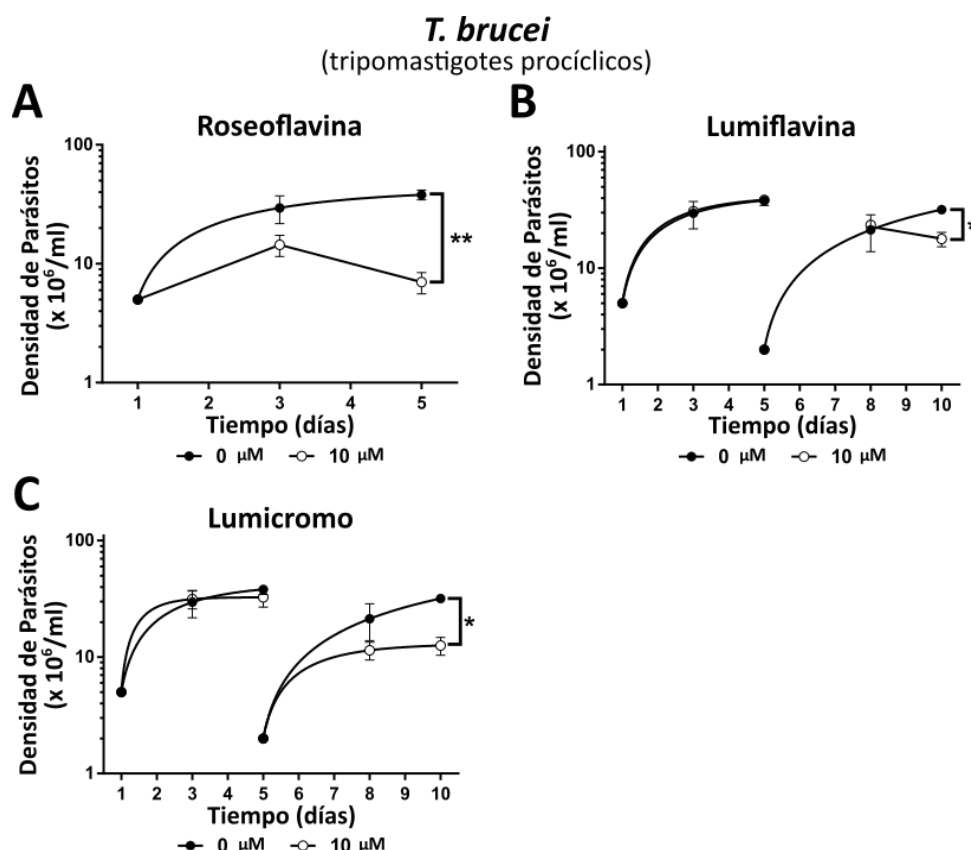


Figura R-9. Los análogos de riboflavina afectan negativamente la proliferación de tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*. Las curvas de crecimiento de parásitos se realizaron en medio SDM20 con 300 nM de riboflavina y 0 μM ó 10 μM de los análogos: A) Roseoflavina, B) Lumiflavina y C) Lumicromo, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (*p<0,05, **p<0,01).

Leishmania mexicana

En el caso de los promastigotes procíclicos de *L. mexicana*, roseoflavina mostró un efecto inhibitorio sobre la proliferación de estos parásitos, de manera tal que durante la primera semana de cultivo se registró una densidad 81,2 % menor que el control (Día 5), donde se observó una cantidad de parásitos de $41,7 \pm 4,4 \times 10^6$ vs. $7,8 \pm 2,0 \times 10^6$ parásitos/ml para los cultivos controles y tratados, respectivamente (**Figura R-10A**).

Por otra parte, con lumiflavina y con lumicromo se observó una disminución en la densidad de parásitos recién a la segunda semana de exposición (Día 10). De esta manera, se obtuvo un descenso del 32,5 % para lumiflavina y 42,5 % para lumicromo (en la condición control se obtuvo

una densidad de $37,3 \pm 2,1 \times 10^6$ parásitos/ml, mientras que con lumiflavina se obtuvo una densidad de $25,2 \pm 3,3 \times 10^6$ parásitos/ml, y con lumicromo, $21,5 \pm 2,6 \times 10^6$ parásitos/ml).

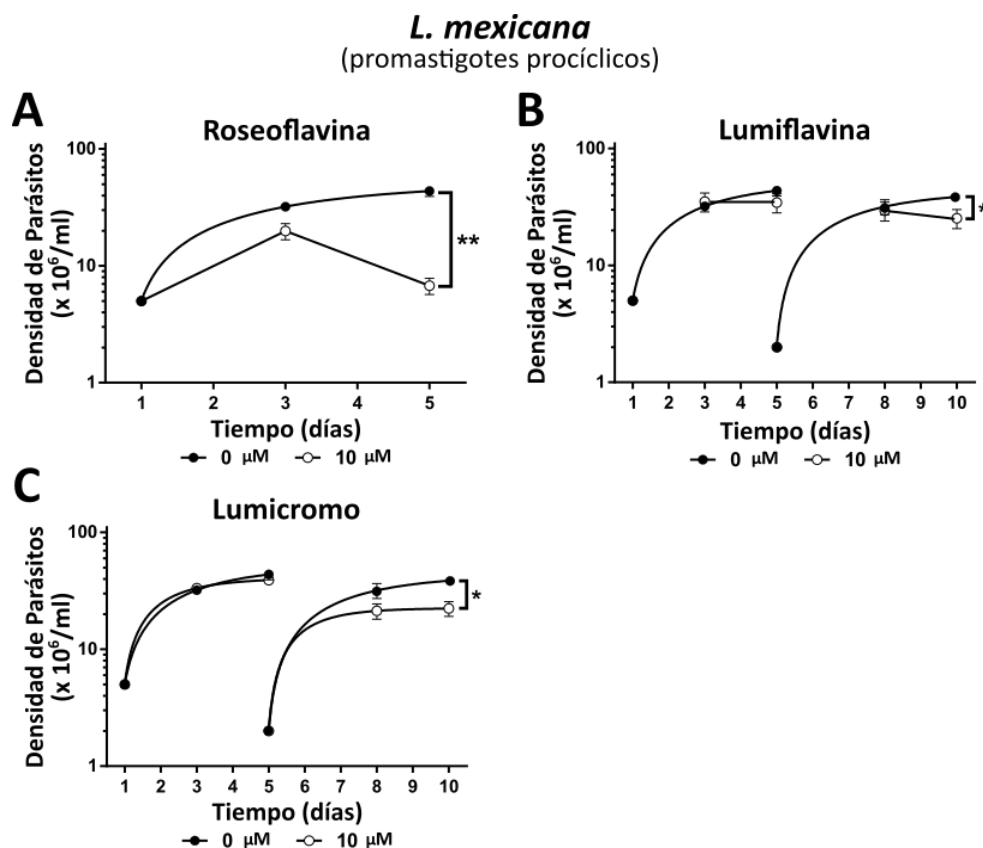


Figura R-10. Los análogos de riboflavina afectan negativamente la proliferación de promastigotes procíclicos de *L. mexicana*. Las curvas de crecimiento de parásitos se realizaron en medio SDM20 conteniendo 300 nM de riboflavina en presencia de una única concentración de los análogos (10 μM): A) Roseoflavina, B) Lumiflavina y C) Lumicromo, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (*p<0,05, **p<0,01).

Efecto de análogos de flavinas en la proliferación de parásitos no-patógenos de humanos relacionados a *T. cruzi*

Finalmente, se analizó la influencia de los análogos de riboflavina sobre el crecimiento de tripanosomátidos no-patógenos para el hombre.

Crithidia fasciculata

Los coanomastigotes de *C. fasciculata* resultaron más sensibles que otros parásitos a los análogos de riboflavina, ya que se registró una disminución en la densidad, en todos los casos, ya en la primera semana de cultivo (**Figura R-11A-C**). Roseoflavina presentó al quinto día una inhibición del crecimiento del 33,3 % respecto del control ($43,3 \pm 4,2 \times 10^6$ vs. $65,0 \pm 5,3 \times 10^6$ parásitos/ml, respectivamente) (**Figura R-11A**).

Por otra parte, lumiflavina y lumicromo también afectaron la proliferación de los coanomastigotes de manera tal que, en presencia de lumiflavina, la densidad al quinto día mostró una disminución del 53,6 % respecto del control ($30,2 \pm 4,3 \times 10^6$ vs. $65,0 \pm 5,3 \times 10^6$, respectivamente); mientras que con lumicromo, la densidad se redujo un 44,6 % respecto del no tratado ($36,0 \pm 4,4 \times 10^6$ vs. $63,0 \pm 4,2 \times 10^6$ parásitos/ml, respectivamente).

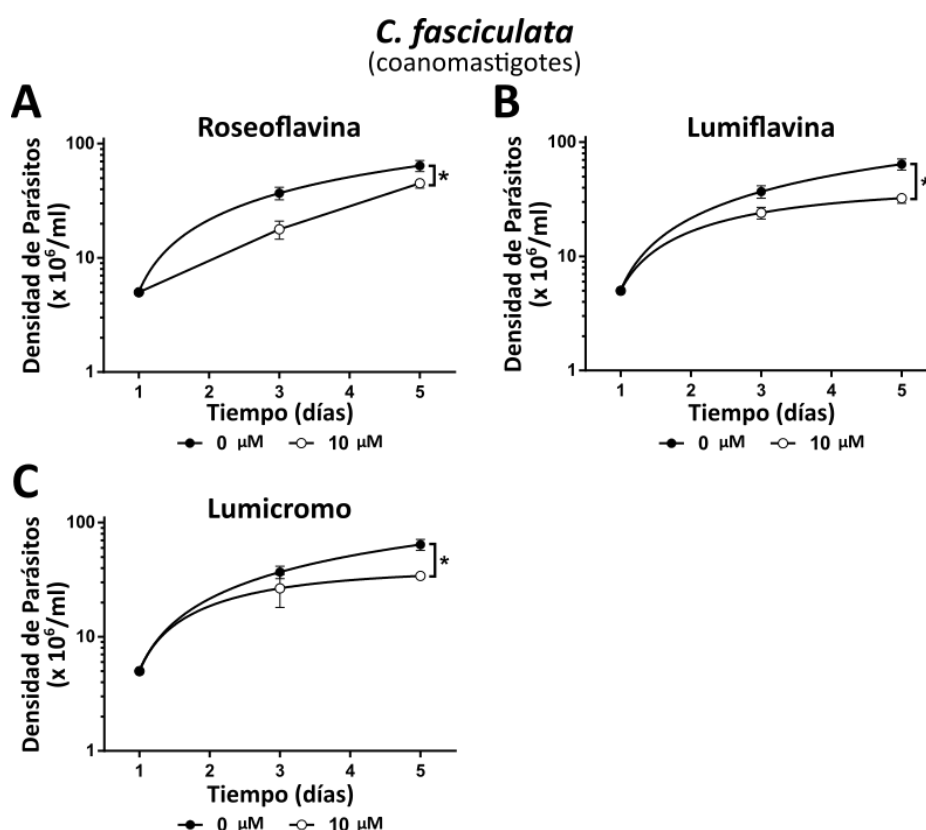


Figura R-11. Los análogos de riboflavina afectan negativamente la proliferación de coanomastigotes de *C. fasciculata*. Las curvas de crecimiento de parásitos se realizaron en medio SDM20 conteniendo 300 nM de riboflavina en presencia de una única concentración de los análogos (10 μM): A) Roseoflavina, B) Lumiflavina y C) Lumicromo, en al menos 3 curvas de crecimiento

independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Phytomonas Jma

Los promastigotes de *Phytomonas Jma* fueron sensibles a la roseoflavina, ya que mostraron una disminución en la proliferación del 39,8 % en comparación con el control (de $36,8 \pm 1,8 \times 10^6$ vs. $61,0 \pm 4,2 \times 10^6$ parásitos/ml, respectivamente) (**Figura R-12A**).

Paralelamente, los análogos lumiflavina y lumicromo no afectaron la proliferación de *Phytomonas Jma*, pues no se registraron diferencias significativas en la densidad de parásitos en comparación con la condición control (**Figura R-12B y C**).

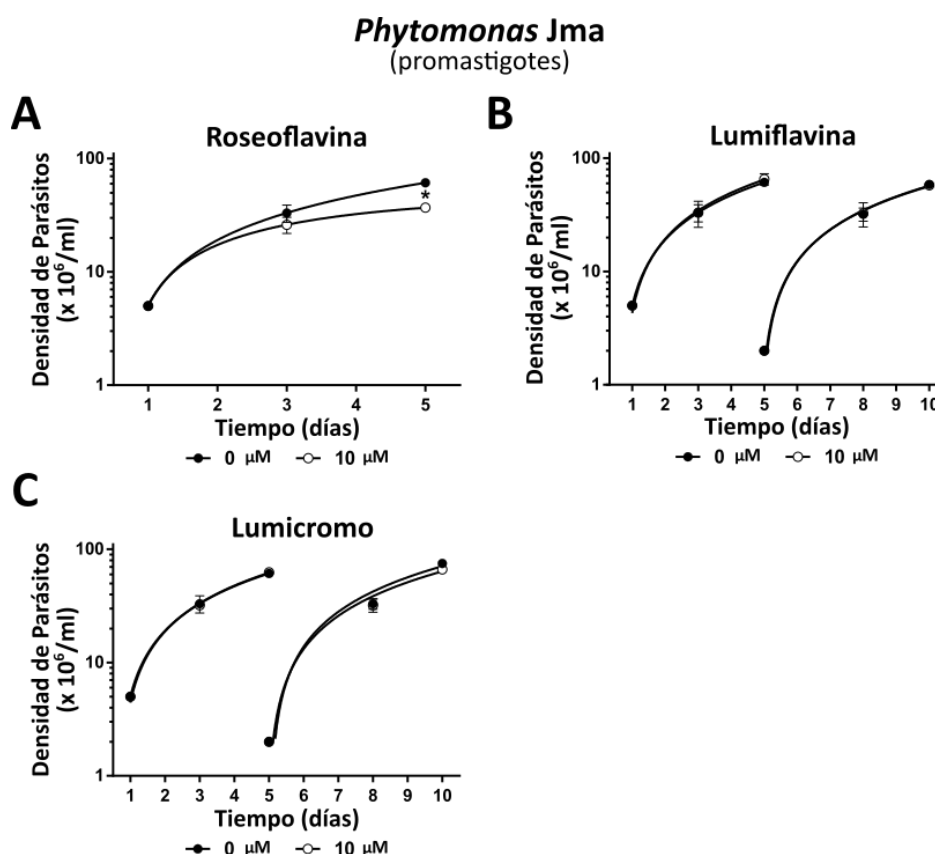


Figura R-12. Los análogos de riboflavina afectan levemente la proliferación de promastigotes de *Phytomonas Jma*. Las curvas de crecimiento de parásitos se realizaron en medio SDM20 conteniendo 300 nM de riboflavina en presencia de una única concentración de los análogos (10 μM): A) Roseoflavina, B) Lumiflavina y C) Lumicromo, en al menos 3 curvas de crecimiento independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

En términos generales, todos estos tripanosomátidos fueron sensibles a la roseoflavina, que mostró su efecto inhibitorio ya en la primera semana de cultivo.

Con respecto a los análogos lumiflavina y lumicromo, el efecto fue más dispar: *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana* debieron estar expuestos a estos compuestos por varias semanas para que su replicación fuera inhibida; la proliferación de *C. fasciculata* fue afectada por lumiflavina y lumicromo en la primera semana y no se observó ningún efecto sobre la proliferación de *Phytomonas* Jma.

Transporte de riboflavina en tripanosomátidos: estudio de las constantes cinéticas y la especificidad del transporte

De acuerdo a la influencia de la riboflavina y sus derivados sobre la proliferación de los tripanosomátidos, se decidió analizar si estos parásitos son capaces de incorporar la vitamina.

Ensayos de incorporación de riboflavina en tripanosomátidos

Para los ensayos de transporte, los parásitos se cultivaron en medio rico en nutrientes para que crezcan en óptimas condiciones (medio BHT), con excepción de los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* que fueron cultivados en SDM-79. Estos ensayos de transporte se realizaron con parásitos en fase exponencial y, antes de las mediciones, se hambreadon para favorecer la incorporación de riboflavina. Todos los tripanosomátidos ensayados fueron capaces de incorporar ^3H -riboflavina a una concentración de 2 μM , cada uno con una cinética particular y velocidades iniciales muy diferentes entre sí (**Figura R-13A-E**). Los coanomastigotes de *C. fasciculata* incorporaron la vitamina con mayor velocidad inicial, seguido por los epimastigotes de *T. cruzi*; mientras que el resto de los parásitos ensayados tuvieron una baja incorporación en esta concentración de riboflavina (**Figura R-13A-E**).

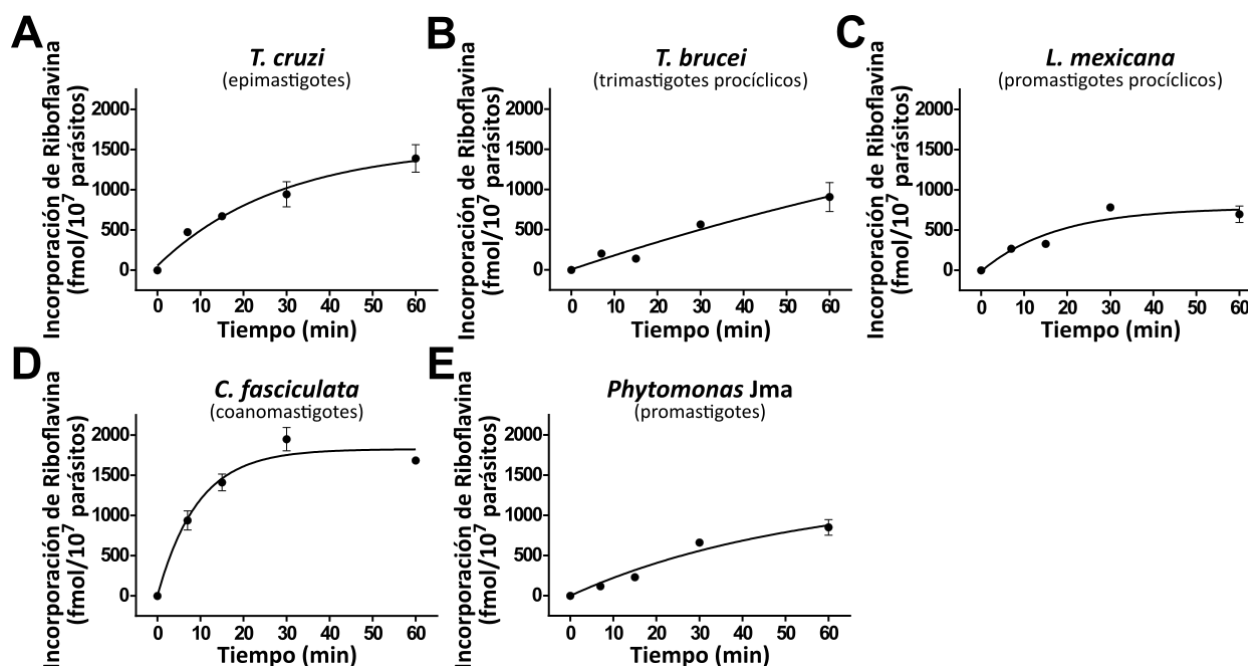


Figura R-13. Los tripanosomátidos son capaces de incorporar riboflavina desde el medio extracelular. La incorporación de riboflavina se midió en A) Epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y), B) tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, C) promastigotes procíclicos de *L. mexicana*, D) coanomastigotes de *C. fasciculata* y E) promastigotes de *Phytomonas Jma*, luego de hambrearlos 3 h en PBS glucosa 2 %. El ensayo de transporte se inició con el agregado de 2 μ M de riboflavina (actividad específica: 0,85 Ci/mmol). Las alícuotas de tomaron a los tiempos 0, 7, 15, 30 y 60 min. Los ensayos se realizaron al menos en 3 mediciones independientes.

Teniendo las primeras evidencias de transporte de riboflavina en tripanosomátidos, avanzamos en su caracterización bioquímica, realizando ensayos a concentraciones crecientes de riboflavina y determinando, para cada concentración, la velocidad inicial (V_0) (Figura R-14A-E). Todos los tripanosomátidos mostraron curvas de transporte con comportamiento michaeliano (R^2 : 0,84, 0,93, 0,82, 0,94 y 0,84 para *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. mexicana*, *C. fasciculata* y *Phytomonas Jma*, respectivamente), indicando que la incorporación de riboflavina en tripanosomátidos ocurre de manera dependiente de transportador. En cada caso, la velocidad inicial fue dependiente de la concentración de riboflavina extracelular hasta los 0,5 μ M, concentración a partir de la cual la velocidad se mantuvo constante, indicando la saturación de los mecanismos de incorporación de riboflavina. Se determinaron, entonces, los siguientes parámetros cinéticos del transporte de riboflavina en cada parásito:

- **K_m aparente:** concentración de riboflavina a la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima, usando parásitos intactos;
- **V_{máx}** (velocidad máxima): velocidad alcanzada en concentraciones saturantes de sustrato.

La K_m aparente para la incorporación de riboflavina en todos los tripanosomátidos se encontró en el orden sub-micromolar, sugiriendo que el/los transportador/es son de gran afinidad; en particular, los promastigotes procíclicos de *L. mexicana* mostraron la mayor afinidad, con una K_m aparente de $0,07 \pm 0,03 \mu\text{M}$ (**Figura R-14C**).

Respecto a las V_{máx}, los coanomastigotes de *C. fasciculata* mostraron el mayor valor (V_{máx}: $114,9 \pm 5,10 \text{ fmol}/10^7 \text{ parásitos}/\text{min}$) en comparación con los otros parásitos ensayados (**Figura R-14D**), indicando que tuvieron la mayor capacidad de incorporar riboflavina. En el otro extremo se encuentran los promastigotes de *Phytomonas* Jma, con una V_{máx} de apenas $12,22 \pm 1,03 \text{ fmol}/10^7 \text{ parásitos}/\text{min}$ (**Figura R-14E**).

Estos resultados (**Figura R-13** y **Figura R-14**) indicaron que cada tripanosomátido efectivamente incorpora riboflavina desde el medio extracelular, pero cada uno de ellos tuvo características cinéticas específicas, probablemente relacionados con los ambientes que habitan, los estadios por los que atraviesan, sus propiedades celulares/bioquímicas, etc.

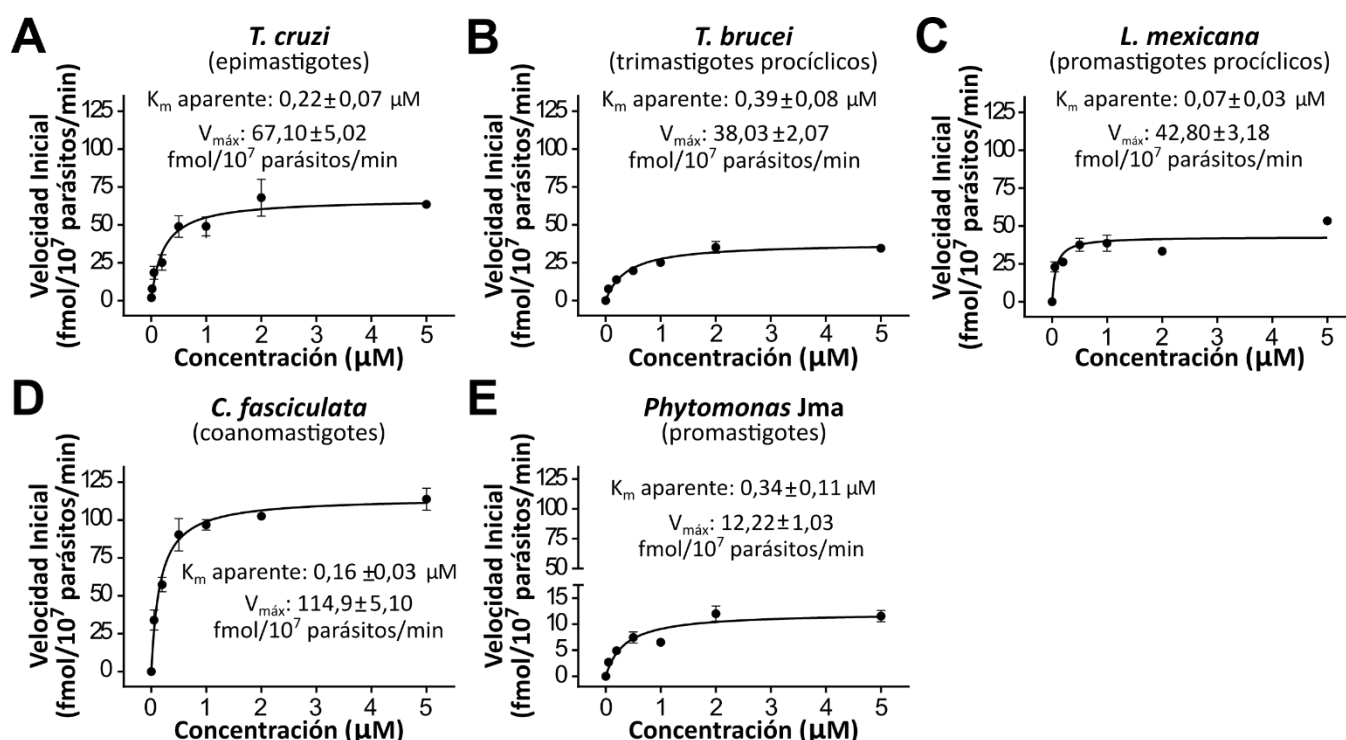


Figura R-14. Determinación de parámetros cinéticos de la incorporación de riboflavina en tripanosomátidos. La incorporación de riboflavina se midió en A) epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y), B) tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, C) promastigotes procíclicos de *L. mexicana*, D) coanomastigotes de *C. fasciculata* y E) promastigotes de *Phytomonas Jma*, luego de hambrearlos 3 h en PBS glucosa 2 %. El ensayo de transporte se inició con el agregado de riboflavina a distintas concentraciones finales (0, 0,05, 0,2, 0,5, 1, 2 y 5 μM , donde la actividad específica fue de 0,19, 4,9, 3,9, 5,0, 2,5 y 1,0 Ci/mmol, respectivamente). Las alícuotas se tomaron a los tiempos 0 y 5 min, en al menos 3 mediciones independientes.

Especificidad del transporte de riboflavina en *T. cruzi*

Con el fin de determinar la especificidad de la incorporación de 3H -riboflavina en los epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y-GFP) realizamos ensayos de desplazamiento. Para ello, los parásitos se incubaron con 3H -riboflavina a una concentración final de 0,3 μM (concentración cercana a la K_m aparente estimada), en presencia de: i- flavinas no marcadas, ii- análogos de riboflavina no marcado y iii- acriflavina, que es un compuesto estructuralmente similar aunque químicamente no-relacionado con las flavinas; cada compuesto a una concentración 10 ó 100 veces mayor que la de riboflavina.

Tal como se esperaba de un fenómeno mediado por un transportador específico, la riboflavina no marcada desplazó efectivamente la incorporación de la vitamina radioactiva de manera dosis dependiente: con 3 μM de competidor se logró inhibir el transporte de ^3H -riboflavina en un 57,2 % respecto del control, mientras que con 30 μM , se inhibió en su totalidad (97,1 %). Un efecto similar, pero en menor medida, se observó para FMN ya que con 3 μM se desplazó la incorporación un 31,4 % en comparación con el control y con 30 μM de FMN un 54,9 %. Cuando FAD se utilizó como competidor, se registró un efecto significativo a 30 μM (43,2 % de inhibición respecto del control) (**Figura R-15A**).

Estos resultados sugieren que la incorporación de riboflavina radioactiva registrada en los epimastigotes de *T. cruzi* es un proceso específico, mediado por un transportador, que además de incorporar riboflavina, también presenta un cierto grado de afinidad por las flavinas FMN y FAD.

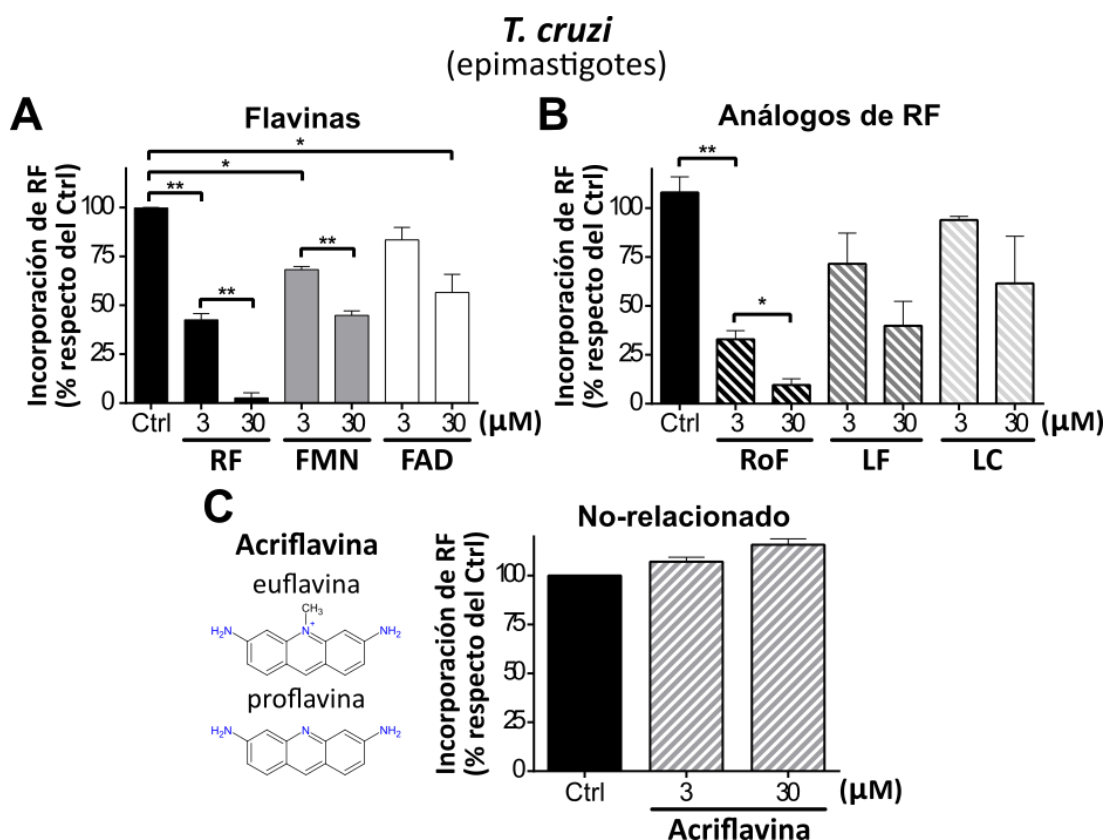


Figura R-15. Especificidad del transporte de riboflavina en epimastigotes de *T. cruzi*. Parásitos de la cepa Y-GFP se incubaron en PBS-glucosa 2 %, conteniendo 0,3 μM de ^3H -riboflavina (6,2 Ci/mmol). A) Riboflavina (RF), FMN o FAD no marcados se agregaron a una concentración final de 3 ó 30 μM .

B) Los análogos roseoflavina (RoF), lumiflavina (LF) o lumicromo (LC) se agregaron a una concentración final de 3 ó 30 μ M. C) Acriflavina (compuesto químicamente no relacionado a las flavinas) se agregó a 3 ó 30 μ M. En todos los casos, las alícuotas se tomaron a 0 y 15 min. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005), en al menos 3 ensayos independientes.

Paralelamente, se analizó si los análogos tóxicos son capaces de inhibir la incorporación de 3 H-riboflavina, utilizando la misma estrategia anterior. De esta manera, roseoflavina resultó ser el compuesto con mayor capacidad de desplazamiento del transporte de riboflavina, pues a 3 μ M desplazó la incorporación en un 75,1 % respecto del control, mientras que a 30 μ M se registró un transporte de apenas 9,6 % (el porcentaje de inhibición fue del 98,5 %) (**Figura R-15B**). Por otro lado, lumiflavina provocó un descenso de 36,4 % y 68,1 % a 3 μ M y 30 μ M y lumicromo de 14,1 % y 46,5 %, respectivamente (**Figura R-15B**); sin embargo, debido a la gran variabilidad de los resultados obtenidos, las diferencias observadas con lumiflavina y lumicromo no fueron estadísticamente significativas.

El desplazamiento de la incorporación de riboflavina provocado en epimastigotes de *T. cruzi* por los análogos, más particularmente por roseoflavina, sugieren que estos podrían ser transportados por el transportador de riboflavina explicando, al menos en parte, su efecto nocivo sobre la proliferación de estos parásitos.

Para avanzar en el estudio de especificidad de este transporte, se realizó un ensayo de desplazamiento utilizando como competidor un compuesto estructuralmente similar a la riboflavina pero que no se encuentra químicamente relacionado con la misma: la acriflavina. Este derivado de las acridinas, que consiste de una mezcla de dos compuestos: proflavina y euflavina (**Figura R-15C**, panel izquierdo), no alteró la incorporación de riboflavina en ninguna de las concentraciones ensayadas (3 μ M o 30 μ M) (**Figura R-15C**, panel derecho).

Este resultado sugirió que la incorporación de riboflavina es altamente específica para esta vitamina y sus derivados, pudiendo discriminar aquellos compuestos aún cuando son estructuralmente muy similares como la acriflavina.

Identificación de potenciales transportadores de riboflavina en kinetoplastidos: búsqueda *in silico* y análisis bioinformáticos de las secuencias

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de proliferación y de transporte y desplazamiento de la incorporación de riboflavina reforzaron la idea de la existencia de uno o más transportadores específicos de la vitamina en tripanosomátidos.

Identificación de un potencial transportador de riboflavina en el genoma de *T. cruzi*

Para la identificación de el/los posible/s transportador/es de riboflavina, como primera aproximación se realizó un análisis *in silico* sobre el genoma de *T. cruzi* (cepa CL Brener). Para ello, se utilizó el algoritmo BlastP de la base de datos de los tripanosomátidos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>) y la secuencia de transportadores de riboflavina caracterizados en otros organismos:

- RibU/YpaA de *Lactococcus lactis* y del arquea *Thermofilum carboxyditrophus* (Burgess et al. 2006),
- RibM/PnuX de *Corynebacterium diphtheriae* (Hemberger et al. 2011),
- ImpX de *Fusobacterium nucleatum* (Gutiérrez-Preciado et al. 2015),
- RibN de *Rhizobium leguminosarum* (García Angulo et al. 2013),
- RfnT de *Agrobacterium tumefaciens* (Gutiérrez-Preciado et al. 2015),
- RibXY de *Chloroflexus aggregans* (Gutiérrez-Preciado et al. 2015),
- RfuABCD de *Treponema paraluiscluniculi* (Deka et al. 2013),
- Mch5p de *Saccharomyces cerevisiae* (Reihl & Stolz 2005),
- *rft-1* de *Caenorhabditis elegans* (Biswas et al. 2013),
- *SLC52A* de mamíferos (Yonezawa & Inui 2013);
- y otros predichos como RibV de *Mesoplasma florum* y RibZ de *Peptoclostridium difficile* (Gutiérrez-Preciado et al. 2015) y del alga *Nannochloropsis gaditana* (Corteggiani Carpinelli et al. 2014).

Con la mayoría de estos transportadores se obtuvieron secuencias de proteínas de *T. cruzi* no involucradas en el transporte de metabolitos, como enzimas relacionadas a la ubiquitinación de

proteínas (proteína ubiquitin ligasa), en la síntesis e interacción del ARN (subunidad grande de ARN polimerasa I y ARN helicasa DEAD/H ATP-dependiente), en el metabolismo de glucosa y en la síntesis de colesterol (6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP y 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa), etc. Sin embargo, el alineamiento con cada una de ellas fue modesto, es decir con valores de *e-value* muy elevados y un porcentaje del alineamiento respecto del total de la secuencia obtenida en *T. cruzi* muy bajo (entre 1,25 % y 30 %) (**Tabla R-1**).

En cambio, con los transportadores de *L. lactis* (RibU/YpaA), *C. diphtheriae* (RibM/PnuX) y *S. cerevisiae* (Mch5p) se encontraron genes de *T. cruzi* con potencial actividad de transportador (**Tabla R-1**). Con respecto a los dos primeros, se obtuvo un potencial transportador de Ca^{2+} dependiente de voltaje, pero nuevamente con valores de *e-value* altos y baja cobertura (2,64 y 1,25 %, respectivamente). Finalmente, con la secuencia del transportador Mch5p se obtuvo un posible transportador de ácidos monocarboxílicos, con el valor de *e-value* más bajo (6×10^{-4}) y una cobertura del 89,6 % y, además, entre sí presentaron una identidad del 21 % y una similitud del 37 %. Cabe destacar que, al principio, el gen *MCH5* de *S. cerevisiae* también fue anotado como tal debido a la similitud que muestra con los transportadores de monocarboxilatos de mamíferos; pero en años posteriores no sólo se comprobó que el mismo no media la incorporación de acetato y/o lactato (Makuc et al. 2001), sino que también se descubrió su actividad de transportador de riboflavina (Reihl & Stolz 2005). Por lo tanto, este gen de *T. cruzi* resultó un interesante potencial transportador de riboflavina, al cual denominamos “TcRibJ”. Este gen se encuentra codificado en 2 alelos de copia única en el genoma: TcCLB.509885.70 y TcCLB.508397.70 (98,5 % de similitud y 99,2 % de identidad) en los cromosomas 28S y 28P, respectivamente.

Tabla R-1. Posibles transportadores de riboflavina identificados en el genoma de *T. cruzi*. La parte superior de la tabla se corresponde con los resultados obtenidos a partir de la secuencias de transportadores de riboflavina de procariotas; mientras la parte inferior, hace referencia a los resultados conseguidos con los transportadores de diversos eucariotas.

Organismos	Transportador Usado	Resultado de BlastP	Producto	<i>e-value</i>	Referencia
Procariotas					
<i>Lactococcus lactis</i>	RibU/YpaA	TcCLB.504105.130	Subunidad de canal de Calcio dependiente de voltaje	3,8	(Burgess et al. 2006)

RESULTADOS

<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	RibM/PnuX	TcCLB.504105.130	Subunidad de canal de Calcio dependiente de voltaje	10	(Hemberger et al. 2011)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ImpX	TcCLB.507669.84	ARN helicasa DEAD/H ATP-dependiente	5,8	(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	RfnT	TcCLB.511381.40	Subunidad grande de RNA polimerasa I	2,5	(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
<i>Treponema paraluiscliviculi</i>	RfuA	TcCLB.506405.30	Proteína similar a actina	0,25	(Deka et al. 2013)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RibN	TcCLB.503793.20	Fosfatidilinositol (3,5) quinasa	0,033	(García Angulo et al. 2013)
<i>Mesoplasma florum</i>	RibV	Ningún hit	-		(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
<i>Chloroflexus aggregans</i>	RibXY	TcCLB.509167.20	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa	0,82	(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
<i>Peptoclostridium difficile</i>	RibZ	TcCLB.506699.34	6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP	9,1	(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
<i>Thermophilum carboxydiphosphus</i>	RibU/YpaA	TcCLB.510897.10	Cullin 2	0,74	(Zhang et al. 2010)
Eucariotas					
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Símil RFVT	TcCLB.506473.6	Proteína de función Desconocida	1,4	(Corteggiani Carpinelli et al. 2014)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	rft-1	TcCLB.511815.150	Proteína de función Desconocida	3,2	(Biswas et al. 2013)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mch5p	TcCLB.509885.70	Transportador de monocarboxilatos	0,0006	(Reihl & Stolz 2005)
<i>Homo sapiens</i>	RFVT1	TcCLB.508165.425	Mucina TcMUC	4,5	(Yonezawa & Inui 2013)
<i>Homo sapiens</i>	RFVT2	Ningún hit	-		(Yonezawa & Inui 2013)
<i>Homo sapiens</i>	RFVT3	TcCLB.506145.50	Proteína de función Desconocida	4,4	(Yonezawa & Inui 2013)

Identificación de potencial transportador de riboflavina en el genoma de diversos tripanosomátidos

Actualmente, si bien se secuenciaron los genomas de diversos tripanosomátidos relacionados a *T. cruzi*, solamente algunos de ellos fueron totalmente ensamblados. Entre ellos se destacan los genomas de varias especies del género de *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Leptomonas*, y también

los parásitos *C. fasciculata* y *Endotrypanum monterogeii*. Estos genomas se encuentran depositados en la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>).

Por otra parte, varios genomas secuenciados de tripanosomátidos fueron parcialmente ensamblados, llegando al nivel de *contig* o *scaffold*. Estos últimos se encuentran depositados en la base de datos *Assembly* de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>), bajo el taxón Euglenozoa.

Empleando ambas bases de datos y a partir de nuestros resultados, se decidió buscar posibles transportadores de riboflavina similares a *TcRibJ*, en el genoma de estos tripanosomátidos. Para ello, en la base de datos TriTrypDB se utilizó el algoritmo BlastP; mientras que con la base de datos de *Assembly*/NCBI se usó el algoritmo TblastN. De esta manera, en el genoma de todos los tripanosomátidos fue posible distinguir genes codificando potenciales transportadores de riboflavina muy similares a *TcRibJ* (**Tabla R-2** y **Tabla R-3**). Dependiendo de la especie, la similitud fue entre 37,7 % - 83,3 %. Las secuencias de RibJ pertenecientes a las especies del género *Trypanosoma* resultaron mucho más similares a *TcRibJ* que las de otros tripanosomátidos (**Tabla R-3**); mientras que los potenciales transportadores de riboflavina del género *Phytomonas* fueron los que mostraron la menor similitud con *TcRibJ* (37,7 % – 39,9 %) (**Tabla R-3**).

Tabla R-2. Identificación de potenciales transportadores de riboflavina similares a *TcRibJ* en tripanosomátidos cuyos genomas fueron totalmente ensamblados. La identificación de putativos transportadores de riboflavina fue realizada comparando la secuencia de aminoácidos de *TcRibJ* con el genoma del correspondiente parásito, usando la base de datos TriTrypDB. El Porcentaje (%) de similitud entre *TcRibJ* y las secuencias identificadas fue obtenido por ClustalW.

Tripanosomátidos	Hospedador	Número de Acceso	% similitud con <i>TcRibJ</i>
Patógenos de humanos usados en esta tesis			
<i>T. cruzi</i>	<i>Homo sapiens</i> (Enfermedad de Chagas)	TcCLB.509885.70	100
<i>T. brucei</i>	<i>Homo sapiens</i> (Enfermedad del Sueño)	Tb927.5.470	62
<i>L. mexicana</i>	<i>Homo sapiens</i> (Leishmaniasis cutánea)	LmxM.05.0480	49
Patógenos de humanos y otros vertebrados no ensayados			
<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>Bubalus bubalis</i> (búfalo de agua)	TevSTIB805.5.460	62,5
<i>Trypanosoma congolense</i>	<i>Bos taurus</i> , <i>Bos indicus</i> , etc.	TcIL3000_0_01740	60,5

<i>Trypanosoma grayi</i>	<i>Glossina palpalis</i> (mosca Tse-Tse)	Tgr.1850.1000	76,1
<i>Trypanosoma rangeli</i>	<i>Homo sapiens</i> (sin síntomas)	TRSC58_01116	83,3
<i>Trypanosoma vivax</i>	<i>Bos Taurus</i>	TvY486_0500070	67,6
<i>Leishmania tropica</i>	<i>Homo sapiens</i> (Leishmaniasis cutánea)	LTRL590_050009300	49,8
<i>Leishmania aethiopica</i>	<i>Homo sapiens</i> (Leishmaniasis cutánea)	LAEL147_000064200	49,8
<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Homo sapiens</i> (Leishmaniasis cutánea)	LBRM2903_050010000	50,9
<i>Leishmania panamensis</i>	<i>Homo sapiens</i> (Leishmaniasis cutánea)	LPAL13_050009400	50,8
<i>Leishmania sp.</i> MAR LEM2494	<i>Homo sapiens</i> (Leishmaniasis cutánea)	LMARLEM2494_050009900	48,7
<i>Leishmania major</i>	<i>Homo sapiens</i> (Leishmaniasis cutánea)	LmjF.05.0480	49,8
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Homo sapiens</i> (Leishmaniasis visceral)	LdBPK_050480.1	49,7
<i>Leishmania infantum</i>	<i>Homo sapiens</i> (Leishmaniasis visceral infantil)	LinJ.05.0480	49,7
<i>Leishmania gerbilli</i>	<i>Rhombomys opimus</i> (gerbo)	LGELEM452_050009800	49,6
<i>Leishmania turanica</i>	<i>Rhombomys opimus</i> (gerbo)	LTULEM423_050009600	50
<i>Leishmania arabica</i>	<i>Psammomys obesus</i> (roedores)	LARLEM1108_050009800	49,5
<i>Leishmania tarentolae</i>	<i>Tarentola mauritanica</i> (lagartija)	LtaP05.0490	49,2
<i>Leishmania enriettii</i>	Roedores	ENLEM3045_050009900	48,1
Parásitos no patógenos de humanos			
<i>E. monterogeii</i>	<i>Choloepus hoffmanni</i> (mamíferos)	EMOLV88_050009300	50,5
<i>C. fasciculata</i>	<i>Anopheles quadrimaculatus</i> (mosquito)	CFAC1_020011500	51,9
<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	<i>Pyrrhocoris apterus</i> (insecto)	LpyrH10_07_0560	52,6
<i>Leptomonas seymouri</i>	<i>Dysdercus suturellus</i> (insecto)	Lsey_0441_0040	52,4

Por otro lado, solamente en algunos de ellos (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. grayi* y *L. braziliensis*) fue posible distinguir 2 alelos para este gen, tal como sucede en *T. cruzi*; mientras que en el resto de los tripanosomátidos enlistados en la **Tabla R-2**, solamente se encontró un único alelo.

Tabla R-3. Identificación de potenciales transportadores de riboflavina similares a TcRibJ en tripanosomátidos cuyos genomas fueron parcialmente ensamblados. La identificación de putativos transportadores de riboflavina fue realizada comparando la secuencia de aminoácidos de TcRibJ con el genoma del correspondiente parásito, usando la base de datos *Assembly* de NCBI. El Porcentaje (%) de similitud entre TcRibJ y las secuencias identificadas fue obtenido por ClustalW.

Tripanosomátidos	Hospedador	Número de Acceso (contig o scaffold)	% similitud con TcRibJ	Referencia
<i>Leishmania peruviana</i>	<i>Homo sapiens</i> Leishmaniasis visceral	LN609254.1	50,8	Valdivia et al. 2015)
<i>Trypanosoma equiperdum</i>	Equinos (Enfermedad venérea)	CZPT01000402	62,5	NP
<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Ornidia obesa</i> (mosca)	AUXL01001118	55,4	(Alves et al. 2013)
<i>Angomonas deanei</i>	<i>Zelus leucogrammus</i> (hemípteros)	AUXM01000876	56,6	(Alves et al. 2013)
<i>Lotmaria passim</i>	<i>Apis mellifera</i> (abejas)	AHIJ01002325	50,2	Runckel et al. 2014)
<i>Crithidia acanthocephali</i>	<i>Acanthocephala femorata</i> (mosca)	AUXI01000737	51,5	(Alves et al. 2013)
<i>Herpetomonas muscarum</i>	<i>Musca domestica</i> (mosca)	AUXJ01001726	49,8	(Alves et al. 2013)
<i>Strigomonas oncopelti</i>	<i>Zelus leucogrammus</i> (hemípteros)	AUXK01003753	50,4	(Alves et al. 2013)
<i>Strigomonas galati</i>	-	AUXN01003492	50,9	(Alves et al. 2013)
<i>Strigomonas culicis</i>	<i>Aedes vexans</i> (mosquito)	AUXH01000639	52,6	(Alves et al. 2013)
<i>Phytomonas serpens</i> 9T	<i>Solanum lycopersicum</i> (aislado del tomate)	AIHY01002387	38,1	(Koreny et al. 2012)
<i>Phytomonas</i> sp. isolate Hart1	Patógeno aislado de floema de la planta de coco	HF955203 CAVR020000000*	37,7	(Porcel et al. 2014)
<i>Phytomonas</i> sp. isolate EM1	Aislado de látex de <i>Euphorbia</i>	HF955064 CAVQ010000000*	39,9	(Porcel et al. 2014)

NP: No Publicado

Identificación de potencial transportador de riboflavina en el genoma de otros kinetoplástidos

De acuerdo con los análisis filogenéticos basados en el estudio del ARN ribosomal 18S (subunidad pequeña), todos estos tripanosomátidos se agrupan en el Orden Trypanosomatida que, junto con los Ordenes Eubodonida (como *Bodo saltans*), Parabodonida (como *Trypanoplasma borreli*),

Neobodonida (como *Azumiobodo hoyamushi*) y Prokinetoplastida (como *Perkinsela* sp.) forman la Clase Kinetoplastea (Avila-levy et al. 2015).

En la actualidad, solo se secuenciaron y ensamblaron parcialmente los genomas del eubodonido *B. saltans*, del parabodonido *T. borreli* y del prokinetoplastido *Perkinsela* sp., y hasta el momento no se cuenta con genomas de representantes del Orden Neobodonida.

De esta manera, se decidió buscar posibles transportadores de riboflavina (similares a *TcRibJ*) en los genomas de *B. saltans*, *T. borreli* y *Perkinsela* sp. Los dos primeros tienen su genomas depositados en la base de datos del *Trust Sanger Institute* (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/>), mientras que el genoma correspondiente a *Perkinsela* sp. se localiza en la base *Assembly* de NCBI.

En todos estos kinetoplástidos se identificaron posibles transportadores con cierto grado de similitud a *TcRibJ* (**Tabla R-4**). De estos 3 kinetoplástidos, *B. saltans* mostró el porcentaje de similitud más alto (39,9 %), similar al que se obtuvo para otros tripanosomátidos (como los del género *Phytomonas*). En el otro extremo, el posible transportador de *Perkinsela* sp. encontrado tuvo el menor valor de similitud con *TcRibJ* (14,2 %), de manera tal que su carácter de potencial transportador de riboflavina resulta controversial.

Tabla R-4. Identificación de potenciales transportadores de riboflavina similares a *TcRibJ* en otros kinetoplástidos. La identificación de putativos transportadores de riboflavina fue realizada comparando la secuencia de aminoácidos de *TcRibJ* con el genoma del correspondiente kinetoplástido, usando la base de datos del Instituto Sanger. El Porcentaje (%) de similitud entre *TcRibJ* y las secuencias identificadas fue obtenido por ClustalW.

Kinetoplástidos	Hospedador	Número de Acceso	% similitud con <i>TcRibJ</i>	Referencia
<i>Bodo saltans</i>	Kinetoplástido de vida libre	BS47350 (19978338:19979612)	39,9	(Jackson et al. 2008)
<i>Trypanoplasma borreli</i>	Peces ciprínidos	NODE_24555_length_1382_cov_9.405933	28,2	NP
<i>Perkinsela</i> sp.	Amebas marinas	KNH06566.1	14,2	(David et al. 2015)

NP: No Publicado

Avanzando con los estudios *in silico*, se decidió realizar un BlastP-recíproco. Brevemente, esta estrategia se basa en que el mejor *hit* obtenido como resultado de una ronda de BlastP, se utiliza como *query* para una segunda ronda de BlastP. Muchos autores destacan a esta estrategia por permitir encontrar posibles genes ortólogos, es decir genes que divergieron después de un evento de especiación y, por lo tanto, comparten un ancestro en común (Ward & Moreno-Hagelsieb 2014).

Con esta estrategia de BlastP-recíproco, las secuencias de potenciales RibJ encontradas en los diversos kinetoplastos (**Tabla R-2, Tabla R-3 y Tabla R-4**) se utilizaron como *query* y se compararon con el genoma de *T. cruzi* depositado en la base de datos de TriTrypDB. Todas las secuencias de RibJ analizadas, con excepción del transportador de *Perkinsela* sp., tuvieron como el mejor *hit* a las 2 secuencias de TcRibJ (TcCLB.509885.70 y TcCLB.508397.70, con *e-value* < 1×10^{-85}). En el caso del transportador de *Perkinsela* sp. se obtuvieron secuencias de posibles transportadores de azúcares de *T. cruzi* (TcCLB.505183.130 y TcCLB.508465.40, *e-value*: 2×10^{-4}), por lo que no se correspondería con un potencial transportador de riboflavina y se excluyó de los análisis posteriores.

Nueva familia de transportadores de riboflavina en kinetoplástidos: aproximaciones estructurales y filogenéticas de sus secuencias

A partir del hallazgo de potenciales transportadores de riboflavina en los distintos kinetoplástidos, realizamos un análisis de sus secuencias para identificar posibles características estructurales, funcionales y evolutivas comunes a dichas proteínas.

Búsqueda de posibles segmentos hidrofóbicos en las secuencias proteicas de RibJ

En los parásitos *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana*

Se analizó si la secuencia de las proteínas RibJ de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana* presentaban características de proteínas transmembrana. Para esta predicción se realizó un alineamiento múltiple de dichas secuencias con Mch5p de *S. cerevisiae* (algoritmo MUSCLE) y se identificaron posibles pasos transmembrana (algoritmo TM-Coffee) (**Figura R-16**).

Mediante este análisis se encontró que los RibJ de estos 3 tripanosomátidos presentan 12 putativos pasos transmembrana, plegados en α -hélice, los cuales alinearon con gran exactitud con los predichos en Mch5p (Reihl & Stolz 2005). Además, los pasos transmembrana de estos RibJs se encontraron altamente conservados, aunque algunos de ellos difirieron levemente en la longitud (como TM3, TM4 y TM12) (**Figura R-16**). Diferencias observadas entre estas secuencias RibJ y Mch5p incluyeron, por un lado, un largo extremo N-terminal (de 108 aminoácidos) en el transportador de riboflavina de *S. cerevisiae* ausente en los RibJ (**Figura R-16**, caja amarilla); por otro lado, los RibJ mostraron un extenso dominio citosólico entre los pasos transmembrana 6 y 7 (**Figura R-16**, caja verde), faltante en Mch5p. Este dominio citosólico fue altamente variable entre los RibJs no solo a nivel de secuencia, sino también en longitud: en *LmiRibJ* y *TbRibJ*, este dominio tuvo 142 y 122 aminoácidos de largo, respectivamente; mientras que *TcRibJ* tuvo solamente 70 aminoácidos.

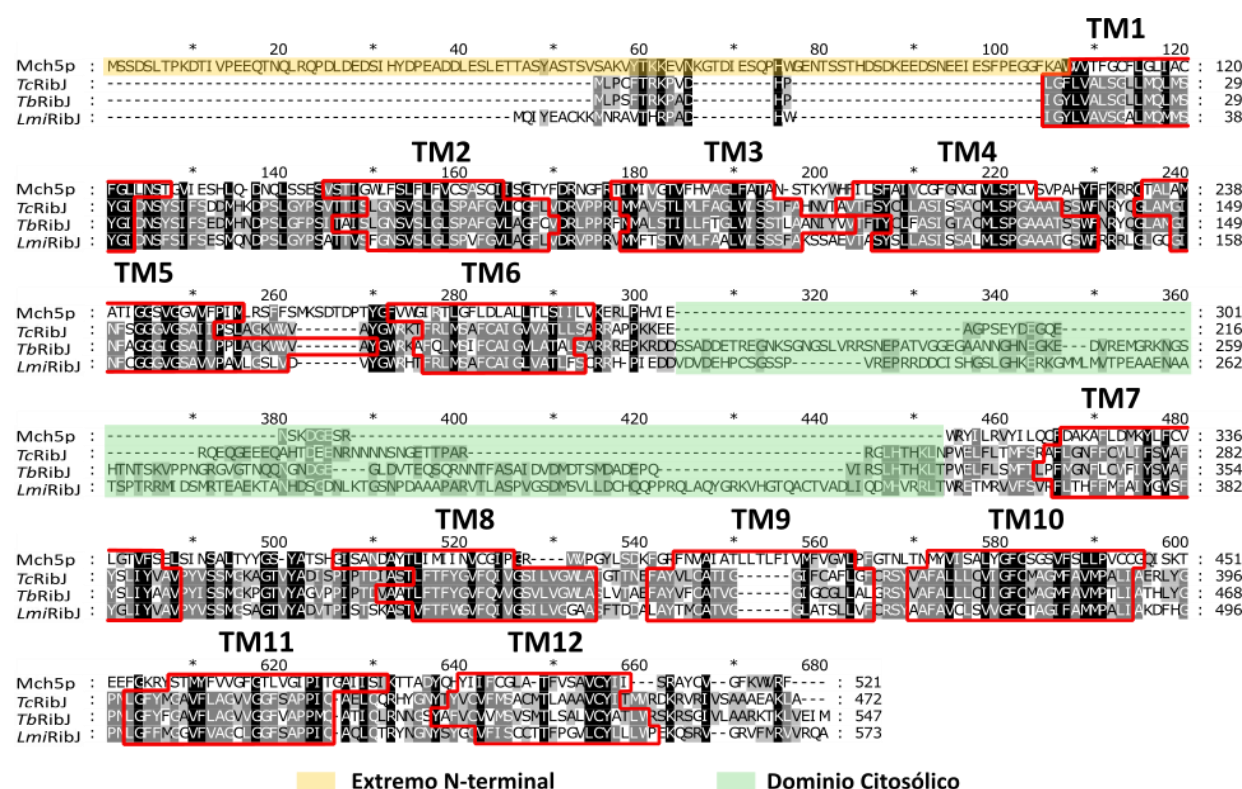


Figura R-16. Alineamiento múltiple entre las secuencias de Mch5p, TcRibJ, TbRibJ y LmiRibJ. El alineamiento múltiple fue realizado con el algoritmo MUSCLE, gracias al cual se muestran los niveles de conservación de aminoácidos (en negro: 100 %, en gris oscuro: 75 % y en gris claro: 50 % de las secuencias). La predicción de los pasos transmembrana (cajas rojas) se realizó con el algoritmo TM-Coffee.

En el resto de los kinetoplástidos analizados

Paralelamente, se realizó el mismo análisis utilizando el resto de las secuencias de RibJ identificadas en este trabajo. En la gran mayoría de estas secuencias se predijeron 12 putativos pasos transmembrana (**Figura R-17**), pero en algunos casos solo se predijeron 11 de estos pasos: *S. galati* (carece del TM1), *L. seymouri* (faltante del TM12) y *Phytomonas* sp. EM1 (no se detectó el TM6); mientras *T. borreli* mostró 13 segmentos transmembrana (un dominio más ubicado entre los TM7 y TM8). Además, en todas estas secuencias se observó la presencia de un posible dominio citosólico, variable en longitud (desde 45 aminoácidos en *B. saltans*, hasta 163 en varias especies de *Leishmania*).

En estos resultados, la conservación de aminoácidos se representó en modo LOGO, donde la altura de cada uno de los residuos muestra la frecuencia relativa de cada uno de ellos en una determinada posición (**Figura R-17**). De esta manera, se observó que estos RibJ tuvieron 2 zonas de alta conservación (la primera entre las posiciones 1 – 208, y la otra en la región 378 – 565), separadas por una zona altamente variable, correspondiente al dominio citosólico.

Utilizando ambos análisis anteriores, se observó que en todas las secuencias de RibJ, los pasos transmembrana se distribuyeron entre las zonas más conservadas de la proteína. Los mismos se componen de trectos de aminoácidos conteniendo grupos polares (como tirosina, treonina, serina, cisteína, asparagina y glutamina), glicinas y trectos de aminoácidos hidrofóbicos (leucina, valina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina, triptofano), que se alternan entre sí.

Por otra parte, los aminoácidos cargados positivamente (como lisinas, argininas, histidinas) y negativamente (aspartatos y glutamatos) se encontraron principalmente en las secuencias entre los pasos transmembrana y en el dominio citosólico (**Figura R-17**).

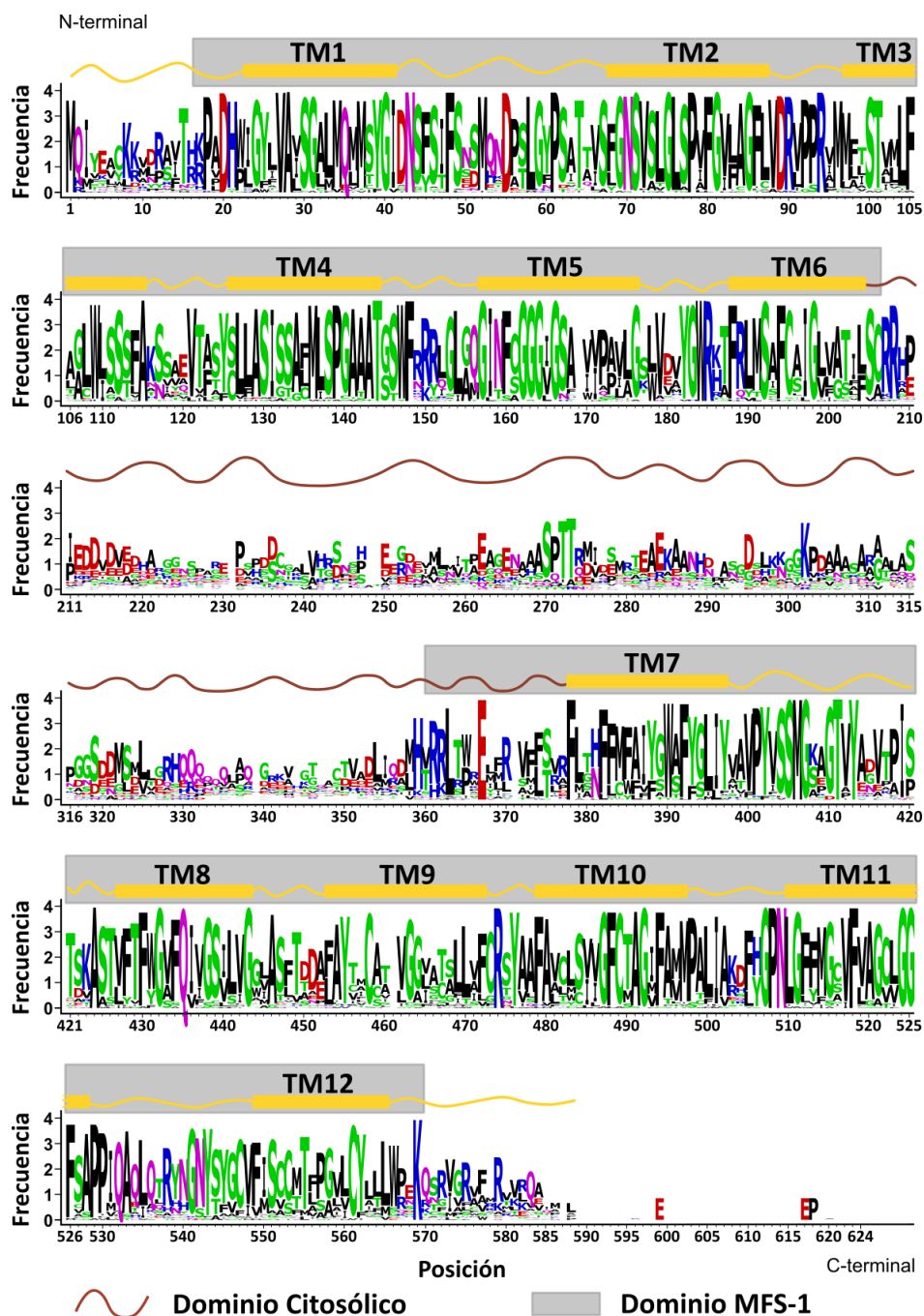


Figura R-17. Alineamiento múltiple de las secuencias de RibJ representado en la forma LOGO. El alineamiento múltiple se realizó con el algoritmo MUSCLE, y con la representación en forma LOGO, se resaltan los aminoácidos más conservados (en códigos de una letra) y las propiedades de los mismos (en verde, aminoácidos con grupos polares –serina, treonina, tirosina y cisteína - y glicina; en negro, aminoácidos hidrofóbicos – valina, alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptofano, metionina, prolina; en rojo, aminoácidos con carga negativa - aspartato y glutamato; en azul, aminoácidos con carga positiva – histidina, arginina y lisina -; y en violeta, aminoácidos con grupos amida -asparagina y glutamina). Los pasos transmembrana se predijeron con el algoritmo TM-Coffee

(cajas amarillas), mientras el dominio citosólico se representa con un *loop* marrón. La identificación de dominios MFS-1 (cajas grises) se realizó con la base de datos *Superfamily*.

Identificación de posibles dominios proteicos MFS (*Major Facilitator Superfamily*) en RibJ

Se decidió analizar la presencia de dominios proteicos conocidos en las secuencias de *TcRibJ*, *TbRibJ* y *LmiRibJ* (comparando con Mch5p), y así obtener más evidencias acerca de la función de estas proteínas en estos patógenos. Para ello, se utilizó el consorcio InterPro, utilizando los modelos predictivos provenientes de diferentes bases de datos: PFAM de EMBL-EBI, CDD de NCBI, y *Superfamily*.

Cabe destacar que, debido a los diferentes enfoques predictivos de estas bases de datos, los resultados fueron levemente distintos. En la **Figura R-18**, se muestran los resultados obtenidos según la base de datos *Superfamily*, a partir de la cual se distinguieron 2 posibles dominios MFS-1 (caja azul, *e-value*: $1,27 \times 10^{-53}$, $1,44 \times 10^{-50}$ y $2,35 \times 10^{-50}$, para *TcRibJ*, *TbRibJ* y *LmiRibJ*, respectivamente). Estos dominios se localizaron en las zonas conservadas descritas anteriormente (**Figura R-16** y **Figura R-17**) y estarían conformadas por los pasos transmembrana. Estos dominios MFS-1 están separados por el dominio citosólico (**Figura R-18**, caja verde).

Este mismo análisis fue aplicado al resto de las secuencias de RibJ. Nuevamente, con la base *Superfamily* se identificaron 2 potenciales dominios MFS-1 en cada una de las secuencias, con excepción del RibJ de *B. saltans*, que mostró un único dominio MFS-1 en toda su longitud (*e-value* en todos los RibJ en un rango entre $3,01 \times 10^{-43}$ y $3,92 \times 10^{-54}$) (**Figura R-17**, caja gris).

Esta distribución es característica de las proteínas perteneciente a la familia MFS, donde sus 12 pasos transmembrana son separados en 2 grupos de 6, y las estructuras de estos sub-dominios resultan altamente simétricas, condición esencial para su funcionamiento (Yan 2013). Un ejemplo de esta disposición de dominios MSF-1 se observa en el transportador de glicerol de *E. coli*, GlpT, cuya estructura tridimensional fue determinada experimentalmente (Huang et al. 2003).

Por otra parte, cabe destacar que el transportador de riboflavina Mch5p difiere en cuanto a esta distribución de dominios dado que, con los mismos análisis, solamente mostró un único y extenso dominio MSF-1 (**Figura R-18**).

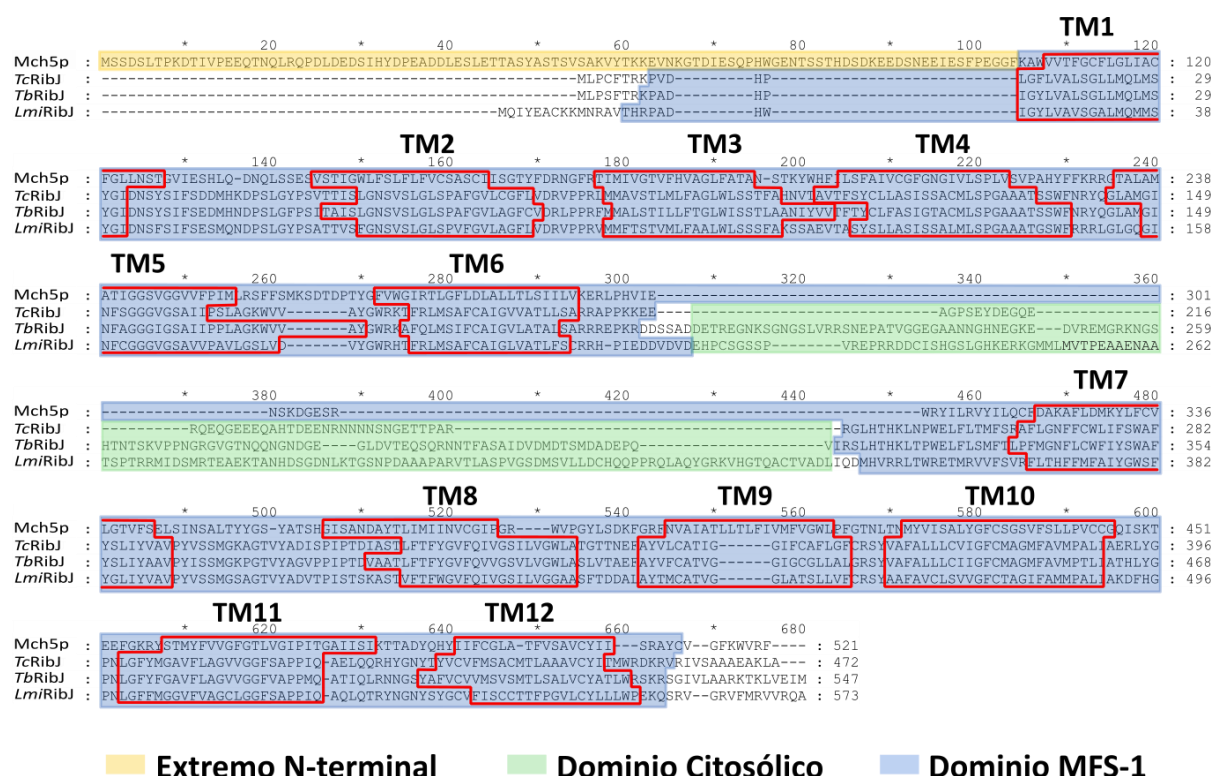


Figura R-18. Identificación de putativos dominios MFS-1 en las secuencias *TcRibJ*, *TbRibJ* y *LmIRibJ*. En este caso, solo se representan los resultados obtenidos con las base de datos *Superfamily*. Los dominios MFS-1 se resaltaron con las cajas azules y el dominio citosólico con la caja verde; mientras el extremo N-terminal de Mch5p se distingue en amarillo.

Por otra parte, los resultados obtenidos con la base de datos CDD fueron similares a los anteriores. Pero en el caso de la base de datos PFAM, utilizando la totalidad de la secuencia de cualquiera de estos RibJ solamente se obtuvo el dominio MSF-1 localizado del N-terminal, siendo poco sensible para distinguir el dominio MSF-1 de la zona C-terminal.

Las evidencias bioinformáticas, desde la leve similitud con el transportador de riboflavina Mch5p, como la presencia de pasos transmembrana organizados en 2 dominios MFS-1, tal como sucede con el transportador GlpT de *E. coli* (Huang et al. 2003), reforzaron la idea de RibJ como potencial transportador de riboflavina en varios kinetoplástidos.

Sin embargo, a partir de estos análisis, se excluyó al prokinetoplástido *Perkinsella* sp. ya que no fue posible encontrar un potencial transportador de riboflavina similar a RibJ en su genoma.

Análisis filogenético de RibJ en kinetoplástidos

Se realizó un análisis filogenético con el fin de determinar las relaciones evolutivas entre todas las secuencias de RibJ identificadas en kinetoplástidos (Clase Kinetoplastea). Para estas inferencias, se utilizó el programa MEGA6 aplicando el método estadístico de máxima verosimilitud con el modelo evolutivo descrito por Le and Gascuel et al. (Le & Gascuel 2008). De este modo se obtuvo un árbol filogenético (Ln de verosimilitud = -8878,02) en el que se presentaron 2 grupos: uno abarcando a las especies del orden Tripanosomatida y otro conteniendo a las especies relacionadas *B. saltans* y *T. borreli* (**Figura R-19**). Más aún, se observó que RibJ tuvo un origen común dentro de este orden y sufrió múltiples diversificaciones asociadas a cada uno de los géneros.

La mayoría de estos parásitos también se agruparon de forma monofilética (coincidentalmente con (Votýpka et al. 2015): *Phytomonas* (parásito de plantas), *Strigomonas*, *Angomonas* (parásitos conteniendo bacterias como endosimbiontes) y *Leishmania* (patógenos de humanos), siendo el primero de ellos el grupo que mostró una mayor diferencia (mayor número de cambios por sitio) que el resto (**Figura R-19**). Por otra parte, el grupo abarcando los géneros *Crithidia*, *Lotmaria* y *Leptomonas* resultó polifilético, resultado concordante con Votýpka et al. (Votýpka et al. 2015), quienes trabajaron sobre las secuencias de la subunidad ribosomal pequeña.

Si bien, como consecuencia del bajo número de representantes, no se pueden obtener muchas conclusiones acerca de los géneros de *Endotrypanum* y *Herpetomonas*, su cercanía respectiva con los géneros *Leishmania* y *Phytomonas* ha sido ampliamente reportada (Flegontov et al. 2013), coincidiendo con nuestros resultados (**Figura R-19**).

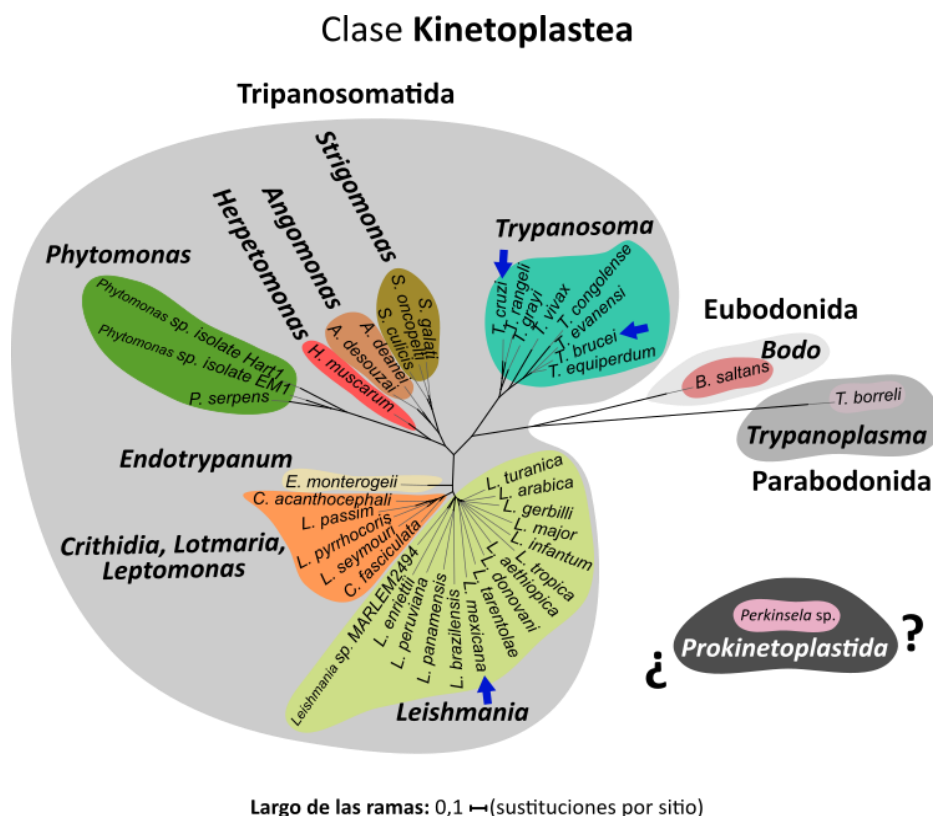


Figura R-19. Árbol filogenético de las secuencias de RibJ de kinetoplástidos (Clase Kinetoplastea) basados en el método de máxima verosimilitud. Las inferencias evolutivas de RibJ se realizaron con el programa MEGA6, utilizando la matriz de sustituciones de aminoácidos establecida por Le and Gascuel et al. (Le & Gascuel 2008) como modelo evolutivo. El árbol obtenido (Ln de verosimilitud = -8878,02) mostró las relaciones evolutivas de las secuencias de RibJ de los 38 tripanosomátidos, 1 eubodonido (*B. saltans*) y 1 parabodonido (*T. borreli*), con un soporte de *bootstrap*: 1000 (valores no mostrados). Las flechas azules indican la secuencia de RibJ de los parásitos *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana*. El prokinetoplastido *Perkinsela* sp. se incluye con el fin de representar su pertenencia a la clase Kinetoplastea pero sin secuencias similares a RibJ.

Análisis filogenético de la secuencia de RibJ comparando con transportadores de riboflavina identificados previamente

A partir de varios representantes de los transportadores de riboflavina identificados experimental o bioinformáticamente, se construyó un árbol filogenético con el método de Neighbor-Joining. El método de Neighbor-Joining, a diferencia del método de máxima verosimilitud, no utiliza modelos evolutivos sino que el agrupamiento se basa en la similitud entre las secuencias, y la cantidad de cambios por sitio (largo de la rama) se computó usando la matriz de Dayhoff (matriz general conteniendo las probabilidades de sustitución de aminoácidos).

En el árbol filogenético así construido la mayoría de las secuencias de transportadores de riboflavina se agruparon de acuerdo a la familia a la que pertenecen (**Figura R-20**).

Por otra parte, las secuencias de RibJ en kinetoplástidos se agruparon en una nueva familia, diferente a las identificadas en otros organismos (**Figura R-20**). Estos RibJ mostraron un acercamiento con el grupo formado por los transportadores Mch5p de hongos y levaduras y, a la vez, estuvieron muy alejados de los transportadores caracterizados en vertebrados. Sorprendentemente, ambas familias (RibJ y Mch5p) resultaron más similares a transportadores de riboflavina de bacterias que con los descritos en eucariotas (**Figura R-20**).

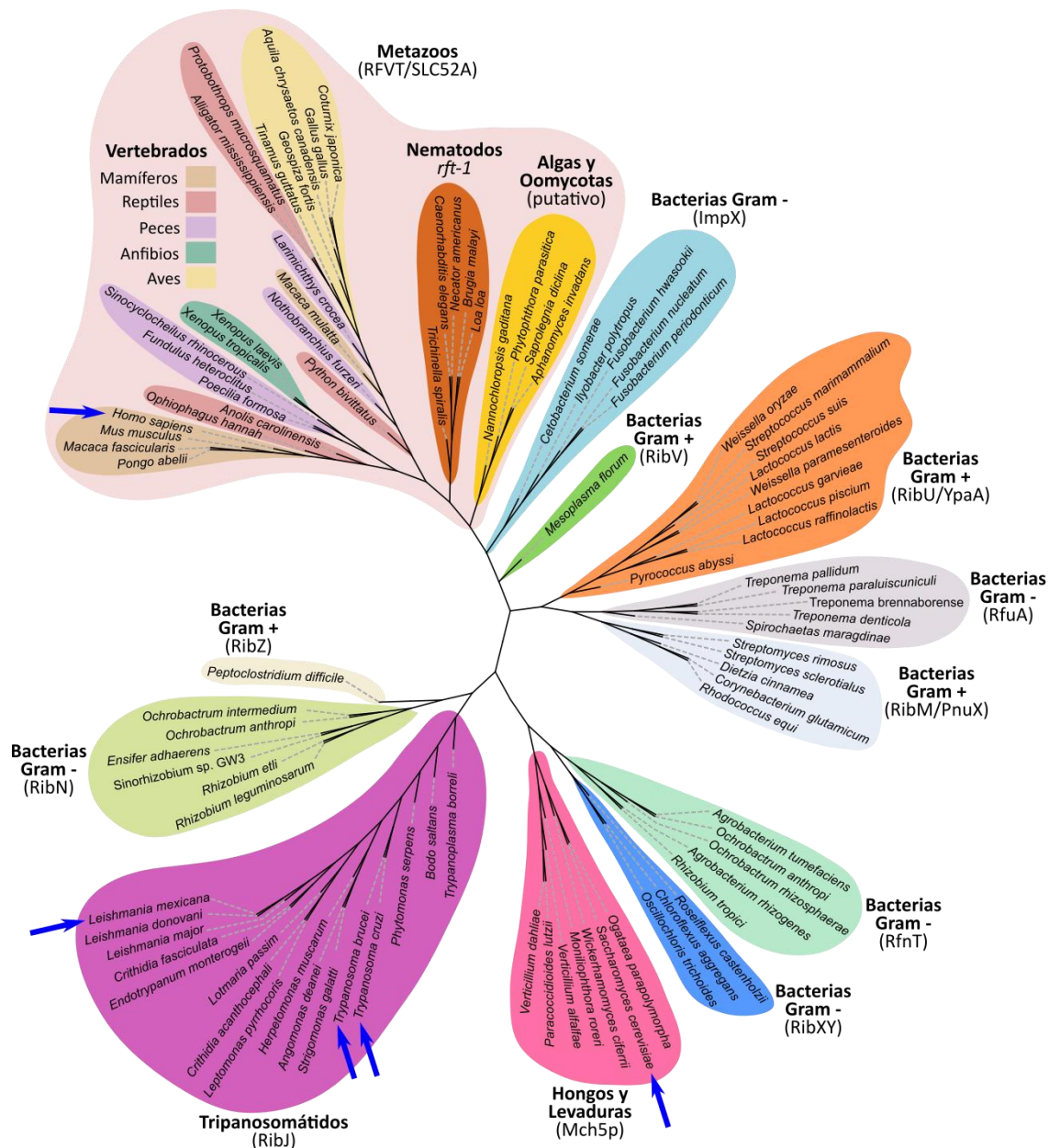


Figura R-20. Representación del árbol filogenético de diversos transportadores de riboflavina, obtenido por el método de Neighbor-Joining. Se utilizaron las secuencias de los transportadores de riboflavina identificados experimental o bioinformáticamente. Para la construcción del árbol se empleó el método de Neighbor-Joining con el programa MEGA6, con un soporte de *bootstrap*: 1000 (valores no mostrados). Las flechas azules señalan a los tripanosomátidos *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana*, la levadura *S. cerevisiae* y al mamífero *Homo sapiens*.

Búsqueda de secuencias con similitud a RibJ en otros organismos

Para identificar otros posibles transportadores pertenecientes a la novel familia RibJ, se construyó un Modelo Oculto de Markov de esta familia, y se comparó con la base de datos UniprotKB usando el algoritmo hmmsearch del server HMMER. De esta manera se obtuvieron 13.693 secuencias con cierto grado de similitud a RibJ. Aplicando diversos filtros, el número de secuencias se redujo a 329 (incluidas las de RibJ) (**Apéndice 3**). Entre estas secuencias, se destacan las de:

- diversos metazoos como vertebrados, insectos, nematodos, platelmintos, moluscos y protozoos donde las secuencias pertenecen, mayoritariamente, a la familia MCT (*MonoCarboxilate Transporter*/SLC16A);
- hongos y levaduras (familia MCH), incluyendo tanto las secuencias anotadas como transportadores de monocarboxilatos como los transportadores de riboflavina Mch5p;
- bacterias y arqueas, principalmente secuencias anotadas con dominios MFS y de función desconocida y, en menor medida, transportadores de: oxalato/formato, de nitrato/nitrito, de cianato, de sulfoacetato, de hexanuratos, de manuronatos y de azúcares.

Cabe destacar que, con excepción de algunos transportadores MCTs de humanos (MCT1-4 y 8 (Adijanto & Philp 2012)) y de Mch5p de *S. cerevisiae* (Reihl & Stolz 2005), al resto de las secuencias se les asignó una función predicha por análisis bioinformáticos quedando a la espera de ser corroborada experimentalmente, según la base UniprotKB (<http://www.uniprot.org/>).

Posteriormente, con todas las secuencias identificadas se construyó un árbol filogenético por el método de Neighbor-Joining para determinar si alguna de ellas pertenecía a la novel familia RibJ de kinetoplástidos. A pesar de que todas habían mostrado un cierto grado de similitud a los transportadores RibJ, ninguna de estas secuencias se incluyó dentro de esta novel familia. Estos resultados reforzaron la idea de que estos putativos transportadores de riboflavina RibJ son exclusivos de kinetoplástidos (**Figura R-21**).



Figura R-21. Representación del árbol filogenético de diversas secuencias obtenidas con el HMM de RibJ. Para la construcción del árbol se empleó el método de Neighbor-Joining con el programa MEGA6, con un soporte de *bootstrap*: 100 (valores no mostrados). Las flechas azules señalan a las secuencias de RibJ de *T. cruzi*, *T. brucei* y varias especies de *Leishmania*, al Mch5p de la levadura *S. cerevisiae* y a los transportadores MCT-1, -2, -5, -8, -9, 12-14 humanos. En el grupo Procariotas, si bien la mayoría de las secuencias corresponden a transportadores de oxalato/formato antiporter, también se utilizaron transportadores con una actividad predicha diferente (resultados en color). Los asteriscos rojos señalan las secuencias correspondientes a arqueas.

Comparación de las secuencias de RibJ con los transportadores de monocarboxilatos de humanos

Debido a que los transportadores RibJ fueron inicialmente identificados como transportadores de monocarboxilatos por la alta similitud con los de mamíferos, y dado que nuestros análisis bioinformáticos los muestran cercanos, se analizó si RibJ tiene características particulares de la familia MCT de humanos.

Para ello, se realizó un alineamiento múltiple entre varias secuencias de RibJ (*TcRibJ*, *TbRibJ*, *LmiRibJ* y *LmjRibJ* de *L. major*) junto con los transportadores de monocarboxilatos MCT1 a 4 de humanos (verificados experimentalmente) y MCT5 (sin actividad detectada). Como se muestra en la **Figura R-22**, estas familias coinciden a nivel de estructura secundaria pues presentan 12 de pasos transmembrana (predichos por TM-Coffee, y en acuerdo con lo descrito en literatura para MCT (Adijanto & Philp 2012)), con excepción de MCT1 en el que solo se identificaron 11 TMs. Además, estos dominios transmembrana mostraron posiciones similares en sus secuencias.

Por otra parte, se resaltaron varias características de MCT1-4 como:

- aminoácidos esenciales para la funcionalidad de MCT1-4, como la Lisina 38 (K), Aspartato 302 (D), Arginina 306 (R) y Fenilalanina/Tirosina 360 (F/Y) (**Figura R-22**, flechas verdes);
- 2 motivos altamente conservados en estos transportadores: [D/E]G[G/S][W/F][G/A]W en TM1 y YFxK[R/K][R/L]xLx[G/A]xAxAG en TM5 (**Figura R-22**, cajas azules) (Halestrap & Meredith 2004).

Como puede observarse, la familia RibJ carece de todos esos aminoácidos esenciales para el transporte de monocarboxilatos, donde K38→N (Asparagina), D302→Q (Glutamina), R306→S (Serina) y F/Y360→M/T (Metionina/Treonina), los cuales también resultaron ausentes en el inactivo MCT5, con excepción de K38 (**Figura R-22**). Finalmente, en RibJ se encontraron solo

algunos de los aminoácidos de los motivos característicos de MCT (Figura R-22). De esta manera, estos resultados sugieren que RibJ y MCT son familias diferentes.

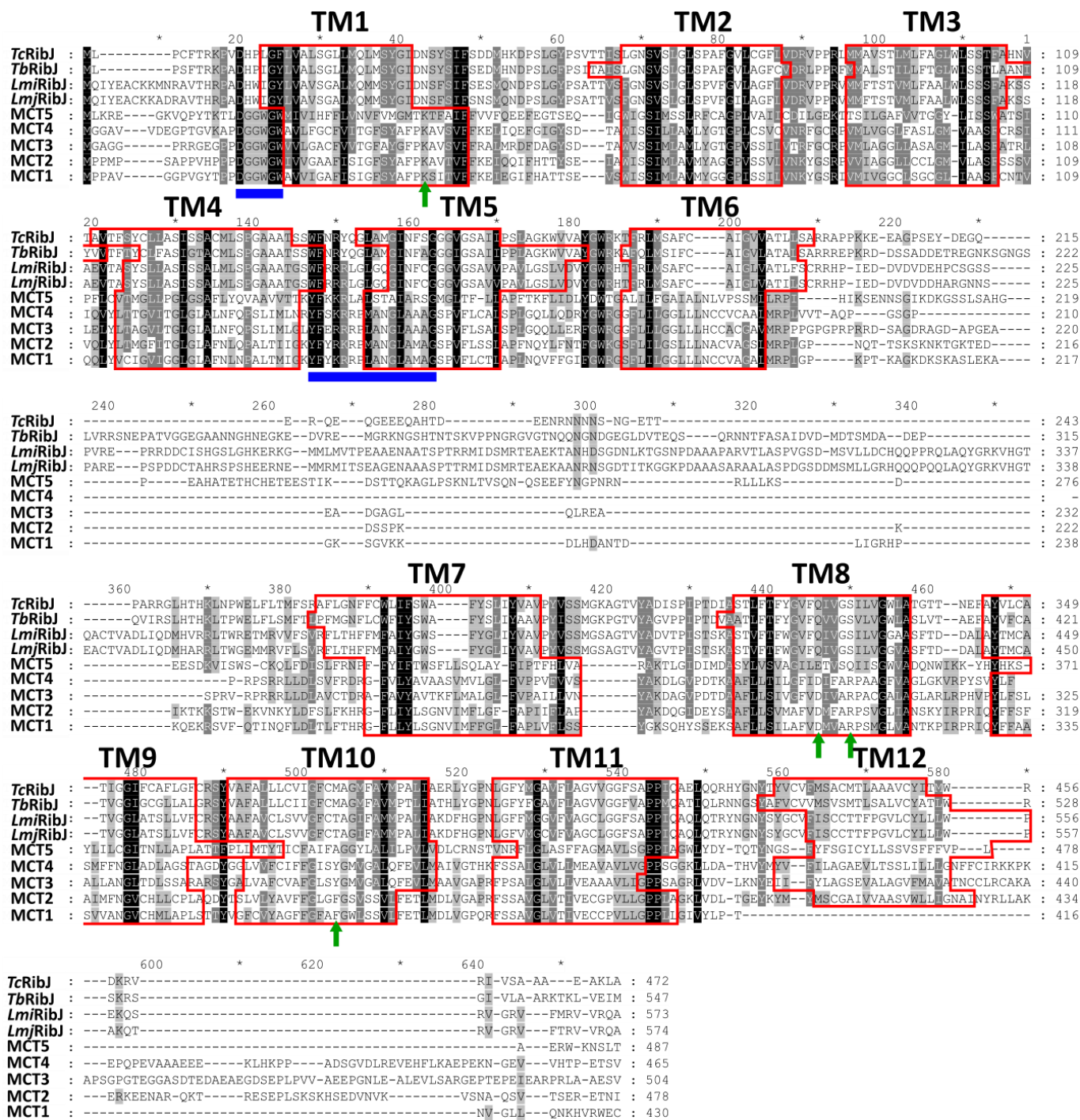


Figura R-22. Comparación entre proteínas de la familia MCT de humanos y de la familia RibJ. El alineamiento múltiple por MUSCLE se realizó utilizando las secuencias de MCT1-5 de humanos y TcRibJ, TbRibJ, LmiRibJ y LmjRibJ de *L. major*. La predicción de los pasos transmembrana en ambas familias se realizó con TM-Coffee (cajas rojas). Las flechas verdes indican los aminoácidos esenciales

para el transporte de monocarboxilatos de MCTs, mientras las cajas azules indican motivos altamente conservados de la misma familia (Adijanto & Philp 2012; Halestrap & Meredith 2004).

Modelado Estructural del Transportador de Riboflavina *TcRibJ*

Las primeras estructuras tridimensionales de transportadores resueltas fueron la del transportador GlpT (de glicerol) y la de la permeasa LacY (de lactosa) de *E. coli*; y hasta la fecha, este número de transportadores bacterianos fue incrementándose. Recientemente, también se logró resolver estructuras de transportadores de eucariotas como de glucosa (GLUT1 de humanos), de nitrito (NRT1.1 de plantas) y de fosfato (PiPT de hongos) (Yan 2013).

Si bien en kinetoplástidos se identificaron diversos transportadores a nivel molecular, sus estructuras aún no fueron determinadas experimentalmente. Varios autores obtuvieron modelos estructurales para algunos transportadores de kinetoplástidos (como *LdNT2*, *LdNT1.1* de *L. donovani*, *TbNBT1* de *T. brucei*, y *TcPOT1.1* de *T. cruzi*), mediante diversas estrategias computacionales (Valdes et al. 2014; Valdes et al. 2009; Papageorgiou et al. 2008; Arastu-Kapur et al. 2005; Soysa et al. 2013). De esta manera, los autores pudieron seleccionar y evaluar aquellos aminoácidos que estuvieran involucrados en la unión a ligando, en el mecanismo de transporte, de sensibilidad a análogos, etc.

Para la construcción de un modelo estructural de *TcRibJ* basados en métodos de homología (basado en que secuencias similares tendrían estructuras terciarias parecidas), se utilizaron los servidores Phyre2 y Robetta. Inicialmente, ambos programas buscan homólogos remotos definidos como aquellos que tienen un porcentaje de identidad menor al 20 % con la secuencia de interés. Con ambos programas se identificó al transportador GlpT de *E. coli* como homólogo remoto de *TcRibJ*.

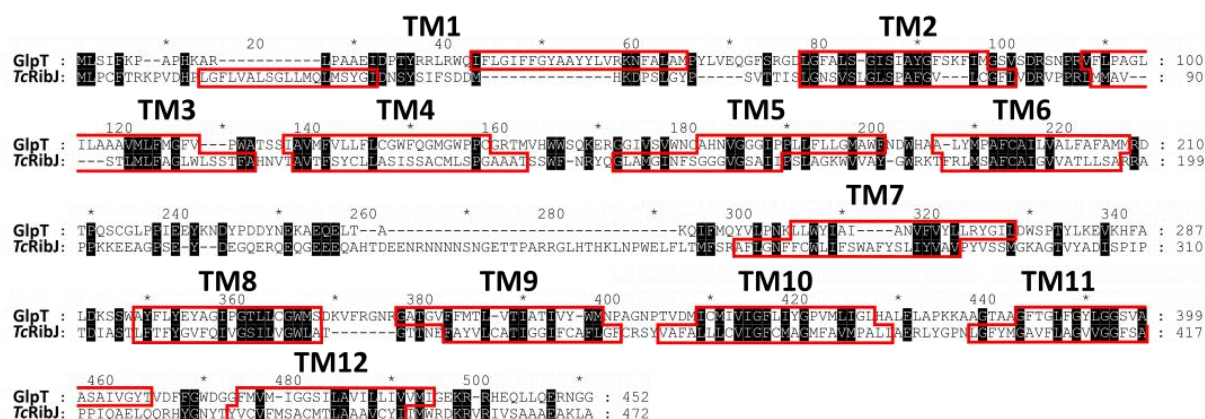
A su vez, este resultado fue contrastado con los resultados obtenidos con el programa HHpred, diseñado para buscar homólogos remotos. Gracias a este programa se obtuvieron varios transportadores de la familia MFS como homólogos remotos, y entre ellos, el que mejor alineó con *TcRibJ* fue el transportador GlpT de *E. coli* (*e-value*: $1,1 \times 10^{-19}$, probabilidad de homología de secuencia y de estructura secundaria: 99,8 %). En la **Figura R-23A** se representa el alineamiento entre GlpT y *TcRibJ* (16,2 % de identidad), y sus correspondientes pasos transmembrana.

De esta manera, se corroboró la homología remota obtenida con los servidores Phyre2 y Robetta, por lo que la estructura de GlpT fue un templado interesante para estimar la estructura de *TcRibJ*. La estructura del transportador GlpT propuesto (Huang et al. 2003) tiene 2 dominios bien definidos: N-terminal y C-terminal (**Figura R-23B**, resaltados en azul y verde, respectivamente), con 6 pasos transmembrana cada uno; sin embargo, el dominio citosólico, que une los dominios N- y C-terminal, mostró altos niveles de desorden por lo que no pudo resolverse (**Figura R-23B y C**, en color naranja) (Huang et al. 2003).

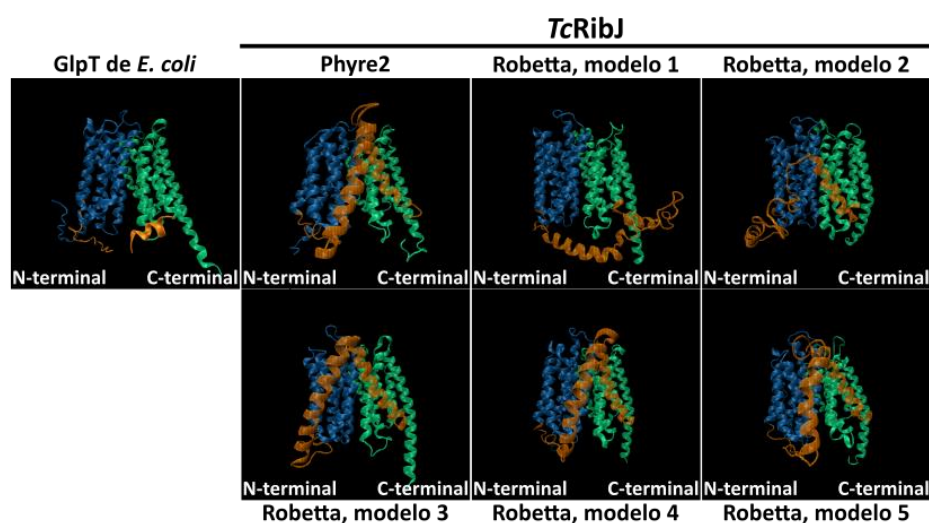
Tal como se esperaba, los modelos de *TcRibJ* (**Figura R-23B y C**) mostraron los dominios N-terminal y C-terminal claramente distinguibles (indicados en azul y verde, respectivamente), separados por un dominio citosólico no resuelto (resaltado en naranja). La confianza (probabilidad que el alineamiento entre *TcRibJ* y el templado GlpT sea debido a una homología verdadera) resultó del 100 % por Phyre2, pero dada la baja identidad de secuencia, es altamente probable que el modelo de *TcRibJ* haya sido adecuado pero conteniendo zonas que no pudieron ser modeladas con gran exactitud. En cambio, con Robetta, la confianza fue de 61 % (fracción de la estructura similar al templado), indicando que el templado tampoco explica la totalidad del modelo de *TcRibJ*.

Estas variaciones respecto del templado se hicieron evidentes en la alineación de los modelos de *TcRibJ* con la estructura de GlpT con la determinación del RMSD (Root Mean Square Deviation). Por Phyre2, el RMSD fue de 2,38 Å; mientras que en el caso de Robetta, el RMSD del modelo 1 presentó valores de 2,65 Å, el RMSD del modelo 2: 3,1 Å, el RMSD del modelo 3: 3,2 Å, el RMSD del modelo 4: 3,0 Å y el RMSD del modelo 5: 3,1 Å. Estos valores estuvieron dentro de un rango aceptable, similares al modelo de *TcPOT1.1* y el templado transportador L-arginina/agmatina AdiC de *E. coli* (Soyza et al. 2013). Al realizar el alineamiento estructural, se observó que las grandes diferencias existentes con el templado radicaron en el dominio citosólico y en otros *loops* internos de *TcRibJ*. Esto era de esperarse ya que, por un lado, el dominio citosólico no fue cristalizado en la estructura de GlpT y, por el otro, los *loops* son estructuras altamente desordenadas, de manera tal que los servidores utilizaron otras aproximaciones para modelarlo. Considerando todo esto, se utilizó el modelo obtenido por Phyre2 para los análisis siguientes.

A



B



C

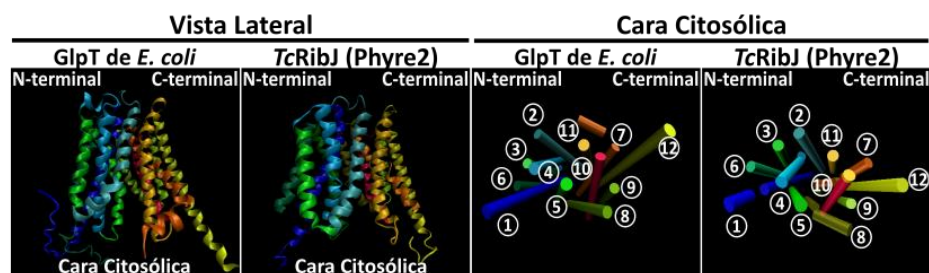


Figura R-23. Modelado estructural por homología de TcRibJ. A) Alineamiento por Muscle entre las secuencias GlpT y TcRibJ, y sus correspondientes pasos transmembrana determinadas por TM-Coffee. B) Modelos estructurales de TcRibJ por los servidores Phyre2 y Robetta, utilizando el templado GlpT (PDB: 1PW4). C) Comparación entre el modelo de TcRibJ determinado por Phyre2 y la estructura de GlpT, sin considerar el dominio citosólico. Las figuras fueron obtenidas con el programa VMD.

Análisis del modelo de *TcRibJ* obtenido por homología con el transportador GlpT de *E. coli*

Analizando la distribución de aminoácidos en el modelo obtenido de *TcRibJ* se observa que la interacción con la membrana plasmática estaría mediado por aminoácidos hidrofóbicos (**Figura R-24**).

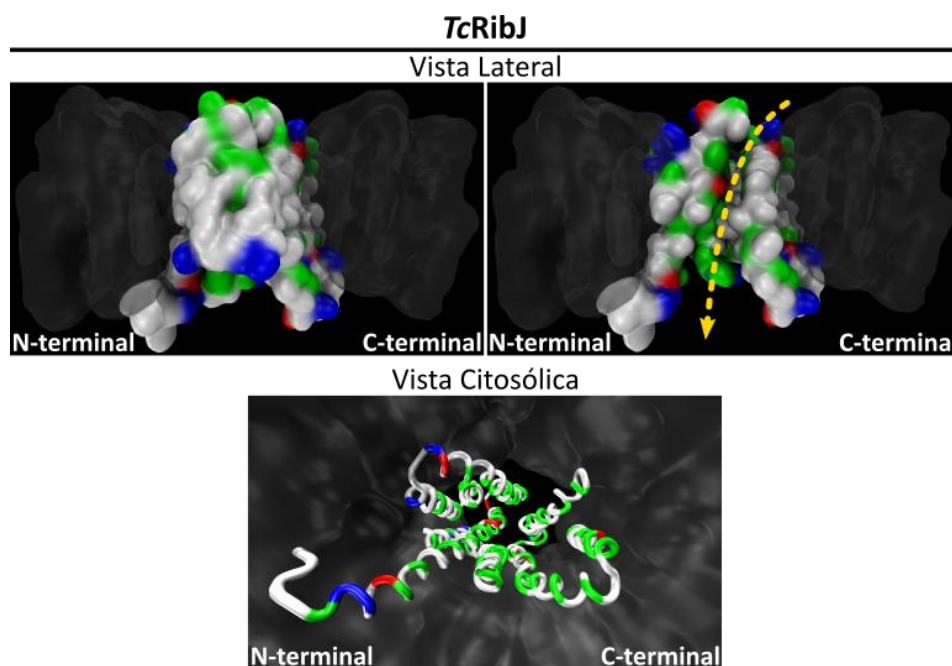


Figura R-24. Representación del modelo estructural del transportador *TcRibJ* en una bicapa lipídica. Los colores de la proteína *TcRibJ* representan las propiedades químicas de los aminoácidos (blanco: hidrofóbico, verde: polar, azul: carga positiva y rojo: carga negativa). La flecha puntuada amarilla resalta el canal de *TcRibJ*. El dominio citosólico no se tuvo en cuenta para la realización de estas figuras. La visualización de la estructura y la representación de la membrana plasmática se realizaron con el programa VMD.

Cabe mencionar que la mayoría de las herramientas bioinformáticas para analizar estructuras fueron desarrolladas para proteínas globulares y no consideran las restricciones que impone la membrana plasmática sobre la estructura de proteínas transmembrana. En consecuencia fallan al momento de analizar las estructuras de este tipo de proteínas (Tusnádý & Kozma 2014). Uno de los métodos para analizar estructuras de proteínas transmembrana consiste en observar los ángulos de torsión (ángulo Psi $-\Psi-$ y Phi $-\Phi-$) que forman sus aminoácidos a través del gráfico de Ramachandran. Por ello, utilizando el programa *on-line* RAMPAGE

(<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>), analizamos los ángulos de torsión de todos los aminoácidos de *TcRibJ* del modelo estructural obtenido por el servidor Phyre2 (**Figura R-25A**), encontrando que la gran mayoría de los aminoácidos ocupa posiciones favorecidas (85,1 %), seguido de aminoácidos en posiciones permitidas (10,2 %) y muy pocos en zonas prohibidas (4,7 %). Los ángulos obtenidos para *TcRibJ* coincidieron con los que obtuvimos en el análisis bioinformático de otras proteínas transmembrana de la familia MFS como GlpT y LacY de *E. coli* (resultados no mostrados).

Los aminoácidos glicina y prolina son importantes en la estructura de una proteína. Por un lado, la primera, al no tener una cadena lateral (grupo R), puede formar un mayor número de ángulos de torsión (**Figura R-25C**); por otro lado, prolina tiene una menor cantidad de posiciones posibles debido a su estructura (**Figura R-25D**). Al analizar los ángulos de torsión de ambos se observó que en la mayoría de los casos se formaron ángulos favorecidos, salvo en 3 posiciones (Glicina 155, Prolina 201 y 291).

La prolina también determina los ángulos de torsión de los aminoácidos que se ubican inmediatamente río arriba, denominados pre-prolina, (**Figura R-25B**). De todos ellos, solamente Asp 46 y Val 82 se ubicaron en zonas prohibidas.

Con el fin de optimizar el modelo estructural de *TcRibJ* se realizaron varias simulaciones con el programa VMD, pero no se lograron cambios significativos.

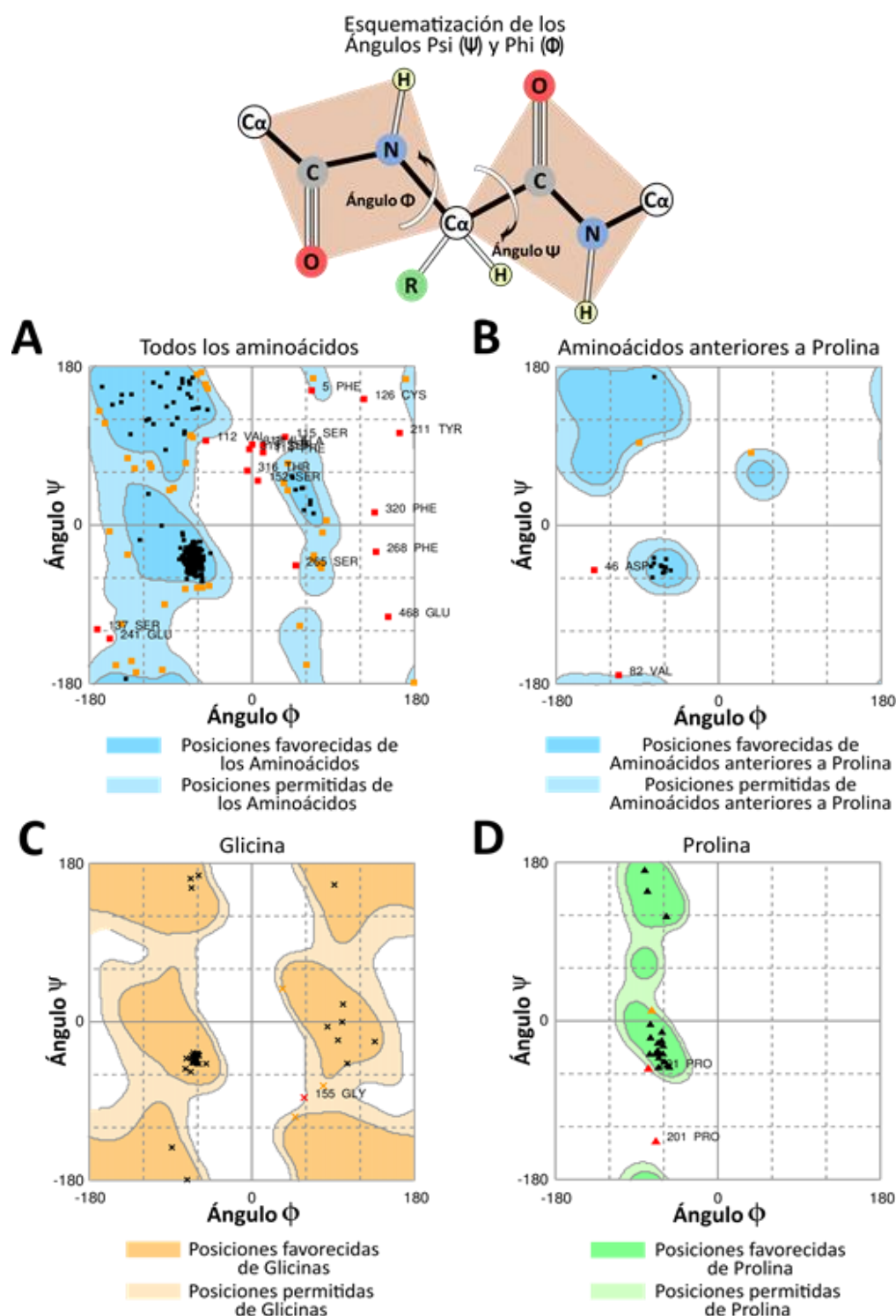


Figura R-25. Ángulos de torsión Psi (Ψ) y Phi (Φ) en el modelo estructural de *TcRibJ*. En el panel superior se representaron los ángulos de torsión analizados por el programa *on-line* RAMPAGE. A) Ángulos de cada aminoácido de *TcRibJ*; B) ángulos de los aminoácidos pre- prolina; C) ángulos de glicina; y D) ángulos de prolina. Las áreas de todas las sub-figuras indican las zonas o posiciones favorecidas (color oscuro) y permitidas (color claro).

Ensayo de *docking*: análisis de interacción de TcRibJ con flavinas

Con el modelo de TcRibJ obtenido se realizó un ensayo de *docking* para evaluar los aminoácidos que estarían participando en la interacción con las flavinas. Para ello, se utilizó el servidor SwissDock del *Swiss Institute of Bioinformatics and Molecular Modelling Group*. Brevemente, el programa determina posibles sitios de unión en la proteína para los ligandos estudiados, y luego se optimiza la estructura de los ligandos en cada uno de los sitios determinados previamente. De esta manera, se obtienen varios *clusters* que representan a los compuestos en determinadas zonas de la proteína de interés y favorables desde el punto de vista energético. Como resultado de este ensayo, varios *clusters* correspondientes a las 3 flavinas fueron ubicados en el poro de TcRibJ; sin embargo, FMN y FAD mostraron un porcentaje menor de *clusters* en esta zona de la proteína (31,2 % y 76,7 %, respectivamente), en comparación con los *clusters* de riboflavina localizados en el poro (94,7 %) (**Figura R-26A**, primer panel). Paralelamente, este mismo análisis se realizó con los análogos roseoflavina, lumiflavina y lumicromo (**Figura R-26A**, segundo panel). En este caso, el 93,3 % de los *clusters* de roseoflavina y el 94,4 % lumiflavina se encontraron en el poro, mientras que con lumicromo este valor se redujo a 47,5 %. Finalmente cuando comparamos con compuestos no relacionados a la riboflavina, el porcentaje de *clusters* en el poro de TcRibJ resultó de 25 % para putrescina y de 13,4 % para treonina (**Figura R-26A**, tercer panel).

Al analizar los aminoácidos de TcRibJ que interactuarían con riboflavina se observó que son, en su mayoría, aminoácidos hidrofóbicos (Leu 65, Pro 69, Leu 119, Cys 126, Leu 285, Val 288, Leu 317, Met 379, Phe 383, Phe 407), pero también participarían algunos hidrofílicos (Gln 26, Ser 29, Tyr 30, Ser 68, Tyr 292) y un aminoácido cargado negativamente (Asp 33) (**Figura R-26B**). Los primeros mediarían la interacción con el anillo de isoaloxazina, mientras que los grupos polares interactuarían con la cadena de ribitol. Este perfil de aminoácidos coincidió con los descritos en las 4 estructuras de transportadores de la vitamina determinadas experimentalmente (Zhang et al. 2010; Karpowich et al. 2016; Deka et al. 2013; Karpowich et al. 2015).

El hecho de que la flavina FMN haya mostrado un bajo porcentaje de *clusters* en el poro de TcRibJ puede estar relacionado con el grupo fosfato, lo que perjudicaría la interacción con el ambiente hidrofóbico del poro, tal como se postuló para el transportador RfuA de *T. pallidum* (Deka et al.

2013). En consecuencia, se favorecen interacciones por fuera del poro de *TcRibJ*. Al analizar estas interacciones se observó que, en la gran mayoría, el grupo fosfato no interviene, siendo el anillo de isoaloxazina el que mediaría la asociación con regiones hidrofóbicas de *TcRibJ*. En cambio, si bien FAD tiene 2 grupos fosfatos también contiene a la purina adenina, lo cual aumenta la flexibilidad de la molécula y los sitios de contacto con el interior del poro.

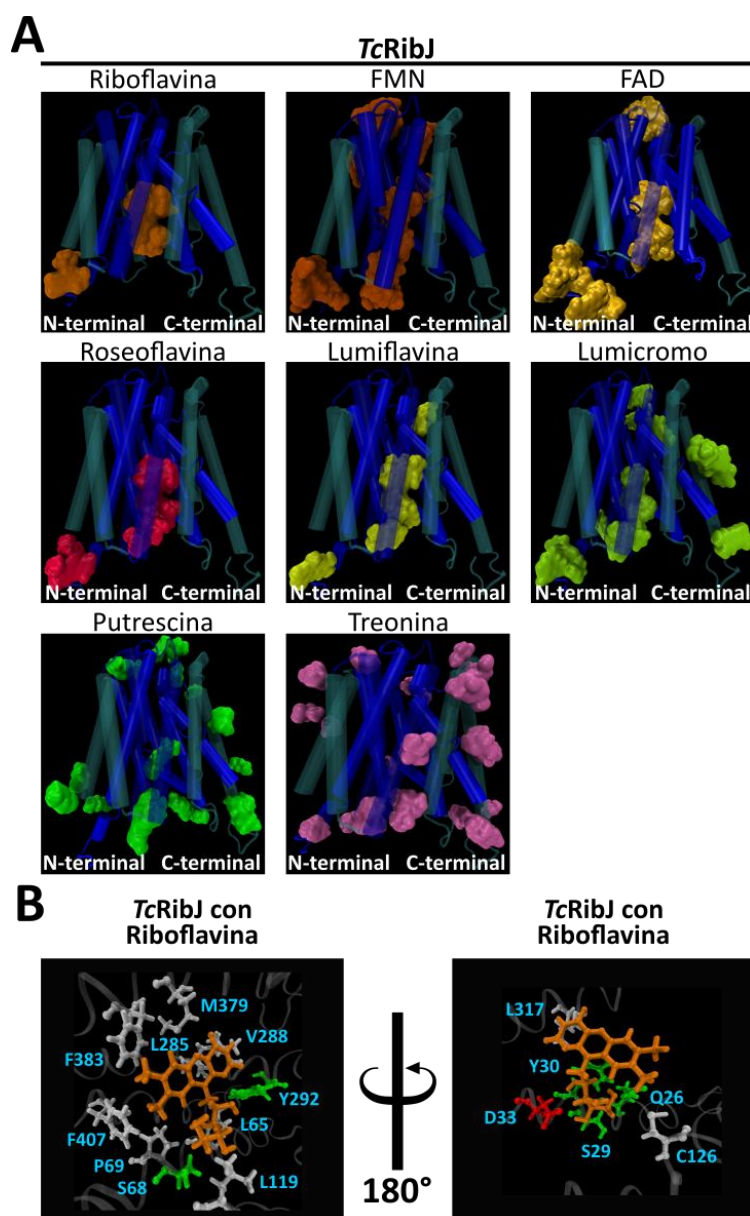


Figura R-26. Análisis de la interacción entre *TcRibJ* y flavinas/análogos. Se realizaron ensayos de *docking* por SwissDock y la visualización de los resultados se realizó con el programa VMD. A) Visualización de los *clusters* correspondientes a los diferentes compuestos (primer panel: riboflavina, FMN y FAD; segundo panel: roseoflavina, lumiflavina y lumicromo, tercer panel:

compuestos no relacionados putrescina y treonina) que fueron ubicados en determinadas regiones del modelo estructural de *TcRibJ*. B) Identificación de posibles aminoácidos que mediarían la interacción con riboflavina.

De esta manera, mediante el uso de estas herramientas de *docking* se predice que el poro determinado por nuestro modelo estructural de *TcRibJ* podría interactuar con riboflavina y compuestos similares desde el punto de vista químico-físico. Resulta interesante ahondar en el estudio del set de aminoácidos que median la interacción con el objetivo de refinar el modelo propuesto para *TcRibJ* y determinar su mecanismo de acción.

Caracterización funcional del gen *TcRibJ* por sobre-expresión homóloga en *T. cruzi*

Para avanzar en la caracterización molecular y funcional del gen *TcRibJ*, dicho gen se clonó en el vector de expresión pRIBOTEX de *T. cruzi*, y se transfectaron parásitos de la cepa MJ Levin.

Corroboración de la sobre-expresión de *TcRibJ* en parásitos MJ-Levin

Una vez que la población transfectante fue seleccionada, los niveles de expresión de *TcRibJ* se compararon con los de la población control, cepa MJ Levin-GFP (cepa *wild type* transfectada con pRIBOTEX-GFP).

Ensayo de Southern blot

Este ensayo se realizó para determinar el número de copias del gen de *TcRibJ* en las poblaciones MJ Levin-GFP y MJ Levin-*TcRibJ*. Para ello, una vez que se extrajo el ADN genómico, se digirió con EcoRI (E) o BamHI (B), se separaron los fragmentos con una corrida electroforética y se hibridó con la sonda ³²P-*TcRibJ*.

Según el esquema mostrado en la **Figura R-27A** (panel superior), con la enzima EcoRI, el gen *TcRibJ* en los cromosomas 28S (TcCL.509885.70) y 28P (TcCL.508397.70) formaría parte de un fragmento de gran tamaño (19.500 pb y 29.600 pb, respectivamente). Con BamHI, el gen *TcRibJ* se escindiría en un fragmento de 4.900 pb y 4.500 pb provenientes del 28S y 28P, respectivamente.

Como se ve en la **Figura R-27A** (panel inferior), en el ADN genómico de la población *wild type* tratado con EcoRI se observó una banda ancha de alto peso molecular, que podría corresponder a ambos fragmentos no resueltos entre sí.

Con el tratamiento de BamHI, se observaron 2 bandas ligeramente separadas (**Figura R-27A**, panel inferior, flechas azules), correspondientes a cada uno de los alelos. Estos resultados reforzaron la idea que el gen *TcRibJ* se encuentra en una sola copia por genoma haploide de *T. cruzi*, tal como se predijo previamente.

Al realizar el mismo análisis con los parásitos MJ Levin-*TcRibJ*, se observó -como se esperaba- una intensidad de hibridación mayor que en la cepa salvaje y la aparición de una banda del tamaño

molecular del pRIBOTEX-*TcRibJ* (**Figura R-27A**, panel inferior, flechas verdes). Si bien en la digestión del ADN de los parásitos transfectantes con BamHI inesperadamente dejaron de visualizarse con claridad las bandas de 4.900 pb y 4.500 pb (**Figura R-27A**, panel inferior), pero se distinguieron dos bandas adicionales respecto del *wild type*, de pesos moleculares estimados en ~15.000 pb (**Figura R-27A**, panel inferior, flecha roja) y ~7.500 pb (**Figura R-27A**, panel inferior, flecha verde), que también se observaron en la restricción con EcoRI. De acuerdo al tamaño estas bandas podrían corresponder a una y dos copias en tándem del vector; aunque no se descarta que la construcción pueda haberse integrado en el genoma y las bandas sean productos de digestión de dichas integraciones.

PCR semi-cuantitativa

Paralelamente, con el mismo ADN genómico usado para el *Southern blot* (sin digerir), realizamos reacciones de PCR específicas para *TcRibJ*, utilizando distintas cantidades de templado. De esta manera, puede compararse cualitativamente la abundancia relativa del gen *TcRibJ* en ambas poblaciones. Utilizando 100 ng, 10 ng y 0,1 ng de ADN genómico como templado inicial no se observaron diferencias entre ambas preparaciones; sin embargo, a 1 ng de templado, la población *TcRibJ* mostró unas 8 - 10 veces más producto que la población *wild type* (**Figura R-27B**).

RT-PCR semi-cuantitativa

Como se ha descrito que el número de copias de un gen no está proporcionalmente relacionado con los niveles de expresión en *T. cruzi* (Carrillo et al. 2007), decidimos estudiar los niveles de expresión / sobre-expresión del gen *TcRibJ* en la cepa *wild type* y la transformante. Para ello, se extrajo ARNm de ambas poblaciones y se llevó a cabo una reacción de retro-transcripción. El ADN copia (ADNc) así obtenido se utilizó como templado para dos reacciones de PCR en paralelo, una específica para *TcRibJ* y otra para el ARNr 18S (**Figura R-27C**, panel izquierdo), lo que permitió realizar una relativización del producto de *TcRibJ* respecto del gen control (**Figura R-27C**, panel derecho). De esta manera, confirmamos que las poblaciones conteniendo la construcción pRIBOTEX-*TcRibJ* presentaron mayor expresión del transportador que la población *wild type*.

Esta serie de resultados corroboran que la población *TcRibJ* efectivamente tiene más copias de este gen, llevando un aumento en la cantidad de transcriptos. Hasta el momento, debido a la ausencia de anticuerpos anti-*TcRibJ* no se pudo comprobar si esto también se observa a nivel de proteína, pero se ha evaluado a nivel de actividad del transportador y de efectos biológicos (ver secciones siguientes).

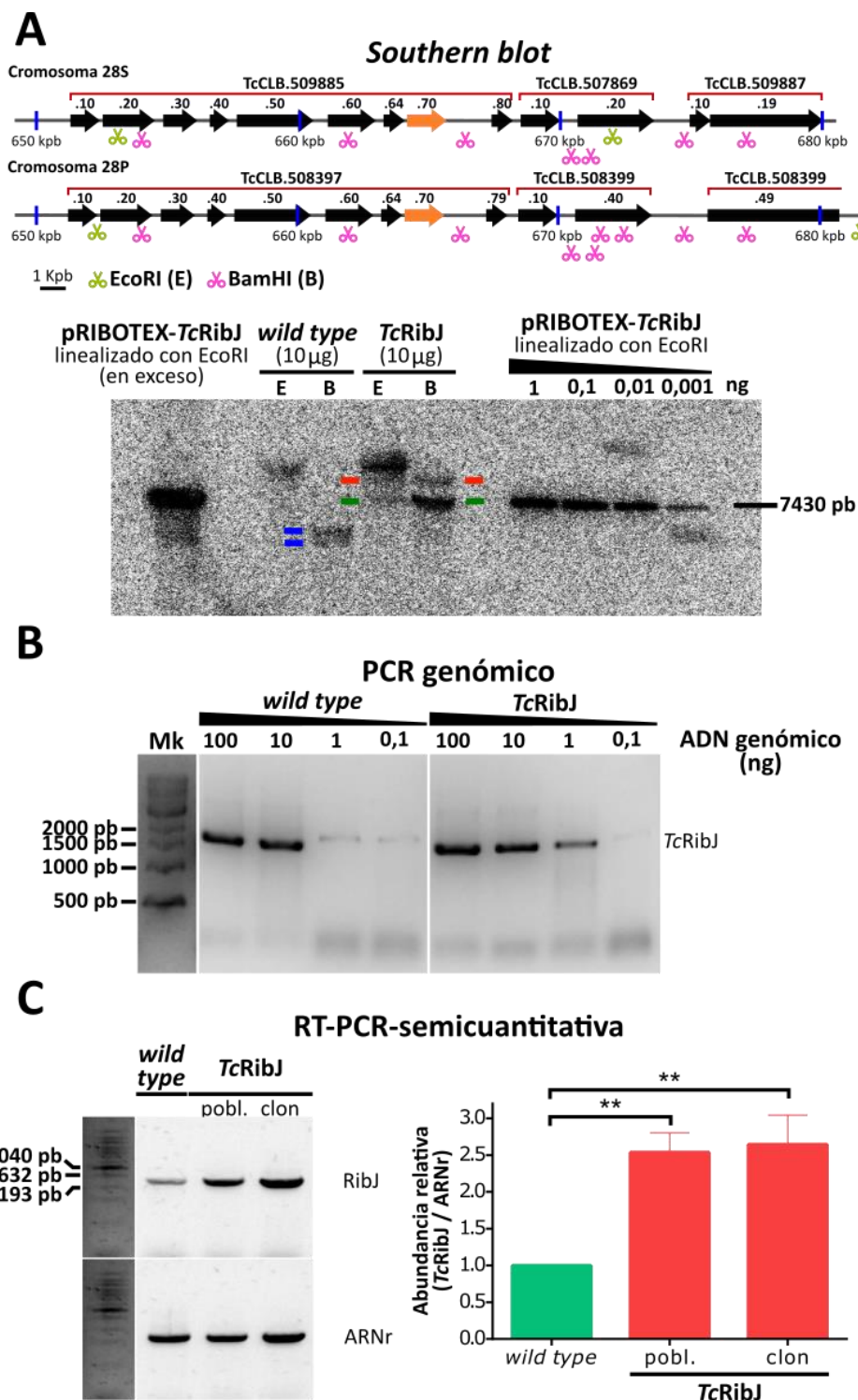


Figura R-27. Evaluación de los niveles de sobre-expresión de *TcRibJ* en las poblaciones transfectadas. A) En el panel superior se representó una sección (650 kb – 685 kb) de los cromosomas 28S y 28P donde se localiza el gen *TcRibJ* (TcCLB.509885.70 y TcCLB.508397.70, flechas naranjas). Las tijeras color verde y magenta señalan los sitios de corte para EcoRI (E) y BamHI (B), respectivamente. En el panel inferior, se muestra el resultado del *Southern blot* realizado con ADN genómico de las poblaciones MJ Levin-GFP y MJ Levin-*TcRibJ* (digeridos con EcoRI o BamHI),

hibridado con la sonda ^{32}P -*TcRibJ*. Distintas cantidades del plásmido digerido pRIBOTEX-*TcRibJ* fueron incluidas en la corrida como controles positivos. B) PCR realizada con distintas cantidades de ADN genómico de las poblaciones MJ Levin-GFP y MJ Levin-*TcRibJ*, utilizando *primers* para el transportador RibJ. C) En el panel izquierdo, se muestra una RT-PCR representativa utilizando como templado muestras de ARNm de las poblaciones MJ Levin-GFP y MJ Levin-*TcRibJ*. En el panel derecho, se muestra la cuantificación relativa del ADNc de *TcRibJ* respecto de ARNr 18S, con el programa ImageJ. . El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$), en al menos 3 ensayos independientes.

Efecto de la sobre-expresión de *TcRibJ* en la proliferación de *T. cruzi* en función de la concentración de flavinas

Para profundizar sobre el rol de *TcRibJ* en *T. cruzi*, analizamos el efecto de su sobre-expresión en la proliferación de los parásitos. Para ello, epimastigotes de ambas poblaciones se cultivaron en medio SDM20 suplementado con diferentes concentraciones (20 nM – 600 nM) de riboflavina, FMN o FAD (**Figura R-28A-C**).

Los resultados obtenidos con la cepa MJ Levin *wild type* (**Figura R-28**) fueron similares a los obtenidos con la cepa Y-GFP (**Figura R-2 y R-3**), lo que permitiría generalizar dicho comportamiento a *T. cruzi*, más allá de tratarse de una u otra cepa. Por otro lado, los parásitos expresando *TcRibJ* mostraron diferencias en el patrón de proliferación con respecto a los controles:

- con 20 nM de riboflavina, los parásitos sobre-expresando *TcRibJ* alcanzaron una densidad 33,7 % superior a la observada en el control (**Figura R-28A**). Esta tendencia se mantuvo con 40 nM de riboflavina, donde los transfectantes también mostraron una densidad 24,3 % mayor que los parásitos *wild type*;
- con FMN a 20 nM, los parásitos sobre-expresantes proliferaron un 47,2 % más que la cepa *wild type*; a 40 nM de FMN también proliferaron más, sin embargo este porcentaje fue menor (24,6 %) (**Figura R-28B**);
- con FAD a 20 nM, la densidad de los parásitos sobre-expresantes fue 54,1 % mayor que el control; mientras que con 40 nM de FAD, el porcentaje fue de 44,2 % (**Figura R-28C**).

Nuestros resultados muestran que los parásitos sobre-expresando *TcRibJ* fueron capaces de alcanzar una densidad mayor que la cepa *wild type* en medios donde la cantidad de flavinas es limitante.

Asimismo, a concentraciones mayores de riboflavina (80 nM) la proliferación de la cepa que sobre-expresa *TcRibJ* llegó a $50,2 \pm 4,0 \times 10^6$ parásitos/ml, una densidad menor respecto de si misma cultivada a 20 nM de riboflavina como de la cepa *wild type* a 80 nM. Por otra parte, la capacidad proliferativa de estos parásitos sobre-expresantes volvió a incrementarse a 600 nM de vitamina, alcanzando una densidad 34,3 % mayor a la registrada a 80 nM ($p < 0,05$).

Respecto de los parásitos *wild type*, la densidad de epimastigotes fue de $75,5 \pm 3,0 \times 10^6$ parásitos/ml a 80 nM de riboflavina y se mantuvo en estos niveles hasta los 300 nM de riboflavina (**Figura R-28A**). Recién a 600 nM de la vitamina, el crecimiento de los parásitos *wild type* disminuyó, tal como se mostró en resultados anteriores (**Figura R-2**).

Con respecto a FMN, la proliferación de los parásitos *TcRibJ* se vio afectada negativamente recién a 300 nM (en promedio con concentraciones inferiores a 300 nM de FMN, representa un descenso de $21,2 \pm 7,1$ % – $p < 0,05$). Nuevamente, al aumentar la concentración a 600 nM, la densidad máxima aumentó un 21,7 % más respecto de la condición 300 nM (**Figura R-28B**). La cepa control cultivada con FMN mostró un aumento en la capacidad proliferativa hasta los 300; pero a 600 nM de FMN la densidad disminuyó un 30,9 % (**Figura R-28B**).

Con FAD, la proliferación de los parásitos sobre-expresantes fue disminuyendo progresivamente al aumentar la concentración de esta flavina, hasta que a 600 nM la densidad apenas aumentó un $18,8 \pm 8,1$ % (en promedio respecto de los densidades anteriores) (**Figura R-28C**). En cambio, los parásitos *wild type* mostraron un continuo aumento en la densidad de parásitos, llegando a un máximo a 600 nM de riboflavina.

Esto indicaría que los parásitos sobre-expresando *TcRibJ* resultan, en general, más sensibles a las flavinas que los *wild type*, tanto en concentraciones limitantes como en concentraciones tóxicas, posiblemente por una mayor incorporación de las mismas.

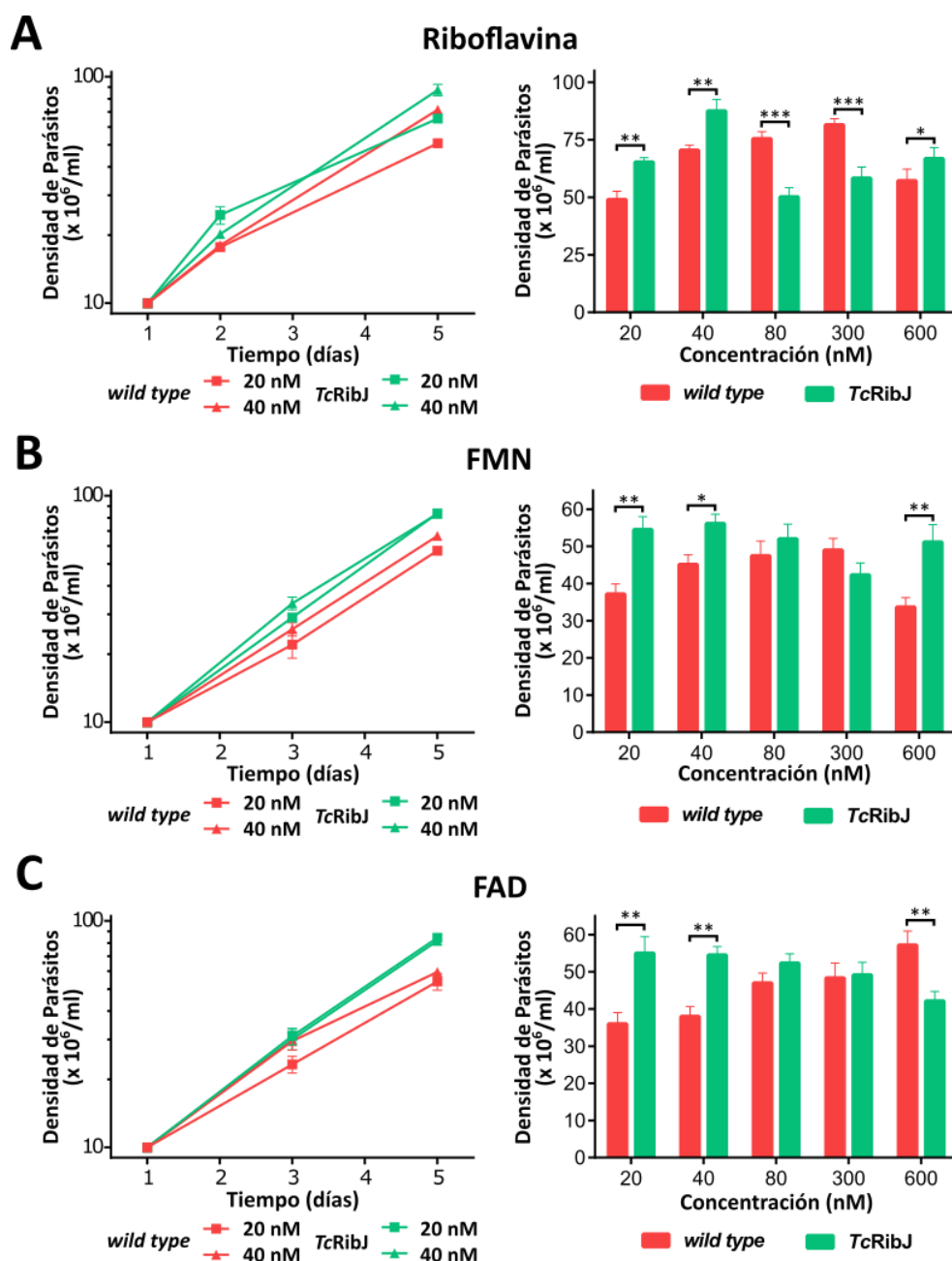


Figura R-28. La sobre-expresión de *TcRibJ* favoreció la proliferación de los parásitos en bajas concentraciones de flavinas y aumentó su sensibilidad a concentraciones tóxicas de flavinas. Para las curvas de crecimiento se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* de la población MJ Levin (expresando GFP ó *TcRibJ*) y se cultivaron en medio SDM20 con concentraciones crecientes de flavinas (20, 40, 80, 300 y 600 nM): A) riboflavina, B) FMN o C) FAD. En el panel izquierdo se representan las curvas de crecimiento; en el panel derecho de la figura se representa el análisis de densidad de parásitos ($\times 10^6/\text{ml}$) al quinto día de cultivo. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$), en al menos 3 ensayos independientes.

Efecto de la sobre-expresión de *TcRibJ* en la proliferación de *T. cruzi* en presencia de análogos de riboflavina

Continuando con la caracterización funcional de *TcRibJ*, estudiamos el efecto de análogos de riboflavina sobre el crecimiento de los parásitos sobre-expresantes del transportador. Para ello, parásitos de la población MJ Levin-GFP y MJ Levin-*TcRibJ* se cultivaron en ausencia o en presencia de análogos. El medio de cultivo utilizado fue el SDM20 (concentración residual de riboflavina a 20 nM) con el objetivo de maximizar el efecto inhibitorio de las drogas a corto plazo. En el panel izquierdo de la **Figura R-29A-C**, se representan las curvas de crecimiento de ambas poblaciones con análogos (0,5 μ M para roseoflavina y 20 μ M para lumiflavina y lumicromo) y en condiciones control (sin análogos). Tal como se vio en los resultados previos, en las condiciones control, la población sobre-expresando *TcRibJ* mostró una mayor proliferación que la población *wild type* (entre el 39,4 y el 57,4 %). Por otra parte, los análogos tóxicos provocaron una disminución en la densidad de ambas poblaciones. Analizando la densidad de ambas poblaciones al quinto día de cultivo (**Figura R-29A-C**, panel derecho), se observó que:

- en todas las concentraciones de roseoflavina ensayadas, el porcentaje de proliferación de los parásitos sobre-expresando *TcRibJ* se mantuvo por debajo de los valores correspondientes a la población *wild type* (a 10 μ M de análogo, en la población *TcRibJ* se obtuvo un $47,1 \pm 4,6$ % y en la población *wild type*, un $70,9 \pm 5,2$ %, respecto de los valores correspondientes a sus controles) (**Figura R-29A**);
- cuando los parásitos se trataron con 20 μ M de lumiflavina, también se registró un mayor efecto inhibitorio en la población *TcRibJ* que en la *wild type* (*TcRibJ* tuvo un porcentaje de proliferación del $47,1 \pm 3,6$ % mientras que la población *wild type* $74,3 \pm 7,1$ %, respecto de las condiciones control) (**Figura R-29B**);
- con lumicromo también se observó esta tendencia donde los parásitos *TcRibJ* mostraron un porcentaje de proliferación del $28,8 \pm 3,6$ % y la *wild type* $70,3 \pm 8,7$ % (**Figura R-29C**).

Estos resultados muestran que la población *TcRibJ* es más sensible a los análogos de riboflavina que la población *wild type*, posiblemente por la mayor capacidad de incorporarlos.

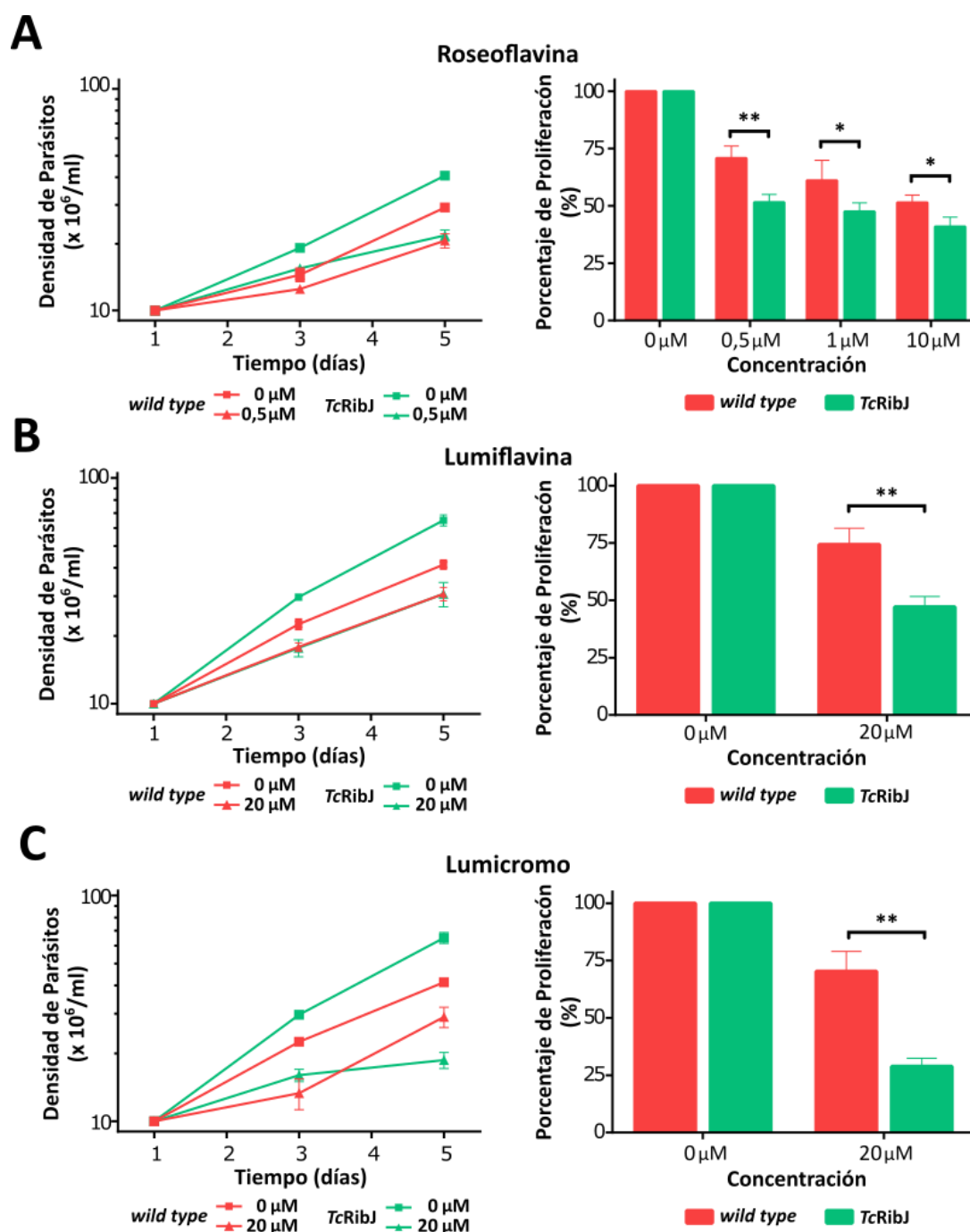


Figura R-29. La sobre-expresión de *TcRibJ* volvió a los parásitos más sensibles a los análogos de riboflavina. Para las curvas de crecimiento se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* de la población MJ Levin (expresando GFP ó *TcRibJ*) y se cultivaron en medio SDM20 con los análogos de riboflavina: A) roseoflavina a 0 y 0,5 μM ; B) Lumiflavina a 0 y 20 μM ; y C) Lumicromo a 0 y 20 μM . En el panel izquierdo de la figura se representan las curvas de crecimiento; en el panel derecho, se representa el análisis de densidad de parásitos al quinto día de cultivo, expresado como porcentaje de proliferación respecto de la condición control correspondiente. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), en al menos 3 ensayos independientes.

Efecto de la sobre-expresión de *TcRibJ* en la incorporación de riboflavina de *T. cruzi*

Con el objetivo de profundizar el estudio del rol de *TcRibJ*, se realizaron ensayos de incorporación de ^3H -riboflavina en parásitos sobre-expresantes y *wild type*. Debido a que la población sobre-expresante se construyó a partir de la cepa MJ Levin (Miranda et al. 2012), que tiene un *background* genético distinto al de la cepa Y-GFP (utilizada en los ensayos de transporte iniciales de esta tesis - **Figura R-13** y **Figura R-14**), realizamos nuevos ensayos de puesta a punto y caracterización del transporte de la cepa MJ Levin-GFP, para luego comparar con la población sobre-expresante (**Figura R-30**).

Epimastigotes MJ Levin-GFP cultivados en BHT, un medio rico en nutrientes y de alto contenido en flavinas, mostraron en diversos ensayos un transporte de ^3H -riboflavina (a 2 μM) entre 25 y 50 fmol/ 10^7 parásitos/min (**Figura R-30A y D**); mientras que estos mismos parásitos cultivados en SDM20, un medio pobre en flavinas, mostraron un transporte de 70 - 80 fmol/ 10^7 parásitos/min (**Figura R-30A y B**). Esto sugiere que en condiciones de escasez de flavinas (y de otros nutrientes), el transporte de riboflavina está estimulado en *T. cruzi*. Efectos de estímulo en el transporte de diversos metabolitos en condiciones restrictivas ha sido observado en distintos tripanosomátidos (González et al. 1992; Ortiz et al. 2010).

En estas mismas condiciones de cultivo restrictivo (medio SDM20) y de exceso de ^3H -riboflavina (2 μM), la población sobre-expresando *TcRibJ* mostró una velocidad inicial de incorporación de ^3H -riboflavina de $52,2 \pm 11,3$ fmol/ 10^7 parásitos/min, algo menor que la *wild type* ($70,8 \pm 5,0$ fmol/ 10^7 parásitos/min) (**Figura R-30B**).

Repitiendo los ensayos de transporte en el medio pobre en flavinas pero a una baja concentración de ^3H -riboflavina (100 nM, concentración cercana / inferior a los valores del K_m aparente estimados) (**Figura R-30C**), la población *TcRibJ* mostró una velocidad inicial de incorporación de ^3H -riboflavina de $10,4 \pm 1,3$ fmol/ 10^7 parásitos/min, moderada pero significativamente mayor (1,5 veces, t-student, $p = 0,027$) que la velocidad de incorporación en la *wild type*, de $7,1 \pm 0,9$ fmol/ 10^7 parásitos/min (regresión lineal entre 0 min y 30 min, $R^2 = 0,97$).

Para completar la caracterización cinética del transporte de ^3H -riboflavina en las cepas de *background* genético MJ Levin, se determinaron los parámetros K_m aparente y $V_{\text{máx}}$, tanto en la población sobre-expresante como la *wild type*; en este caso los epimastigotes fueron cultivados en medio BHT con el fin de poder comparar los resultados con los obtenidos previamente con la cepa Y-GFP de *T. cruzi* así como con los otros tripanosomátidos (**Figura R-14**). En ambos cultivos se observó un comportamiento michaeliano del transporte de riboflavina. Los parásitos MJ Levin-GFP mostraron valores de K_m aparente ($0,19 \pm 0,08 \mu\text{M}$) y de $V_{\text{máx}}$ ($60,5 \pm 5,4 \text{ fmol}/10^7 \text{ parásitos}/\text{min}$) (**Figura R-30D**), similares a los determinados con la cepa Y-GFP (**Figura R-14A**). En el caso de la población MJ Levin-*TcRibJ*, el valor de K_m aparente ($0,26 \pm 0,14 \mu\text{M}$) (**Figura R-30D**) resultó similar al de las poblaciones *wild type*, indicando que la sobre-expresión del transportador *TcRibJ* no introdujo cambios en la afinidad por ^3H -riboflavina. Inesperadamente, la $V_{\text{máx}}$ se redujo a la mitad en la población *TcRibJ* sugiriendo que, bajo estas condiciones de cultivo en un medio rico en riboflavina, tuvo un número menor de transportadores activos que la población MJ Levin-GFP.

Nuestros resultados sugieren que el transporte de riboflavina en epimastigotes de *T. cruzi* se encontraría regulado por la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo que, posiblemente, impacta directamente en los pools endógenos de flavinas; de manera tal que parásitos *wild type* creciendo en medios ricos, o parásitos sobre-expresando *TcRibJ*, mostraron - en concentraciones saturantes de vitamina ($2 \mu\text{M}$) - niveles de incorporación de riboflavina menores que los observados en la cepa *wild type* cultivada en medio pobre (cuyos pools endógenos estarían restringidos por la auxotrofia natural así como por las condiciones restrictivas del medio). Por otra parte, cuando se cultivaron en medios pobres, la población *TcRibJ* mostró una mayor actividad de incorporación que la *wild type* con poca vitamina disponible en el medio (100 nM).

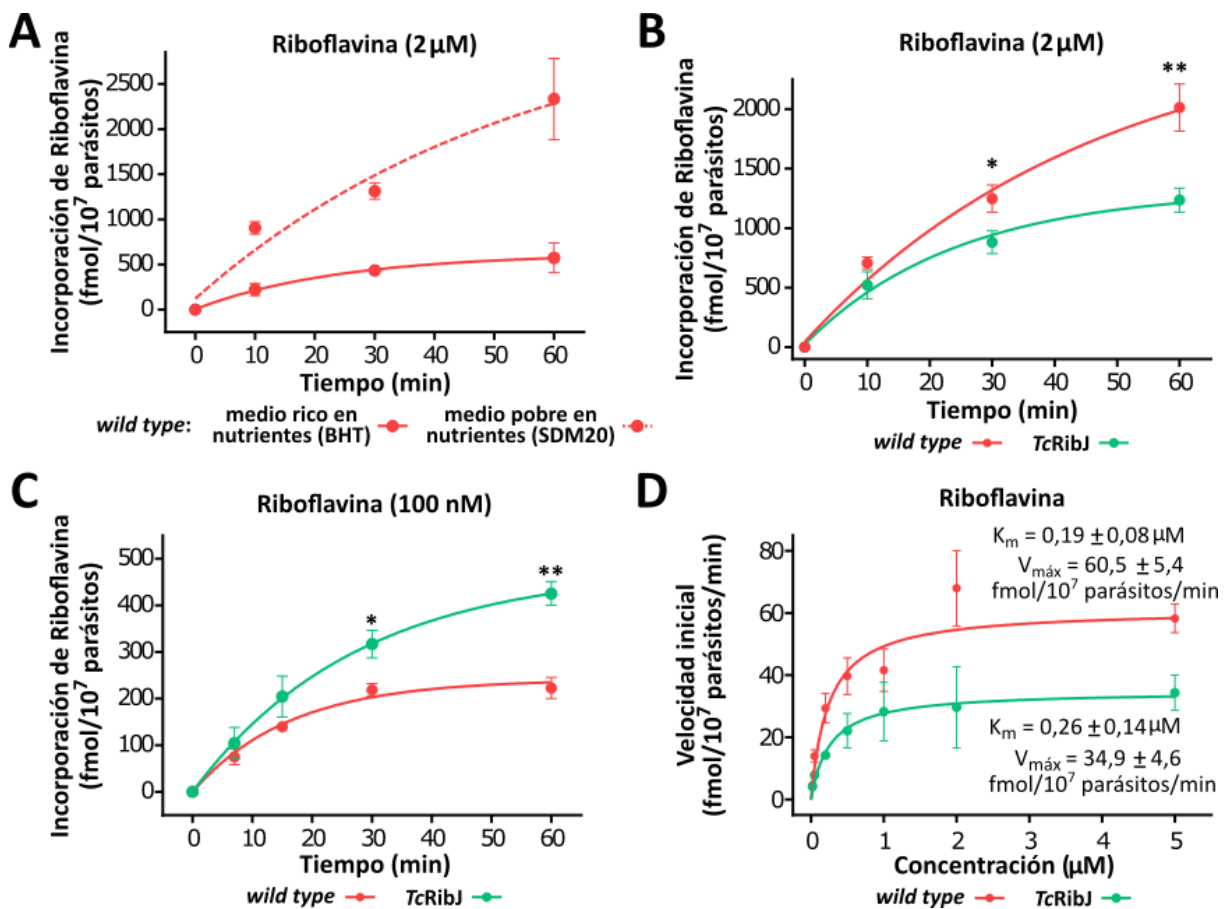


Figura R-30. Evaluación de la actividad de transporte de ^3H -riboflavina en poblaciones MJ Levin-GFP y sobre-expresando TcRibJ. A) Transporte de ^3H -riboflavina en la cepa MJ Levin-GFP, considerada *wild type* para los ensayos de transfección con el gen de TcRibJ. Se realizaron ensayos de transporte con cultivos mantenidos en medio BHT (rico en flavinas: 0,7 – 0,9 μM) o en medio SDM20 (pobre en riboflavina: 20 nM), con 2 μM de ^3H -riboflavina en un rango de tiempo entre 0 y 60 minutos. B) Ensayo de incorporación de riboflavina en las cepas MJ Levin *wild type* (GFP) y sobre-expresante (TcRibJ) cultivadas en SDM20 e incubadas con 2 μM de ^3H -riboflavina. C) Ensayo de incorporación de riboflavina con ambas cepas cultivados en medio SDM20 e incubadas con 100 nM de ^3H -riboflavina. D) Determinación de los parámetros cinéticos del transporte de riboflavina en epimastigotes de ambas poblaciones cultivados en medio BHT. El ensayo se realizó con 0 μM , 0,02 μM , 0,05 μM , 0,2 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM y 5 μM de ^3H -riboflavina, a 0 y 5 min. Los valores de K_m aparente y $V_{\text{máx}}$ se determinaron con el programa GraphPad Prism 6. Las mediciones se realizaron por triplicado. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Caracterización funcional de miembros de la familia RibJ en sistemas de expresión heteróloga

Con el fin de corroborar la función de *TcRibJ*, junto con los miembros *TbRibJ* y *LmiRibJ*, como transportadores de riboflavina, se decidió realizar ensayos de complementación de crecimiento en microorganismos auxótrofos de esta vitamina.

Ensayo en levaduras de *Schizosaccharomyces pombe*

Construcción de una mutante de *S. pombe* auxótrofa para riboflavina ($\Delta rib5$)

Como primera aproximación, y considerando la semejanza de los transportadores RibJ con los de hongos, decidimos realizar ensayos de complementación con la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. Cabe mencionar que *S. pombe* carece de transportadores de riboflavina endógenos (Reihl & Stolz 2005), pero sintetiza riboflavina *de novo*. En consecuencia, se resolvió interrumpir esta vía a través del reemplazo del gen *RIB5* (que codifica para la enzima riboflavina sintasa (Gerhardt et al. 2002)) con el gen de resistencia a G418 (*KanMX6*).

Una vez obtenidas colonias resistentes a G418 (llamadas $\Delta rib5$), se confirmó dicho reemplazo a través de ensayos de crecimiento en presencia y ausencia de riboflavina, y se comparó con levaduras *wild type*. Para ello, diluciones seriadas de las levaduras se cultivaron en medio YES con o sin riboflavina (750 μ M y 0 μ M, respectivamente). Todas las levaduras ensayadas, $\Delta rib5$ y *wild type*, crecieron en presencia de altas concentraciones de riboflavina, de manera similar entre sí. Sin embargo, en ausencia de la vitamina, solamente la cepa *wild type* fue capaz de crecer en estas condiciones (**Figura R-31A**). Esto indica que las levaduras $\Delta rib5$ tienen efectivamente interrumpida la vía de síntesis de riboflavina, requiriendo de altas concentraciones de la vitamina para sostener su crecimiento, tal como fue reportado para mutantes de *S. cerevisiae* $\Delta rib5$ (Reihl & Stolz 2005).

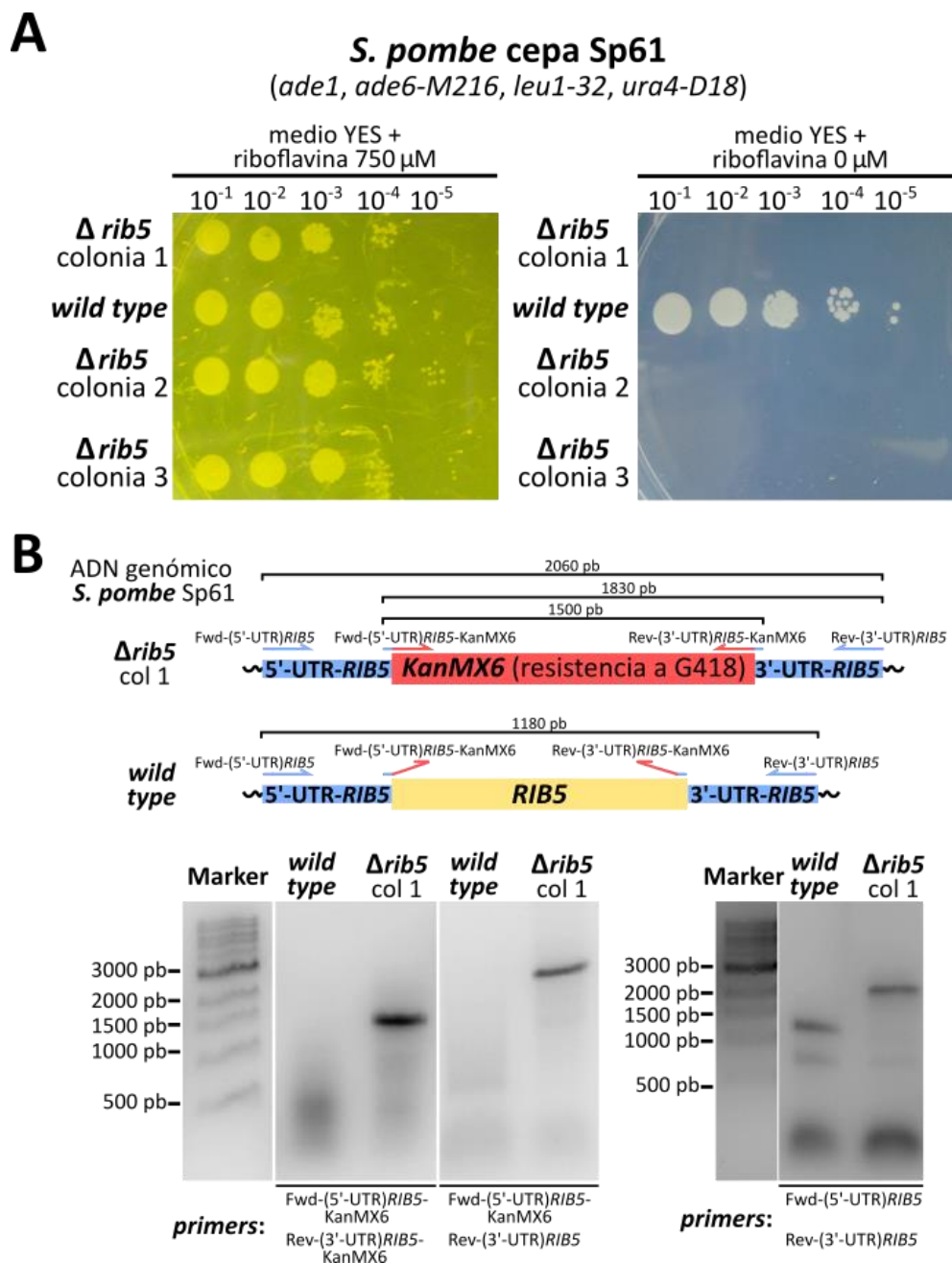


Figura R-31. Validación de las mutantes de levaduras *S. pombe* $\Delta rib5$ construidas. A) Ensayo de crecimiento de levaduras $\Delta rib5$ y *wild type* en presencia (750 μ M) o ausencia (0 μ M) de riboflavina. B) En el panel superior, esquematización del reemplazo del gen *RIB5* con el gen de resistencia a G418 (KanMX6), y la combinación de *primers* utilizadas para las distintas reacciones de PCR (Fwd-(5'-UTR)*RIB5*-KanMX6/Rev-(5'-UTR)*RIB5*-KanMX6, Fwd-(5'-UTR)*RIB5*-KanMX6/Rev-(3'-UTR)*RIB5*, Fwd-(5'-UTR)*RIB5*/Rev-(3'-UTR)*RIB5*). En el panel inferior, se muestran los productos de PCRs obtenidos, separados por electroforesis en geles de agarosa.

Para corroborar que la auxotrofía se debió a un reemplazo en el gen *RIB5* de *S. pombe* Sp61, se extrajo ADN genómico de las cepas $\Delta rib5$ colonia 1 y *wild type* y se realizaron reacciones analíticas de PCR (**Figura R-31B**). Cuando se utilizó los pares de *primers* Fwd-(5'-UTR)*RIB5*-KanMX6 / Rev-(3'-UTR)*RIB5*-KanMX6 o Fwd-(5'-UTR)*RIB5*-KanMX6 / Rev-(3'-UTR)*RIB5*, se confirmó que el gen de resistencia a G418 se encontraba en la cepa $\Delta rib5$ (**Figura R-31B**, gel izquierdo). Por otra parte, cuando se utilizó el par de *primers* Fwd-(5'-UTR)*RIB5* / Rev-(3'-UTR)*RIB5*, con la cepa *wild type* se obtuvo un fragmento de 1.180 pb (gen *RIB5* con sus regiones UTR), mientras que con la cepa $\Delta rib5$ se obtuvo un fragmento de 2.060 pb, tamaño correspondiente a la construcción (**Figura R-31B**, gel derecho).

Estos resultados confirman que el gen *RIB5* efectivamente fue reemplazado con el gen de resistencia a G418, de manera tal que las levaduras resultaron auxótrofas para riboflavina.

Complementación del crecimiento en *S. pombe* $\Delta rib5$

Para profundizar los estudios funcionales de *TcRibJ*, *TbRibJ* y *LmiRibJ*, levaduras $\Delta rib5$ fueron transformadas con dichos genes clonados en el plásmido de expresión pREP3x(*LEU2*), cuya expresión es reprimible por tiamina. Ya en los primeros ensayos de cultivo en exceso de riboflavina (tanto en presencia como en ausencia de tiamina) sólo se obtuvieron colonias con el plásmido vacío, utilizado como control (**Figura R-32**). Puesto que las construcciones derivadas del plásmido pREP3x no fueron funcionales, estas levaduras se descartaron como organismo modelo para el análisis funcional de los RibJ.

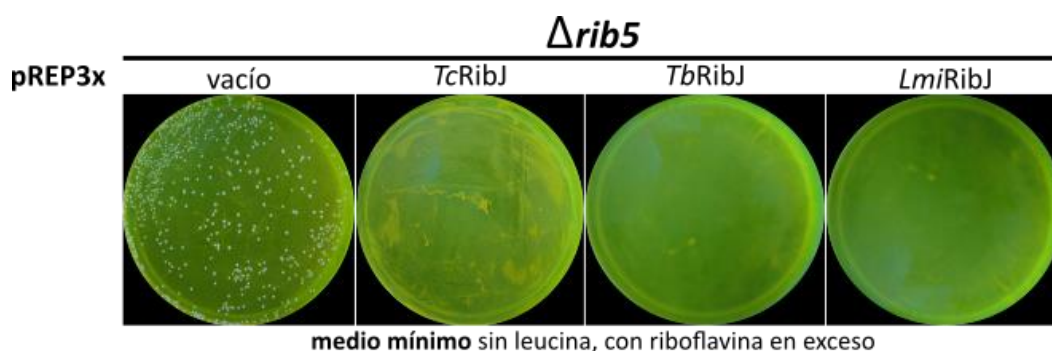


Figura R-32. Las construcciones pREP3x conteniendo *TcRibJ*, *TbRibJ* o *LmiRibJ* no fueron funcionales en la levadura $\Delta rib5$. Las cepas de levadura se sembraron en placas de medio mínimo sólido suplementado con adenina 75 mg/l, uracilo 75 mg/l, riboflavina en exceso y tiamina (5 μ g/ml) como represor del promotor utilizado. Las placas se incubaron 10 días a 28 °C.

Ensayo en bacterias *E. coli* auxótrofas para riboflavina ($\Delta ribB$)

Como organismo modelo alternativo para el estudio funcional de los RibJ, se seleccionó a la bacteria *E. coli*, la cual también carece de transportadores de riboflavina endógenos.

En nuestro laboratorio ya se había desarrollado una cepa de *E. coli* $\Delta ribB$, en la cual se reemplazó el gen de la enzima 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintasa (esencial para la síntesis de riboflavina (**Figura I-12**) con el gen de resistencia a cloranfenicol, por lo que la cepa $\Delta ribB$ solamente crece en medios con altas concentraciones de esta vitamina (García Angulo et al. 2013). De esta manera, se decidió utilizar la bacteria *E. coli* $\Delta ribB$ como organismo modelo para analizar la funcionalidad de miembros de la familia RibJ.

Complementación del crecimiento de bacterias *E. coli* $\Delta ribB$

Cepas $\Delta ribB$ se transformaron con los vectores de expresión pET24a conteniendo *TcRibJ* o *TbRibJ* o *LmiRibJ* o RibM (transportador de riboflavina de *S. davawensis* (Hemberger et al. 2011), control positivo), o pET24d-*TcPAT12* (transportador de poliaminas de *T. cruzi* (Carrillo et al. 2006; Hasne et al. 2010), control de especificidad) o el vector vacío (control negativo). Posteriormente, se analizó el crecimiento de estas transformantes en distintas concentraciones de flavinas.

Como primera aproximación, estas bacterias se sembraron en medio LB sólido con 3 concentraciones de riboflavina distintas: 0 μ M, 5 μ M y 750 μ M (**Figura R-33A**). Como se esperaba, todas estas bacterias crecieron en la más alta concentración de vitamina. En el otro extremo, solamente las bacterias expresando RibM crecieron en medios no suplementados con riboflavina, tal como fue reportado en cepas auxótrofas de riboflavina de *Bacillus subtilis* expresando RibM (Hemberger et al. 2011). Las cepas expresando *TcRibJ* o *TbRibJ* fueron capaces de crecer, al igual que RibM, en presencia de concentraciones limitantes de riboflavina (5 μ M); sin embargo, $\Delta ribB$ expresando *LmiRibJ* no restauró el crecimiento en estas condiciones. Asimismo, las bacterias $\Delta ribB$ conteniendo *TcPAT12* o el vector vacío fueron incapaces de proliferar con 5 μ M de riboflavina, sugiriendo que el crecimiento de las cepas expresando *TcRibJ* o *TbRibJ* se debió a una actividad específica de transportadores de riboflavina.

En paralelo, se realizaron análisis de crecimiento de estas mismas bacterias en presencia de distintas cantidades de las 3 flavinas en medio LB líquido (**Figura R-33B**).

En presencia de riboflavina, las bacterias expresando RibM crecieron hasta alcanzar la saturación ($DO_{600} = 2,5-3$) en todas las concentraciones ensayadas, mientras que aquellas $\Delta ribB$ que llevaban el plásmido vacío no crecieron en ninguna de estas condiciones (**Figura R-33B**). Por otra parte, y tal como se registró en medio sólido, a concentraciones muy bajas de riboflavina ($0 \mu M - 0,2 \mu M$) no hubo crecimiento de las bacterias expresando los RibJ. Pero a partir de $2 \mu M$ de la vitamina, se observó un crecimiento, leve pero significativo, con *TcRibJ* ($DO_{600} = 1,07 \pm 0,1$, $p < 0,01$ en comparación con el control vacío); y con $20 \mu M$ de riboflavina, *TcRibJ* y *TbRibJ* crecieron hasta saturación ($DO_{600} = 4,3 \pm 0,4$ y $4,2 \pm 0,4$, respectivamente, $p < 0,005$ en comparación con el control vacío).

En presencia de FMN, a partir de $20 \mu M$ se registró un incremento en la DO_{600} en las bacterias expresando *TcRibJ* y *TbRibJ* (para FMN, $DO_{600} = 1,2 \pm 0,2$ y $0,55 \pm 0,04$, respectivamente, $p < 0,01$ respecto del control vacío); y la saturación se alcanzó con $50 \mu M$ en *TcRibJ* y $100 \mu M$ en *TbRibJ* (**Figura R-33B**).

Finalmente, con las diferentes concentraciones de FAD, recién a $50 \mu M$ de la flavina se registró un crecimiento significativo para *TcRibJ* ($DO_{600} = 1,4 \pm 0,1$, $p < 0,01$ respecto del control vacío), saturando a $100 \mu M$; mientras que con *TbRibJ*, solo creció moderadamente a $100 \mu M$ de FAD ($DO_{600} = 1,1 \pm 0,1$, $p < 0,01$ en comparación con el control vacío) (**Figura R-33B**).

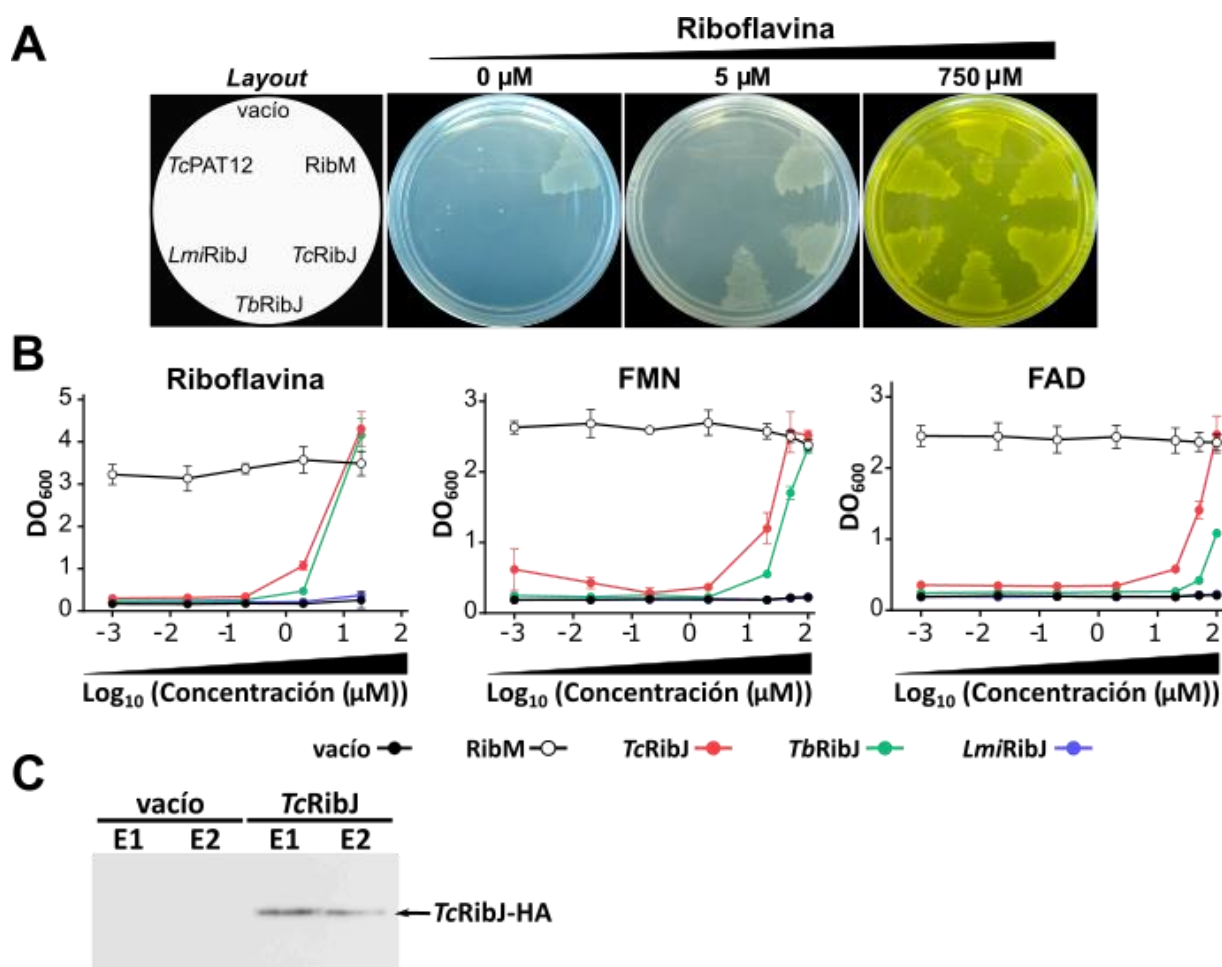


Figura R-33. Ensayos de complementación del crecimiento de *E. coli* Δ ribB. Se utilizaron cepas de *E. coli* Δ ribB transformadas con pET24a-vacío, pET24a-RibM, pET24a-TcRib, pET24a-TbRibJ, pET24a-LmiRibJ y pET24d-TcPAT12. A) Ensayo de proliferación en medio sólido: Se sembraron 10 μ l de una suspensión (DO₆₀₀ = 0,025) en LB agar con 0,1 mM IPTG y distintas concentraciones de riboflavina (0, 5 y 750 μ M) y se cultivaron 18 h a 37°C. B) Ensayo de proliferación en medio líquido: las distintas cepas Δ ribB se cultivaron en medio LB líquido (DO_{inicial}₆₀₀ = 0,01) con 0,1 mM IPTG en presencia de riboflavina (0, 0,02, 0,2, 2 y 20 μ M) FMN o FAD (0, 0,02, 0,2, 2, 20, 50 y 100 μ M). Los cultivos se incubaron a 28 °C por 18 h. Los experimentos se realizaron al menos en 3 mediciones independientes. C) Ensayo de expresión de RibJ en extractos de 2 colonias diferentes de *E. coli* BL21 transformadas con pET24 vacío o expresando TcRibJ (E1: extracto 1 y E2: extracto 2). Imagen representativa de 3 Western blot realizados.

Finalmente, se hizo un ensayo de *Western blot* para comprobar que las bacterias transformadas con los transportadores RibJ, que proliferaban en condiciones restrictivas de flavinas, eran capaces de expresar el transportador. En este caso, se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21,

en reemplazo de las bacterias *ΔribB*, por tratarse de una cepa con altos niveles de expresión de proteínas.

En estas condiciones de ensayo, el transportador *TcRibJ* fue detectado en los extractos de la cepa BL21-*TcRibJ* (**Figura R-33C**), mientras las proteínas *TbRibJ* o *LmiRibJ* no pudieron detectarse (resultado no mostrado). Ambas, *TbRibJ* y *LmiRibJ*, son proteínas con mayor número de aminoácidos que *TcRibJ* (**Figura R-16**), lo que podría ser causa de una dificultad de expresión en estas bacterias, de obtención de extractos ricos en estas proteínas, etc.

Los resultados obtenidos con las bacterias *E. coli* que expresan los RibJ – de proliferación e, incluso, los de expresión de proteínas- indican que la familia RibJ efectivamente mediaría la incorporación de las 3 flavinas – con distinta eficiencia. Esto es particularmente evidente con los miembros *TcRibJ* y *TbRibJ*, mientras *LmiRibJ* no mostró funcionalidad en nuestros experimentos.

Transporte de riboflavina en bacterias *E. coli ΔribB*

Avanzando con los estudios de funcionalidad en el modelo de expresión heteróloga, se realizaron ensayos de transporte de riboflavina en las bacterias expresando *TcRibJ* o *TbRibJ*. Cabe recordar que *E. coli* no tiene transportadores de riboflavina endógenos por lo que no es capaz de incorporarla (Vogl et al. 2007).

Para ello, las bacterias *ΔribB* transformadas con el plásmido vacío o expresando RibM, *TcRibJ* o *TbRibJ* se cultivaron ON en medio LB sin riboflavina para deprivarlas de flavinas endógenas, luego se cosecharon e incubaron en *buffer* de transporte en presencia de 2 μM de ³H-riboflavina. A los datos obtenidos se le restaron los valores obtenidos con la cepa control (plásmido vacío) para descartar la señal correspondiente a la unión inespecífica de la ³H-riboflavina a la bacteria.

Bacterias expresando RibM incorporaron riboflavina a una velocidad de $6,2 \pm 3,7$ fmol/DO₆₀₀/min, valores similares se obtuvieron para las cepas expresando *TcRibJ* y *TbRibJ* ($3,2 \pm 2,1$ fmol/DO₆₀₀/min y $7,6 \pm 2,3$ fmol/DO₆₀₀/min, respectivamente) (**Figura R-34A**).

Para evaluar la especificidad del transporte, se realizaron ensayos de desplazamiento con exceso de riboflavina no marcada. En este ensayo se utilizaron 0,3 μM de ³H-riboflavina y 10- y 100-veces más de riboflavina no marcada radioactivamente.

La incorporación de ^3H -riboflavina en las bacterias RibM disminuyó un $60,8 \pm 3,3 \%$ en presencia de riboflavina no marcada a $3 \mu\text{M}$ y $82,9 \pm 5,5 \%$ a $30 \mu\text{M}$ de competidor frío (**Figura R-34B**). Por otra parte, en estas mismas condiciones, las bacterias expresando TcRibJ mostraron una actividad superior a TbRibJ, y sólo en la primera cepa se logró desplazar la incorporación de la vitamina marcada a $3 \mu\text{M}$ ($38,5 \pm 9,3 \%$ de inhibición) y a $30 \mu\text{M}$ ($71,1 \pm 21,5 \%$ de inhibición) de riboflavina fría. Sin embargo, entre estas concentraciones no se registraron diferencias significativas.

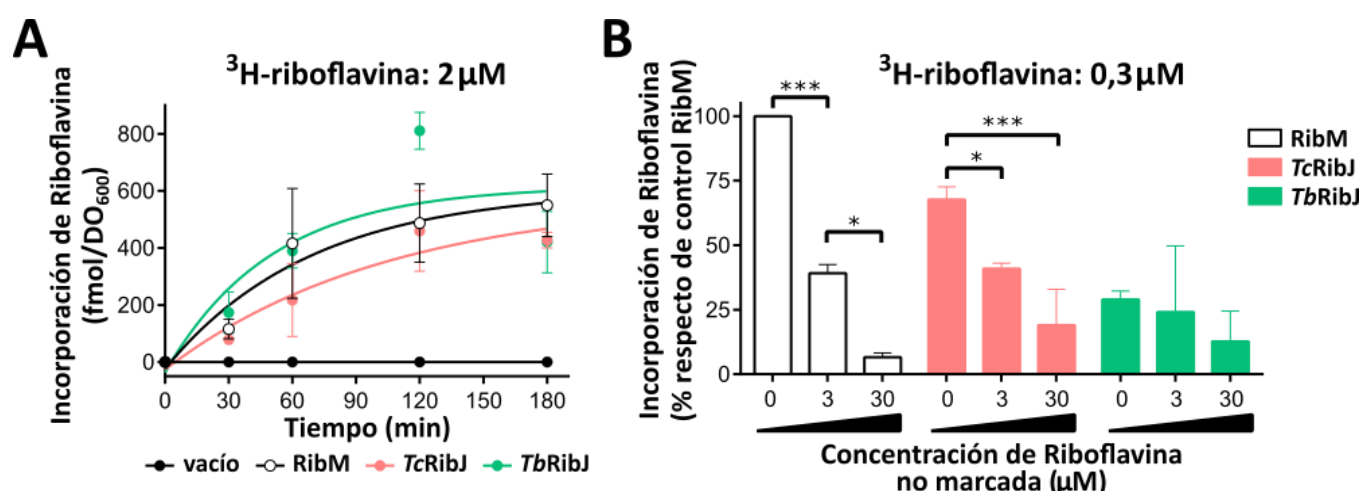


Figura R-34. TcRibJ y TbRibJ median la incorporación de riboflavina en bacterias *E. coli* ΔribB . A) Se midió la incorporación de ^3H -riboflavina ($2 \mu\text{M}$), en un rango de tiempo de 0 a 180 min, en bacterias expresando RibM, TcRibJ o TbRibJ o el vector vacío. B) Se realizaron ensayos de desplazamiento con $0,3 \mu\text{M}$ ^3H -riboflavina en ausencia ($0 \mu\text{M}$) o en presencia de $3 \mu\text{M}$ o $30 \mu\text{M}$ de riboflavina no marcada radioactivamente. Las muestras se tomaron a 0 min y 120 min después de la adición del radioactivo. Los resultados se expresan como valores relativos a los obtenidos con RibM en la condición control ($0 \mu\text{M}$ de competidor frío) y son promedio de 3 mediciones independientes. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Ensayos de permeabilidad en bacterias *E. coli* ΔribB expresando miembros de la familia RibJ

Finalmente, para controlar que la permeabilidad de las bacterias *E. coli* ΔribB no fue alterada por la expresión de proteínas de membrana, se determinó su susceptibilidad a dos drogas: acriflavina (muy similar a la riboflavina) y ácido nalidíxico (compuesto de diferente naturaleza química). Para ello, las bacterias se cultivaron en medio LB líquido con riboflavina en exceso, en presencia de distintas concentraciones de acriflavina ($0 - 250 \mu\text{g/ml}$) y de ácido nalidíxico ($0 - 40 \mu\text{g/ml}$) y se determinó la IC₅₀ para cada cepa.

En estas condiciones, en presencia de acriflavina no se observaron diferencias de proliferación ($p = 0,053$) – ergo de permeabilidad - entre las cepas transformadas con los miembros de RibJ y la cepa control (vector vacío) (**Figura R-35A**). Los valores de IC₅₀ se mantuvieron dentro de un rango de 20,3 y 27,6 $\mu\text{g/ml}$, valor muy similar al registrado en *E. coli* DH5 α (Narui et al. 2002). Resultados similares se obtuvieron en presencia del ácido nalidíxico (**Figura R-35B**), donde el rango de IC₅₀ estuvo en 0,47 - 0,75 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,08$), similar al observado para bacterias *E. coli* de la cepa K-12 (Labedan 1988).

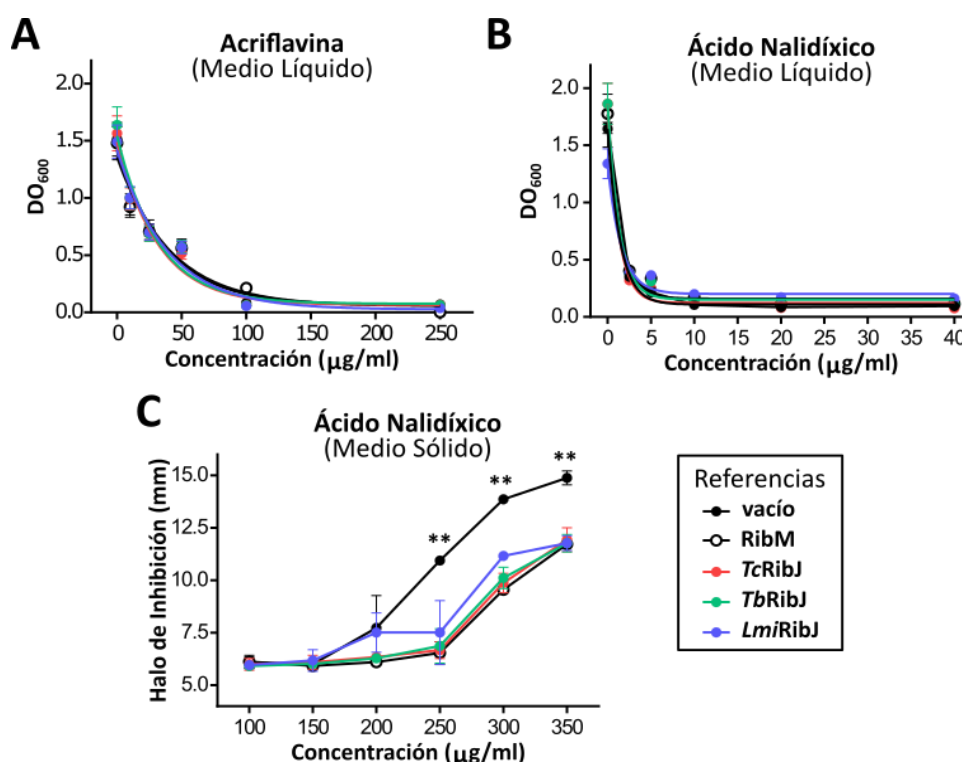


Figura R-35. Análisis de la permeabilidad de bacterias expresando transportadores de riboflavina.

Se realizaron curvas de crecimiento como medida de la susceptibilidad de las bacterias (llevando el plásmido vacío o expresando *RibM* o *TcRibJ* o *TbRibJ* o *LmiRibJ*) a distintas concentraciones de antibióticos: A) acriflavina (0, 10, 25, 50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$); B) ácido nalidíxico (0, 2,5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$). En ambos casos, las bacterias se incubaron 18 h a 28 °C. Al día siguiente, se midió la DO₆₀₀. C) Ensayo de sensibilidad a antibiótico por el método de difusión en medio agar. Se analizó la sensibilidad a distintas concentraciones de ácido nalidíxico (100 - 350 $\mu\text{g/ml}$) según el radio del halo de inhibición (mm). El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$), de al menos 3 ensayos independientes.

Paralelamente, la susceptibilidad de estas bacterias al ácido nalidíxico también se evaluó por el método de difusión en agar. Para ello, las placas de LB agar fueron inoculadas con una suspensión

de bacterias expresando los transportadores RibJ (o el plásmido vacío), de manera tal de obtener un césped. Al mismo tiempo, se agregaron varios discos de papel conteniendo diferentes concentraciones de ácido nalidíxico (100 – 350 µg/ml). La concentración de ácido nalidíxico a partir de la cual se formó un halo de inhibición en la cepa control fue de 200 - 250 µg/ml; mientras que en el resto de las bacterias expresando RibJ o RibM, el halo de inhibición se registró a partir de los 250 µg/ml del antibiótico (**Figura R-35C**). De esta manera, las bacterias que expresaron los transportadores de riboflavina mostraron una menor susceptibilidad al antibiótico que las bacterias control, indicando la integridad de las membranas se mantuvo pese a la expresión de los transportadores heterólogos.

Las diferencias observadas entre los resultados de ambas metodologías son comunes dadas las diferencias en los procedimientos y condiciones de cada una de ellas (Schwalbe et al. 2007). De todas maneras, la susceptibilidad, y por ende la permeabilidad, a las drogas en las bacterias expresando RibJ no estuvo aumentada respecto a la cepa control. Estos resultados refuerzan la idea de que la riboflavina no ingresa a la bacteria de forma inespecífica, sino mediada por un transportador específico.

Efecto de las flavinas y sus análogos en diferentes procesos biológicos de *T. cruzi*

Influencia de las flavinas y análogos tóxicos en la capacidad metaciclogénica de *T. cruzi*

Además de afectar la capacidad proliferativa de los epimastigotes de *T. cruzi*, se analizó el posible rol de las flavinas en otros procesos biológicos del parásito como la metaciclogénesis.

Para estos ensayos, se trabajó con epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y-GFP que fueron inducidos a metaciclogénesis en medio TAU en presencia de distintas concentraciones de flavinas; el conteo de los tripomastigotes metacíclicos obtenidos se realizó luego de tratar los cultivos con suero humano fresco que lisa a los epimastigotes remanentes (esquema de trabajo **Figura R-36A**; más detalles en Materiales y Métodos).

En el caso de los epimastigotes cultivados en medio SDM20, luego de inducir la metaciclogénesis en ausencia de flavinas, se obtuvo un número basal de tripomastigotes metacíclicos de $1,70 \pm 0,13$ millones de tripomastigotes/ml ($7,58 \pm 0,72$ % respecto de la cantidad inicial de epimastigotes ensayada). Al agregar riboflavina o FMN en el momento de la inducción la metaciclogénesis se observó que, con 20 nM, el porcentaje de tripomastigotes metacíclicos obtenidos se incrementó a $11,3 \pm 1,6$ y $15,0 \pm 1,6$ %, respectivamente (**Figura R-36B**); dicho efecto no aumentó proporcionalmente con el aumento de la concentración de las flavinas, pues a 300 nM de estas, no se registraron diferencias significativas en el porcentaje de tripomastigotes metacíclicos con la condición anterior (para riboflavina se contabilizó un $14,5 \pm 1,3$ % y para FMN un $16,0 \pm 0,9$ %). Cuando se utilizó FAD, se observó que con 20 nM, el porcentaje de tripomastigotes metacíclicos aumentó a $11,8 \pm 0,5$ %, y con 300 nM siguió aumentando hasta obtenerse un porcentaje de $20,8 \pm 2,3$ % (**Figura R-36B**).

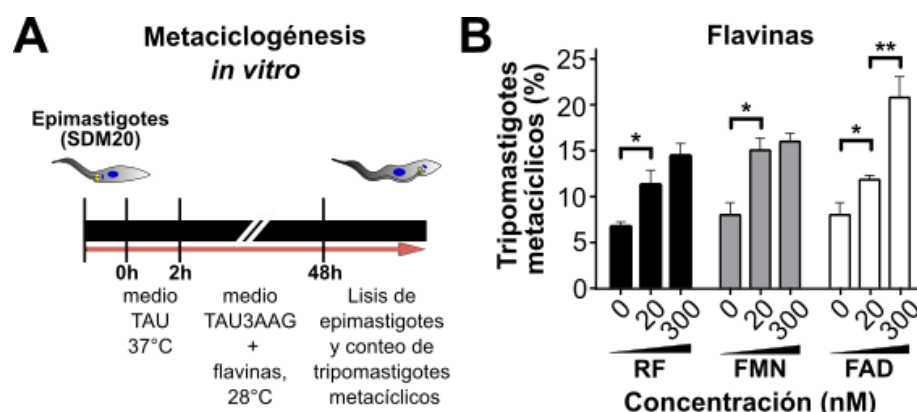


Figura R-36. Las flavinas estimularon la metaciclologénesis en *T. cruzi* cultivado en medio con baja riboflavina. A) Esquema del procedimiento llevado a cabo: parásitos de la cepa Y-GFP se cultivaron en medio SDM20. Luego, se cosecharon, resuspendieron en TAU base y se incubaron 2 h a 37°C. Luego, cada alícuota de 25 millones de parásitos se incubó a 28°C por 48 h en medio TAU3AAG, suplementado con flavinas. Luego, se trató con suero humano fresco para la lisis de los epimastigotes remanentes, y se contaron los tripomastigotes metacíclicos formados. En B) la diferenciación se realizó en presencia de 0, 20 o 300 nM de riboflavina (RF), FMN o FAD. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$), en al menos 3 ensayos independientes.

Posteriormente, se repitió el ensayo utilizando parásitos Y-GFP cultivados en SDM20 con 300 nM de riboflavina (**Figura R-37A**). En este caso, el número basal (en ausencia de flavinas durante la inducción) de tripomastigotes metacíclicos obtenidos fue de $0,75 \pm 0,12$ parásitos/ml ($2,2 \pm 0,5$ % respecto de la cantidad inicial de epimastigotes ensayadas) (**Figura R-37B**); el agregado de flavinas no aumentó el porcentaje de diferenciación (**Figura R-37B**).

Estos resultados muestran que parásitos creciendo en condiciones limitantes de riboflavina (20 nM) tuvieron mayor capacidad de metaciclologénesis y de respuesta a las diferencias de concentración de flavinas en el medio de diferenciación que aquellos cultivados en una concentración óptima de la vitamina (300 nM).

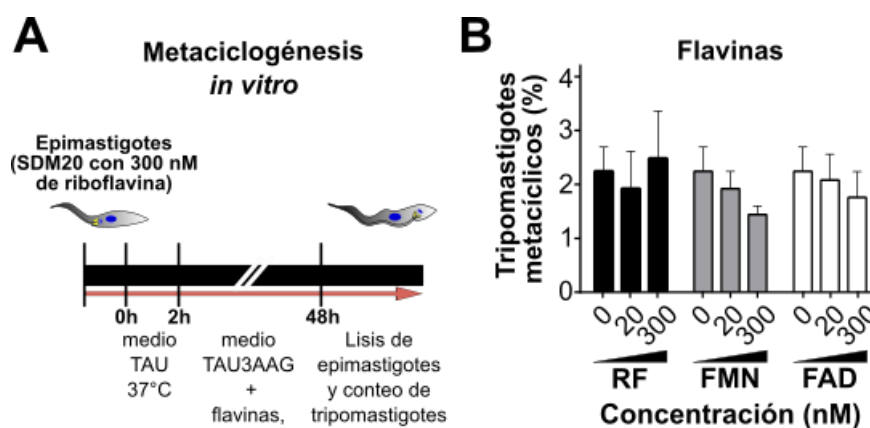


Figura R-37. Las flavinas no estimularon la metacicloogénesis en *T. cruzi* cultivado en medio con alta riboflavina. A) Esquema del procedimiento llevado a cabo: parásitos de la cepa Y-GFP se cultivaron en medio SDM20 con 300 nM de riboflavina. Luego, se cosecharon, resuspendieron en TAU base y se incubaron 2 h a 37°C. Luego, cada alícuota de 25 millones de parásitos se incubó a 28°C por 48 h en medio TAU3AAG, suplementado con flavinas. Luego, se trató con suero humano fresco para la lisis de los epimastigotes remanentes, y se contaron los tripomastigotes metacíclicos formados. En B) la diferenciación se realizó en presencia de 0, 20 o 300 nM de riboflavina (RF), FMN o FAD. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$), en al menos 3 ensayos independientes.

Por otra parte, se analizó si los análogos de riboflavina son capaces de afectar la metacicloogénesis de los epimastigotes. Para ello, parásitos de la cepa Y-GFP se cultivaron en SDM20, y al momento de la inducción de la metacicloogénesis se agregaron los análogos y riboflavina a 300 nM (**Figura R-38A**). Con 300 nM de riboflavina, los parásitos diferenciaron en un $13,9 \pm 1,3$ % (equivalentes a $3,5 \pm 0,3$ tripomastigotes metacíclicos/ml) respecto de la cantidad inicial de epimastigotes utilizados. Pero cuando los parásitos se incubaron en presencia de roseoflavina (1 μ M), lumiflavina (10 μ M) o lumicromo (10 μ M), la capacidad metacicloogénica de *T. cruzi* disminuyó significativamente a $0,7 \pm 1,2$ %, $7,0 \pm 1,9$ % y $9,4 \pm 1,0$ %, respectivamente (**Figura R-38B**). Sin embargo, aún nos queda por determinar si este efecto fue causa de que los análogos disminuyeron (i) la viabilidad de los epimastigotes, (ii) directamente la metacicloogénesis o (iii) la viabilidad de los tripomastigotes metacíclicos obtenidos.

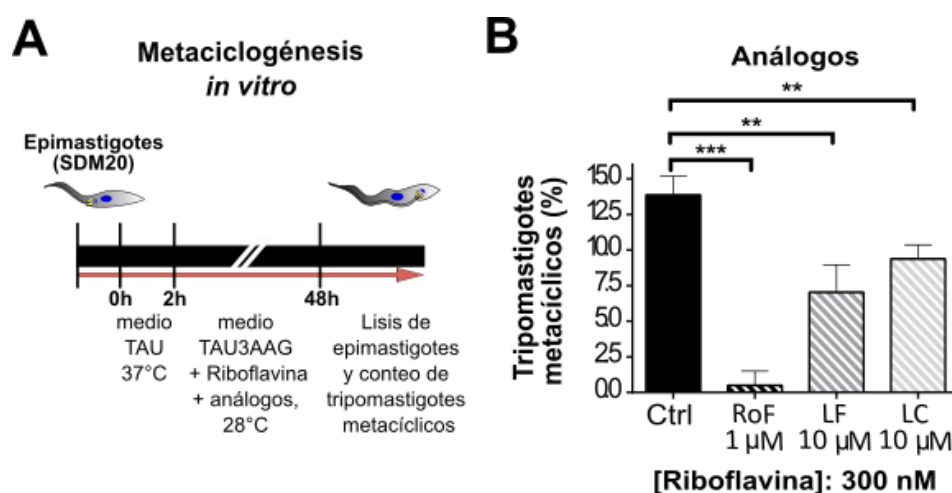


Figura R-38. Los análogos de riboflavina disminuyeron la metaciclogénesis en *T. cruzi*. A) Esquema del procedimiento llevado a cabo: parásitos de la cepa Y-GFP se cultivaron en medio SDM20. Luego, se cosecharon, resuspendieron en TAU base y se incubaron 2 h a 37°C. Luego, cada alícuota de 25 millones de parásitos se incubó a 28°C por 48 h en medio TAU3AAG, suplementado con roseoflavina (RoF 1 µM) o lumiflavina (LF 10 µM) o lumicromo (LC 10 µM). Luego, se trató con suero humano fresco para la lisis de los epimastigotes remanentes, y se contaron los tripomastigotes metacíclicos formados. En B) la diferenciación se realizó en presencia de 0, 20 o 300 nM de riboflavina (RF), FMN o FAD. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005), en al menos 3 ensayos independientes.

Estos resultados sugieren que la biodisponibilidad de flavinas –antes y durante la inducción a la diferenciación- tiene un rol determinante en la capacidad metaciclogénica de los epimastigotes de *T. cruzi*.

Sobrevida e infectividad de tripomastigotes, y proliferación de amastigotes en presencia de análogos de riboflavina

Cuando los tripomastigotes sanguíneos salen de la célula hospedadora ingresan al torrente sanguíneo, y así pueden invadir varios tipos celulares (**Figura I-2**). La invasión celular es considerada uno de los procesos esenciales en el ciclo de vida de *T. cruzi*, dado que no solamente le permite escapar del sistema inmune sino que además favorece la supervivencia y replicación de los parásitos en el hospedador mamífero y la progresión de su ciclo biológico. Por este motivo, se decidió evaluar varios parámetros relacionados con la persistencia de la infección en el hospedador frente a los análogos tóxicos de riboflavina.

Sobrevida de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*

Para evaluar la supervivencia *in vitro* de tripomastigotes sanguíneos, parásitos de la cepa RA fueron extraídos de ratones infectados e incubados en medio fresco en presencia o ausencia de análogos tóxicos de riboflavina. En presencia de lumiflavina se observó un gran descenso en la cantidad de tripomastigotes sanguíneos sobrevivientes (93,1 % respecto del control sin análogos), registrándose un valor de $2,2 \pm 2,5 \times 10^4$ parásitos/ml (**Figura R-39A**). Mientras que el resto de los análogos no modificaron la sobrevida de los tripomastigotes sanguíneos, observándose cantidades de parásitos similares a los del control.

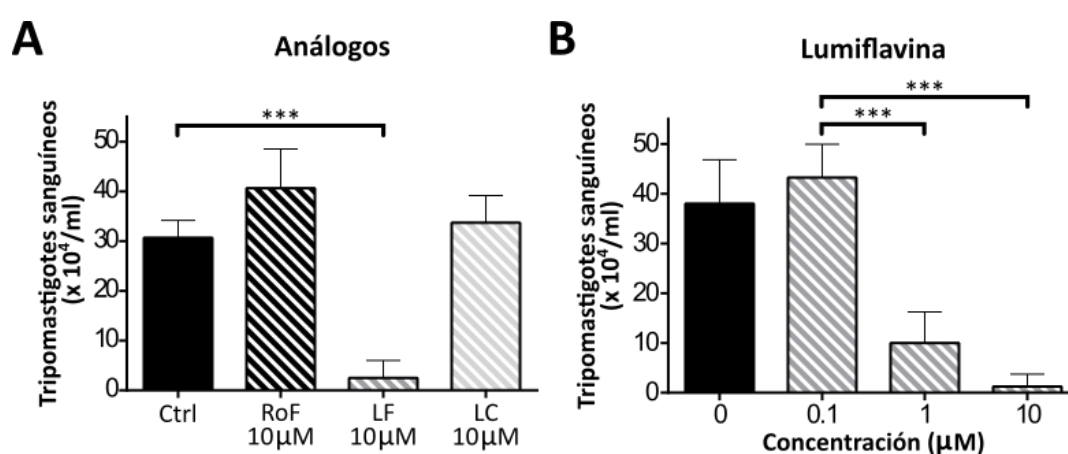


Figura R-39. La sobrevida de los tripomastigotes sanguíneos disminuyó en presencia del análogo lumiflavina. A) Los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (cepa RA) se cultivaron en ausencia (control: Ctrl) o presencia de roseoflavina (RoF), lumiflavina (LF) o lumicromo (LC) a una concentración final de 10 μ M. B) Los tripomastigotes sanguíneos se cultivaron con distintas concentraciones de lumiflavina (0, 0,1, 1 y 10 μ M). Todas las incubaciones (en A y B) se realizaron durante 24 h a 37 °C en medio RPMI fresco + 10 % de SFB; al día siguiente, la cuantificación de los parásitos sobrevivientes se realizó por conteo en cámara de Neubauer. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$), en al menos 3 ensayos independientes.

Posteriormente, se decidió analizar, en más detalle, el efecto de lumiflavina en la supervivencia de los tripomastigotes sanguíneos. Para ello, estas formas se incubaron con distintas concentraciones de lumiflavina (**Figura R-39B**). En bajas concentraciones del análogo (0,1 μ M) no se registró efecto alguno en la cantidad de parásitos en comparación con el control sin drogas (0 μ M); pero al aumentar la concentración 10 o 100 veces, el número de parásitos decayó un 73,7 % ($10,0 \pm 6,3 \times 10^4$ parásitos/ml) y un 96,7 % ($1,3 \pm 2,5 \times 10^4$ parásitos/ml), respectivamente.

Estos resultados muestran que los tripomastigotes sanguíneos son altamente sensibles al análogo lumiflavina, mientras que roseoflavina y lumicromo parecen no actuar sobre estas formas. Esto sugiere que el patrón de sensibilidad registrado en tripomastigotes es diferente al observado previamente en epimastigotes (**Figura R-8** y **Figura R-39**).

Capacidad infectiva de tripomastigotes derivados de cultivos celulares y proliferación de amastigotes

Para analizar el efecto de las flavinas en la capacidad infectiva de *T. cruzi*, a diferencia de los estudios de sobrevivencia, se utilizaron tripomastigotes derivados de cultivos celulares (TCTs: *Tissue cultured-derived trypomastigotes*), semejantes a la forma sanguínea pero de obtención simplificada *in vitro* (Maeda et al. 2012).

Los ensayos de infección *in vitro* se realizaron con TCTs de la cepa Y-GFP, obtenidos de monocapas de células VERO infectadas, que son altamente infectivos y, por la expresión de GFP, pueden fácilmente visualizarse en la célula hospedadora (Barclay et al. 2011). Se infectaron monocapas de la línea H9C2 (células cardíacas de rata, sensibles a la infección por *T. cruzi* (Rodríguez et al. 2014)), en presencia o ausencia de los análogos roseoflavina, lumiflavina o lumicromo (esquema de trabajo **Figura R-40A**; más detalles en Materiales y Métodos); se obtuvieron imágenes confocales (fotografías representativas de los ensayos **Figura R-40B**) a partir de las cuales se cuantificaron dos parámetros: el porcentaje de células H9C2 infectadas y el número de amastigotes por célula infectada.

Al analizar el porcentaje de células infectadas, en presencia de roseoflavina y de lumiflavina se observó un descenso cercano al 50 % respecto del control ($9,3 \pm 7,2$ y $8,3 \pm 8,0$ vs. $18,2 \pm 0,5$ % de células infectadas, respectivamente), mientras que los valores de infectividad con lumicromo fueron cercanos al control ($16,7 \pm 1,8$ % de células infectadas) (**Figura R-40C**). Si bien los resultados no alcanzaron una significancia estadística, podría deberse a que el experimento sólo pudo realizarse por duplicado. De confirmarse la tendencia, esto indicaría que los análogos podrían afectar la capacidad infectiva de los parásitos.

Con respecto al número de amastigotes por célula, con lumiflavina y lumicromo se registró una reducción respecto del control, con valores de $1,8 \pm 0,1$ y $2,4 \pm 0,2$ amastigotes/célula infectada vs. $4,3 \pm 0,4$ amastigotes/célula infectada, respectivamente; como en el caso anterior, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas, posiblemente por tratarse de un experimento que sólo cuenta con duplicados. Con roseoflavina, se registró un efecto sobre el número de amastigotes, estadísticamente significativo, de manera tal que el descenso fue del 60,8 % ($1,7 \pm 0,1$ amastigotes/célula infectada) (**Figura R-40D**).

Puesto que los niveles de riboflavina en células de rata depende de transportadores específicos, sensibles a análogos de riboflavina (Yamamoto et al. 2009), realizamos un ensayo en el que se analizó la toxicidad de los análogos sobre las células H9C2 mediante el sistema Alamar Blue®, para determinar si el efecto sobre la replicación intracelular de los parásitos estaba relacionado con alteraciones en la actividad metabólica – como medida de la viabilidad - de la célula hospedadora.

De los análogos estudiados, roseoflavina presentó una disminución del 51,8 % en la cantidad de Alamar Blue® reducido, indicando un efecto tóxico sobre la viabilidad de las células (**Figura R-40E**). Se ha visto que la roseoflavina, además de la potencial actividad inhibitoria sobre el transporte de riboflavina, también es sustrato de las enzimas riboflavin-quinasa y FAD sintetasa, obteniéndose los productos roseoflavina mononucleótido (RoFMN) y roseoflavina adenina dinucleótido (RoFAD), respectivamente (Pedrolli et al. 2013); estos compuestos actúan como antimetabolitos que son reconocidos por varias flavoproteínas e inhiben su actividad (Pedrolli et al. 2013).

Por otro lado, mientras lumicromo no presentó efectos (**Figura R-40E**), inesperadamente, con lumiflavina se observó que la absorbancia se duplicó respecto del control (**Figura R-40E**). Este efecto podría estar relacionado con una alteración en la actividad antioxidante de las células H9C2, pues lumiflavina aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno (Lee et al. 2013). Vale aclarar que mientras que las mediciones con Alamar Blue® presentaron diferencias con los tres análogos de flavinas, en los tres casos el número de células hospedadoras fue similar. Estos resultados muestran que los análogos roseoflavina y lumiflavina alteraron la actividad metabólica

de las células hospedadoras (aunque por diferentes mecanismos) al mismo tiempo que afectarían la progresión del ciclo celular de *T. cruzi*.

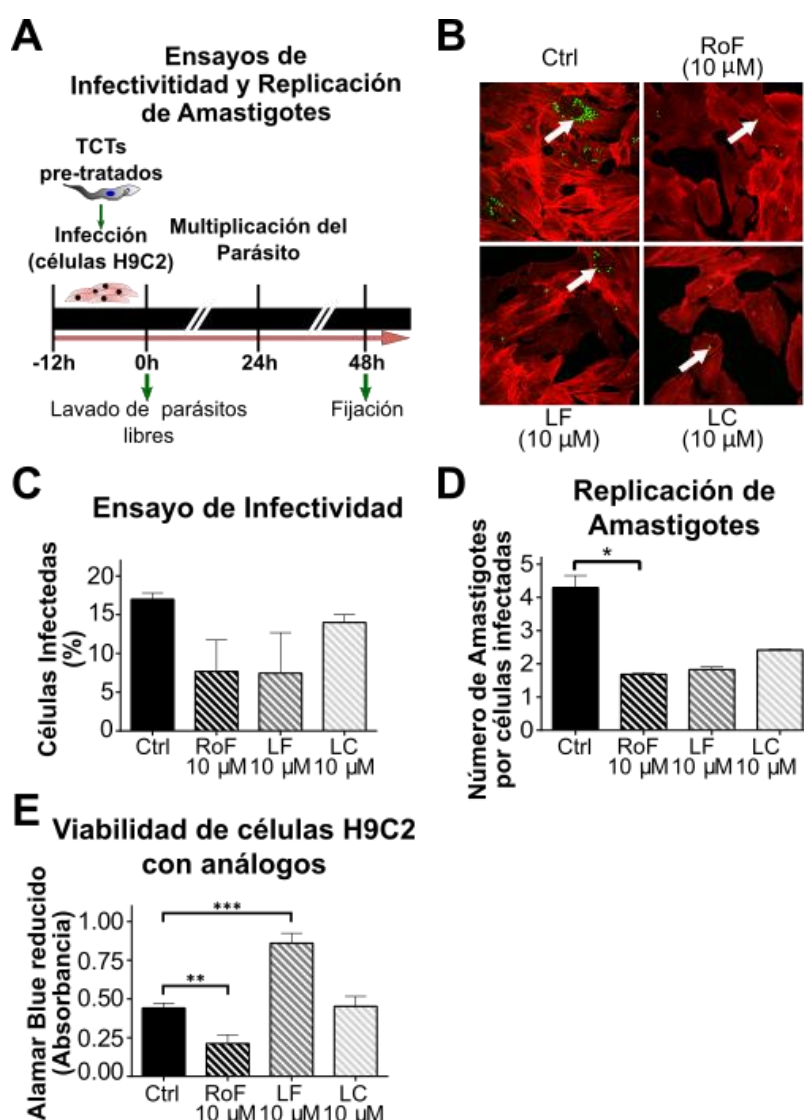


Figura R-40. Los análogos de riboflavina interfirieron, al menos en parte, con el proceso de infección. A) Esquema del procedimiento llevado a cabo para los ensayos de infectividad y replicación de amastigotes. Brevemente, tripomastigotes de la cepa Y-GFP se pre-trataron por 2 h con análogos de riboflavina y se utilizaron para inocular células H9C2 en monocapa. Luego de 12 h de infección a 37°C, se realizaron lavados para eliminar los parásitos que no infectaron. Las células infectadas se incubaron en medio fresco en presencia de análogos por 48 h a 37°C. B) Imágenes confocales de células infectadas conteniendo amastigotes Y-GFP en las siguientes condiciones: control, roseoflavina (RoF) 10 μ M, lumiflavina (LF) 10 μ M o lumicromo (LC) 10 μ M. Se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos. C) Porcentaje de células H9C2 infectadas (se contaron aproximadamente 100 células en cada condición). D) Número de amastigotes por célula H9C2 infectada. E) Ensayo de toxicidad con 10 μ M de los análogos de riboflavina sobre células H9C2 tratadas basado en la tecnología de Alamar Blue®. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005), en al menos 2 ensayos independientes.

En su conjunto, estos resultados aportan las primeras evidencias sobre el rol de las flavinas en varios procesos biológicos relevantes en el ciclo de vida de *T. cruzi*, como la proliferación y diferenciación de epimastigotes, la sobrevivencia de tripomastigotes sanguíneos y la replicación de amastigotes dentro de la célula hospedadora. De esta manera, y más allá de ciertas dificultades operativas con los análogos de riboflavina como la baja solubilidad o el efecto citotóxico sobre las células hospedadoras, la vía metabólica de flavinas de *T. cruzi* es un potencial blanco terapéutico para la enfermedad de Chagas.

Búsqueda y análisis de fármacos con potencial actividad inhibitoria de transporte de riboflavina en *T. cruzi*

Debido a los resultados hasta aquí obtenidos, se decidió estudiar sobre *T. cruzi* el efecto de compuestos que compartan cierto grado de similitud con riboflavina, con el fin de encontrar aquellos que pudieran actuar de forma específica en el parásito y sin efectos citotóxicos en el hospedador.

Efecto de las drogas daunomicina y doxorubicina sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Daunomicina y doxorubicina son compuestos usados como anticancerígenos (Yang et al. 2014) que presentan cierto grado de similitud estructural con la riboflavina (**Figura R-41**). Estas drogas tienen actividad tripanocida *in vitro*, por inhibición de la enzima topoisomerasa II del parásito (Das et al. 2004); sin embargo, hasta el momento se desconoce el/los mecanismo/s por el cual ingresan al parásito. En esta sección se evaluó si daunomicina y/o doxorubicina ingresan mediante el transportador de riboflavina.

Para ello, primero evaluamos el efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y-GFP) en presencia de distintas concentraciones de estas drogas. Tanto daunomicina como doxorubicina disminuyeron el crecimiento de los epimastigotes de manera dosis dependiente, registrándose valores de $IC_{50} = 0,36 \pm 0,02 \mu M$ y $1,8 \pm 1,1 \mu M$, respectivamente (**Figura R-41A y B**).

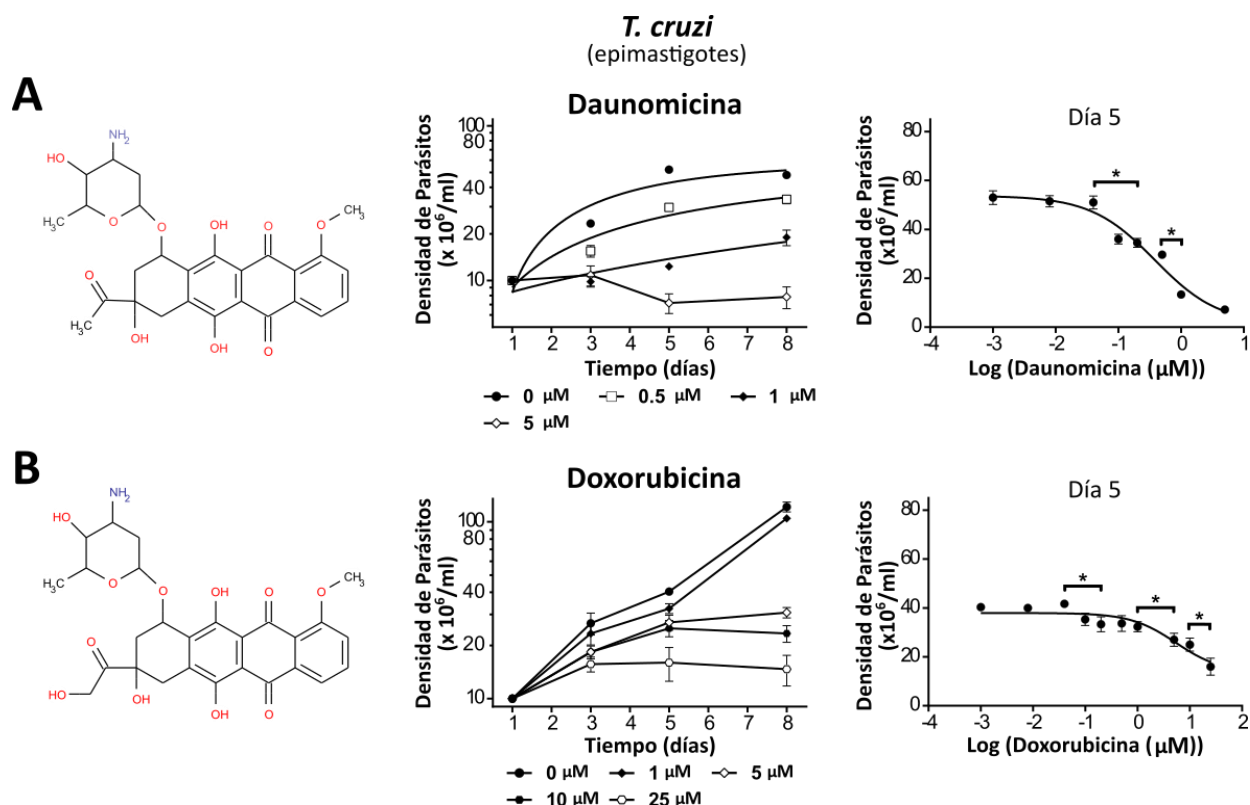


Figura R-41. Las drogas daunomicina y doxorubicina inhibieron la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. Las curvas de crecimiento de parásitos se realizaron en medio SDM20 conteniendo 300 nM de riboflavina en presencia de distintas concentraciones de las drogas: A) daunomicina (0, 0,008, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 5 μM) y B) doxorubicina (además de las concentraciones anteriores se agregaron las concentraciones 10 y 25 μM). Columna izquierda: estructura química de las drogas daunomicina y doxorubicina; columna del medio: algunas de las curvas de crecimiento obtenidas; columna derecha: la densidad alcanzada al quinto día de cultivo (Día 5) en función de la concentración de droga. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (*p<0,05) en al menos 3 ensayos independientes.

Efecto de las drogas daunomicina y doxorubicina sobre la capacidad metaciclógica de *T. cruzi*

Se analizó si daunomicina como doxorubicina son capaces de interferir con la metaciclógenesis de *T. cruzi* (esquema de trabajo **Figura R-42A**). Para estos ensayos, se utilizaron las drogas a concentraciones cercanas a las IC₅₀ calculadas para epimastigotes (sección anterior).

Mientras que en el control un 14,8 ± 1,0 % de los epimastigotes diferenciaron a tripomastigotes metacíclicos, con daunomicina sólo un 8,9 ± 1,3 % diferenciaron y con doxorubicina un 10,2 ± 1,1 % (**Figura R-42B**). Al igual que con los análogos de riboflavina, no se pudo determinar a qué nivel ocurrió la inhibición de la metaciclógenesis.

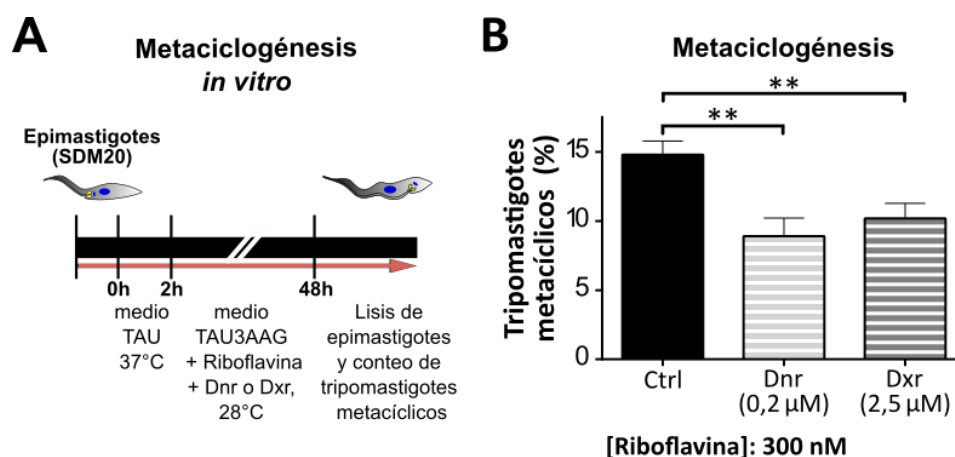


Figura R-42. Las drogas daunomicina y doxorubicina inhibieron la metaciclogénesis de *T. cruzi*. A) Esquema del procedimiento llevado a cabo: parásitos de la cepa Y-GFP, cultivados en medio SDM20, se cosecharon, resuspendieron en TAU base y se incubaron 2 h a 37°C. Luego, cada alícuota de 25 millones de parásitos se incubó a 28°C por 48 h en medio TAU3AAG con 300 nM de riboflavina, suplementado con daunomicina (Dnr) 0,2 µM, doxorubicina (Dxr) 2,5 µM o sin droga (Ctrl). Luego, se trató con suero humano fresco para la lisis de los epimastigotes y se contaron los tripomastigotes metacíclicos formados. B) Porcentaje de tripomastigotes metacíclicos obtenidos en los diferentes tratamientos. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$), en al menos 3 ensayos independientes.

Efecto de las drogas daunomicina y doxorubicina sobre la capacidad infectiva de tripomastigotes TCTs y replicación intracelular de amastigotes de *T. cruzi*

Posteriormente, realizamos ensayos de infectividad y de proliferación de amastigotes en presencia de daunomicina y doxorubicina (esquema **Figura R 43A**).

A las concentraciones ensayadas, doxorubicina tuvo un efecto citotóxico sobre las células hospedadoras, reflejado tanto en la morfología celular (**Figura R 43B**) como en la viabilidad (**Figura R 43E**). En consecuencia no pudo hacerse un análisis detallado del efecto de esta droga sobre la infectividad de *T. cruzi*.

Cuando se analizó el efecto de daunomicina, no se observaron diferencias en el porcentaje de infectividad respecto del control (**Figura R 43C**); el número de amastigotes se redujo a la mitad, sin embargo estas diferencias no resultaron estadísticamente ($4,9 \pm 0,1$ y $2,4 \pm 0,2$ amastigotes/célula infectada para el control y daunomicina, respectivamente) (**Figura R 43D**). Por otra parte, no se observaron cambios en la viabilidad ni en el número/morfología de las células H9C2 en presencia de la droga (**Figura R 43B y E**). Estos resultados indican que, al igual que con

los análogos de riboflavina, daunomicina no modificaría la capacidad infectiva de los tripomastigotes TCTs pero afectaría la capacidad replicativa de los amastigotes.

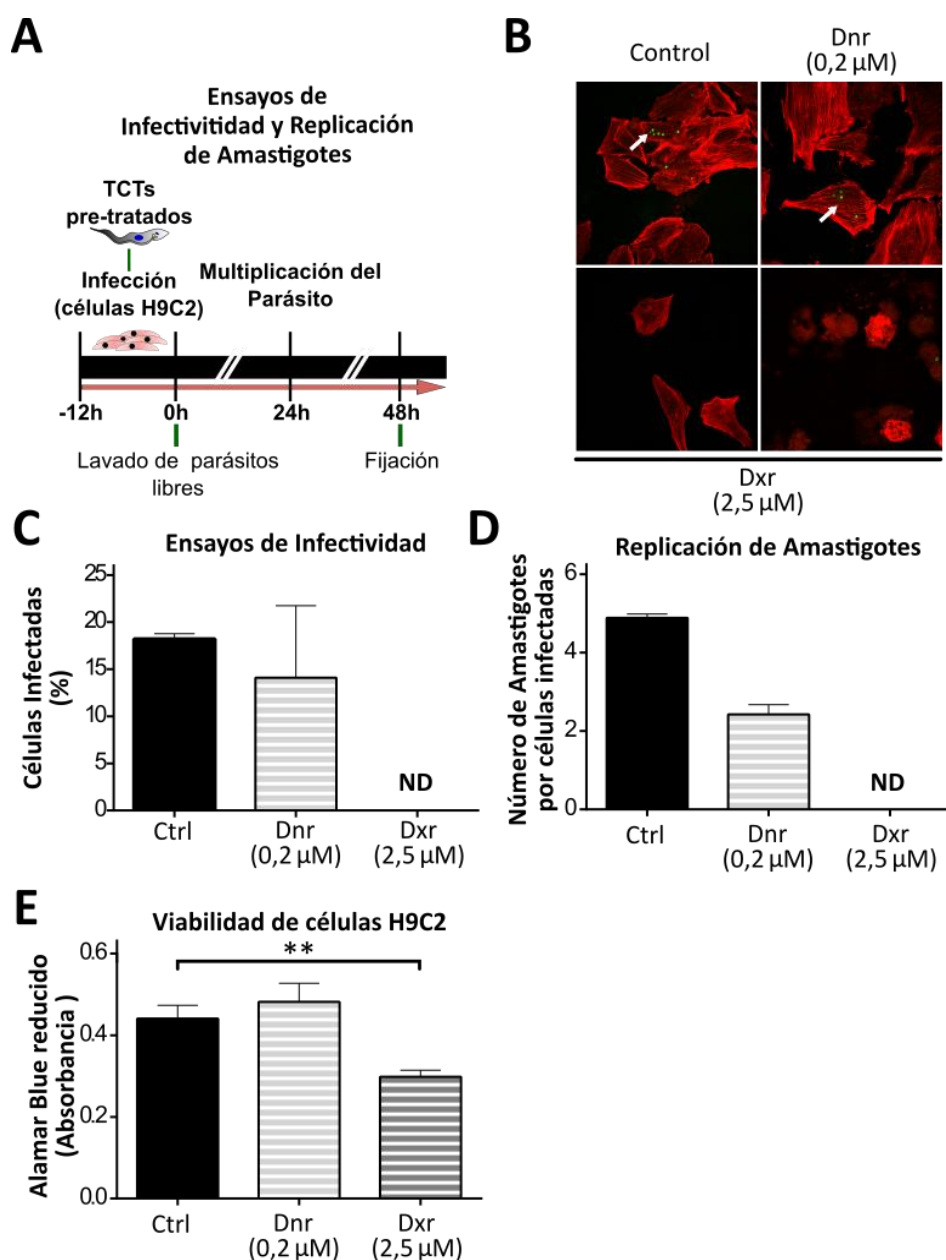


Figura R 43. Efecto de las drogas daunomicina y doxorubicina sobre el proceso de infección de TCTs de *T. cruzi*. A) Esquema del ensayo realizado. Brevemente, los tripomastigotes de la cepa Y-GFP pre-tratados durante 2 h con daunomicina (Dnr, 0,2 μ M), doxorubicina (Dxr, 2,5 μ M) o sin droga (Ctrl), se utilizaron para inocular células H9C2. Luego de varios lavados, los co-cultivos se incubaron en medio fresco en presencia de estas drogas por 48 h a 37°C. B) Imágenes confocales de células infectadas conteniendo amastigotes Y-GFP. C) Porcentaje de células H9C2 infectadas (se contaron aproximadamente 100 células en cada condición). D) Número de amastigotes por célula H9C2 infectada. E) Ensayo de toxicidad basado en la tecnología de Alamar Blue® en células H9C2 tratadas

con las drogas a la misma concentración. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$), en al menos 3 mediciones independientes. ND = no determinado.

Efecto de las drogas daunomicina y doxorubicina sobre el transporte de riboflavina en epimastigotes de *T. cruzi*

Finalmente se evaluó si los efectos de estas drogas sobre *T. cruzi* estaban relacionados con el transporte de riboflavina. Para ello, epimastigotes de *T. cruzi* se incubaron en presencia de $0,3 \mu\text{M}$ de ^3H -riboflavina, junto con las drogas a una concentración de 10 o 100 veces superior.

En los ensayos de desplazamiento, el transporte de ^3H -riboflavina no se vio afectado tanto con daunomicina como con doxorubicina (**Figura R-44**), sugiriendo que el efecto de estas drogas en *T. cruzi* ocurre independientemente al transporte de riboflavina. Recientemente se demostró en células humanas que la daunorubicina y doxorubicina son incorporados con alta afinidad por el transportador de L-carnitina hOCT1 (familia SLC22A1) (Andreev et al. 2016). Teniendo en cuenta esto, realizamos una búsqueda *in silico* en el genoma de *T. cruzi* y encontramos un gen (TcCLB.505183.130) con un 27,9 % de similitud (16,5 % de identidad) con hOCT1 (resultado no mostrado), que podría ser el responsable del efecto observado en nuestros resultados. Esta hipótesis no ha sido explorada por lo que no se descarta que sea otro/s el /los posible/s transportador/es involucrado/s.

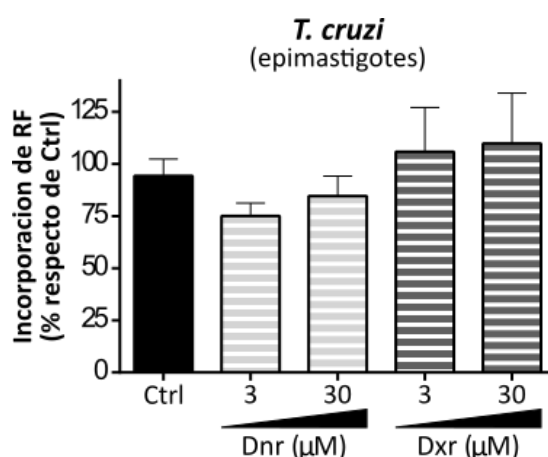
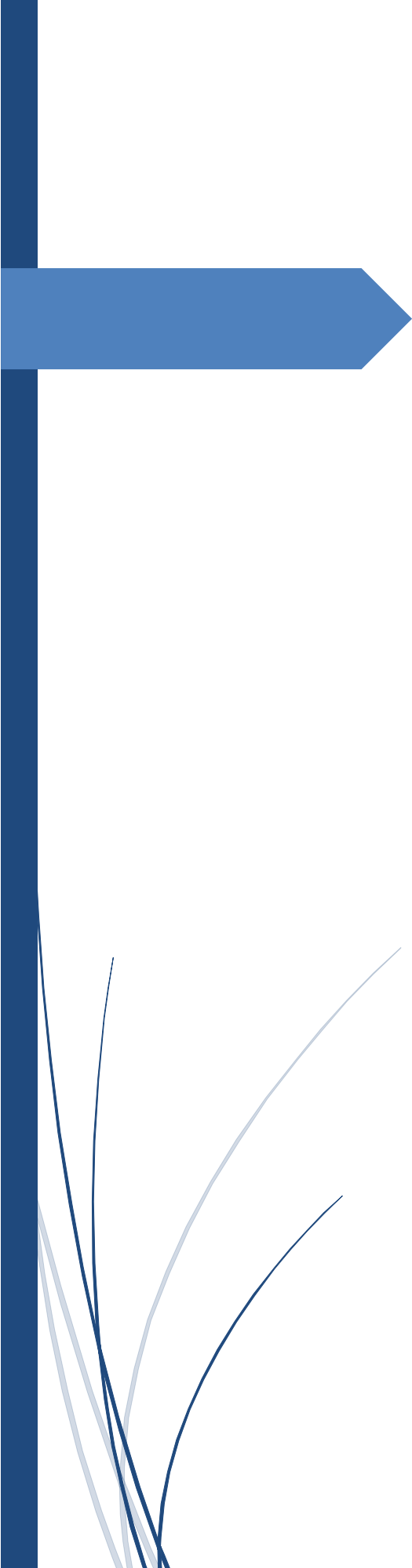


Figura R-44. Ensayos de competencia sobre el transporte de ^3H -riboflavina en epimastigotes de *T. cruzi*. Parásitos de la cepa Y-GFP se cultivaron en BHT hasta alcanzar la fase logarítmica media, se cosecharon e incubaron en PBS conteniendo $0,3 \mu\text{M}$ de ^3H -riboflavina en presencia o ausencia de

daunorubicina (Dnr) o doxorubicina (Dxr), a 3 o 30 μ M Las alícuotas se tomaron a 0 min y 15 min, en al menos 3 mediciones independientes.



DISCUSIÓN

Relevancia de las tripanosomiasis

Las Enfermedades Olvidadas (*Neglected Diseases*, ND) son un grupo de enfermedades que afectan a los sectores más pobres de la población (viviendo principalmente en zonas rurales y algunas regiones urbanas, con baja calidad de higiene y, generalmente, en contacto cercano con los vectores infecciosos). Además, se definen como tales por el bajo presupuesto e interés que han recibido históricamente. Se estima que 1.000 millones de personas en el mundo estarían afectadas, en 149 países. Estas enfermedades, además de tener un gran impacto sobre la salud humana, afectan a nivel económico-social pues profundizan la pobreza, generan incapacidad y/o secuelas persistentes en el tiempo, disminuyen la productividad del individuo e impactan negativamente en el desarrollo infantil y el embarazo (Hotez et al. 2007). De esta manera, estas enfermedades generan un ciclo de pobreza retroalimentado por sí mismo (Bonney 2014). Actualmente existen 19 Enfermedades Olvidadas, entre las que se destacan la Enfermedad de Chagas, la Enfermedad del Sueño y varios tipos de leishmaniasis (World Health Organization 2013).

Hasta el momento, los controles más efectivos contra estas enfermedades consisten en intervenciones a nivel de salud pública, haciendo hincapié en la educación, condiciones de higiene y saneamiento, en el control de los vectores y en la salud pública veterinaria (http://www.who.int/neglected_diseases/5_strategies/en/).

En consecuencia, hay una necesidad urgente de encontrar terapias, nuevas o complementarias, seguras y más efectivas que las existentes para tratar estas tripanosomiasis.

Esencialidad de las vitaminas del complejo B en Tripanosomátidos: Enfoque especial en flavinas

Las vitaminas del complejo B son pequeñas moléculas orgánicas esenciales para cualquier tipo celular. Si bien en muchos organismos se conocen las rutas de síntesis y/o transporte de estas vitaminas (Magnúsdóttir et al. 2015; Jaehme & Slotboom 2015), en tripanosomátidos se están realizando recientes avances en comprender cómo las obtienen y su impacto sobre su ciclo de vida.

Rol de flavinas y flavoproteínas en *T. cruzi* y tripanosomátidos relacionados

La riboflavina (vitamina B2) es un compuesto esencial y ubicuo en la naturaleza, precursor de los cofactores FMN y FAD. Analizando el genoma de los tripanosomátidos *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana*, encontramos que el número estimado de flavoproteínas predichas / confirmadas fue 56 (0,54 % del total de proteínas), 64 (0,58 % del total de proteínas) y 71 (0,86 % del total de proteínas), respectivamente (**Figura R-1A**). Probablemente, estos valores estimados *in silico* difieran de los reales y varíen en el tiempo, pues la base de datos Trityps está en continua revisión gracias a la creciente información acerca de estas proteínas; más allá de la precisión de los números, las flavoproteínas representan una proporción importante del proteoma en los tres parásitos.

Al comparar los flavoproteomas de estos 3 tripanosomátidos observamos una alta similitud entre sí, con excepción de la vía de regeneración de metionina a partir de homocisteína (flavoenzimas involucradas: metilentetrahidrofolato reductasa y metionina sintasa reductasa), solamente presente en especies de *Leishmania* (Vickers et al. 2006; Alcolea et al. 2016). Se ha propuesto que esta vía podría conferir a las leishmanias alguna ventaja selectiva en ciertas condiciones (Vickers et al. 2006), pero se desconoce su relevancia sobre los mecanismos de infección, proliferación, supervivencia, diferenciación, etc. Esto sugiere que, además de las múltiples diferencias existentes entre estos tripanosomátidos, también existirían diferencias a nivel del flavoproteoma.

Flavinas y flavoproteínas en parásitos de *T. cruzi* y organismos de vida libre como *S. cerevisiae*

Comparando con *S. cerevisiae*, el número de flavoproteínas estimado en *T. cruzi* resultó muy cercano al registrado en la levadura (68, 1,1 % del total de proteínas) (Gudipati et al. 2014), pero el perfil de flavoproteínas fue diferente. En este sentido, el número de vías involucradas en *T. cruzi* resultó menor que para *S. cerevisiae*. Es decir que el flavoproteoma de *T. cruzi* sufrió una reducción, ya que muchas de las rutas metabólicas donde participan algunas flavoenzimas no se encontraron en estos parásitos. Entre las flavoenzimas presentes en *S. cerevisiae* y ausentes en *T. cruzi* se destacan aquellas que participan en la síntesis de hemo (Hem14p), de vitamina B6

(Pdx3p), de glutamato vía glutamato sintasa (Glt1p), de NAD (Bna4p), de aminoácidos aromáticos (Aro2p) y de metionina (Met5p), entre otras (Gudipati et al. 2014).

Esta tendencia de reducir la cantidad de rutas biosintéticas en *T. cruzi*, y tripanosomátidos en general, acompañada de la expresión de transportadores que permiten la incorporación específica de los metabolitos del medio extracelular, es característica del estilo de vida parasitario (Dean et al. 2014); tal es el caso, por ejemplo, de los aminoácidos aromáticos y del grupo hemo (Hasne & Barrett 2000; Merli et al. 2016).

Además de la estrategia del transporte, los tripanosomátidos presentan vías de salvataje que permiten el reciclado de varios metabolitos. Por ejemplo, si bien *T. cruzi* no sintetiza NAD⁺ *de novo*, se ha comprobado que tiene una maquinaria para el salvataje de NAD⁺, cuyos componentes no son flavoenzimas (Klein et al. 2013). Adicionalmente a esa maquinaria, en el análisis *in silico* del proteoma de *T. cruzi* hemos detectado flavoenzimas involucradas en el balance NAD⁺/NADH (**Figura R-1A**), que contribuirían a la recuperación de NAD⁺ (Guerra et al. 2006). Extensivamente, esto sugiere que, como sucede en muchos organismos, en *T. cruzi* las flavoenzimas identificadas *in silico* cumplirían un rol importante para mantener los niveles adecuados de metabolitos esenciales (como NAD⁺), aunque sus funciones aún no fueron evaluadas a nivel bioquímico (**Figura R-1A**).

Otro ejemplo de flavoenzimas esenciales en *T. cruzi* es la UDP-galactopiranos mutasa, encargada de sintetizar UDP-galactofuranosa, precursor del azúcar galactofuranosa. Esta enzima, característica de varios patógenos, es uno de los principales factores de virulencia en tripanosomátidos (Oppenheimer et al. 2012). Debido a que la enzima no existe en humanos, fue propuesta como un promisorio blanco terapéutico.

El análisis del flavoproteoma de *T. cruzi* (**Figura R-1A**), también estaría evidenciando una sobre-representación, en comparación con *S. cerevisiae*, del número de flavoenzimas (nueve) que participan en la biosíntesis de ergosterol, principal esteroide presente en las membranas de tripanosomátidos (Gudipati et al. 2014); esto aseguraría mantener la integridad y funcionalidad del complejo sistema de membranas de *T. cruzi* (De Vas et al. 2011) (**Figura I-11B**). Interesantemente, una de estas flavoenzimas, la citocromo P450 reductasa, fue propuesta como

blanco terapéutico pues varios antifúngicos (principalmente, posaconazol) inhiben dicha enzima (Rassi et al. 2012).

Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* (que presenta 8 flavoproteínas relacionadas al metabolismo de hierro reducido (Fe^{2+})), en el flavoproteoma de *T. cruzi*, se identificó una única putativa férrico reductasa, cuya función aún no ha sido demostrada (**Figura R-1A**); sin embargo, sí han sido caracterizadas en *T. brucei* (Mach et al. 2013) y en *Leishmania* sp. (Flannery et al. 2013). De cualquier modo, a pesar del bajo número de férrico reductasas, *T. cruzi* puede obtener Fe^{2+} a través de la incorporación de hemo mediante transportadores específicos (Merli et al. 2016) y, también, por endocitosis de transferrina (proteína transportadora de Fe^{2+} en mamíferos (Batista et al. 2015)). De esta manera, *T. cruzi* puede obtener Fe^{2+} desde su hospedador a través de varias estrategias, no dependiendo únicamente de las flavoenzimas férrico reductasa.

Todos los ejemplos mencionados resaltan la esencialidad de las flavinas en el metabolismo de *T. cruzi* -y extensivamente de los tripanosomátidos- y en su estilo de vida parasitario. Interesantemente, algunas de estas flavoenzimas están ausentes o son sustancialmente diferentes a las de humanos, por lo que podrían ser explotadas como potenciales blancos tripanocidas.

Obtención de vitaminas del complejo B en *T. cruzi* y tripanosomátidos relacionados

Los primeros estudios que demostraron la esencialidad de las vitaminas del complejo B para los tripanosomátidos se remontan a la década del 50, basados en la formulación de medios de cultivos definidos para el cultivo de los parásitos *in vitro* (Klein et al. 2013). Recién en los últimos años se estudiaron, en mayor profundidad, la capacidad de síntesis y/o de transporte de las vitaminas del complejo B en estos organismos:

- Analizando los genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y varias especies de *Leishmania*, se observó que estos patógenos carecen de la gran mayoría de las enzimas canónicas involucradas en la biosíntesis de vitaminas B (Klein et al. 2013).
- En los genomas de los tripanosomátidos de los géneros *Strigomonas* y *Angomonas* (que llevan bacterias endosimbiontes en sus citoplasma) tampoco se encontraron las enzimas

responsables de la biosíntesis de las vitaminas del complejo B, dependiendo de los aportes nutricionales de sus endosimbiontes bacterianos o de su incorporación desde el medio (Klein et al. 2013).

- Al mismo tiempo, *T. brucei* sería capaz de sintetizar **tiamina** (vitamina B1) y **piridoxal** (vitamina B6) *de novo*, ya que proliferaron en medios de cultivo sin estas vitaminas y son resistentes a los análogos tóxicos. Sin embargo, se desconocen las enzimas responsables de la síntesis, sugiriendo mecanismos alternativos a los conocidos (Stoffel et al. 2006). Además, los parásitos no incorporaron ninguna de estas vitaminas (Stoffel et al. 2006).

- Se identificaron 14 transportadores para **ácido fólico** (vitamina B9) en *Leishmania* spp., mientras que en *T. brucei*, se conocieron al menos 8. Estos transportadores pertenecen a la familia FBT (*Folate Biopterin Transporter*) (Dean et al. 2014; Dewar et al. 2016).

Estos estudios muestran que los tripanosomátidos desarrollaron diferentes estrategias para la obtención las vitaminas del complejo B.

Obtención de flavinas en *T. cruzi* y tripanosomátidos relacionados

Hasta el momento, los únicos resultados experimentales sobre los mecanismos de obtención de flavinas en *T. cruzi* y parásitos relacionados son los obtenidos en el marco de este trabajo. No contando con información bibliográfica previa, las primeras evidencias de la presencia de flavinas en *T. cruzi* consistieron en la detección de las 3 flavinas en extractos purificados de *T. cruzi*, estimándose una concentración intracelular de $0,25 \pm 0,17$, $0,35 \pm 0,15$ y $0,45 \pm 0,11$ fmoles/ 10^6 parásitos para riboflavina, FMN y FAD, respectivamente (**Figura R-1C**); aunque ese ensayo no abordaba los posibles mecanismos de obtención.

En este sentido, por un lado: estudios *in silico* determinaron que *T. cruzi* tendría la capacidad de sintetizar FMN y FAD, pues se identificaron genes codificando putativas riboflavina quinasa (TcCLB.510741.80) y FAD sintetasa (TcCLB.508241.60) (Klein et al. 2013) en su genoma; aunque sus actividades no fueron confirmadas. Por otro lado, *T. cruzi* y todos los tripanosomátidos relacionados carecen de los genes que codifican las enzimas biosintéticas de riboflavina (**Figura I-12**). Esto sería motivo de una auxotrofía, común a los tripanosomátidos (Klein et al. 2013). Entonces, y como se postuló en este trabajo, los tripanosomátidos dependerían de la

incorporación de riboflavina extracelular mediante transportadores específicos, permitiendo sostener su metabolismo basado en flavoproteínas, y por ende, su desarrollo.

Transporte de riboflavina en *T. cruzi* y tripanosomátidos relacionados

Nuestras primeras evidencias mostraron que los epimastigotes de *T. cruzi*, tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, promastigotes procíclicos de *L. mexicana*, coanomastigotes de *C. fasciculata* y promastigotes de *Phytomonas* Jma incorporaron riboflavina marcada radioactivamente con una cinética michaeliana, es decir mediada por transportador (**Figura R-13** y **Figura R-14**). En todos estos tripanosomátidos, el transporte presentó gran afinidad por riboflavina, con K_m s aparentes en el orden sub-micromolar (**Figura R-14**).

La existencia de transportadores de alta afinidad es una característica frecuente en tripanosomátidos. Entre los numerosos ejemplos se encuentran: **i.** los transportadores de folato de varias especies de *Leishmania* (por ejemplo, *L. tarentolae* mostró una $K_m = 0,26 \mu M$ para folato) (Richard et al. 2002); **ii.** el transporte de adenosina en *T. brucei* con una $K_m = 0,59 \mu M$ (Carter & Fairlamb 1993); **iii.** un transportador de putrescina en *T. cruzi* con una $K_m = 0,16 \mu M$ (Hasne et al. 2010; Carrillo et al. 2006); y **iv.** el transporte de adenosina en *C. fasciculata* con una $K_m = 0,81 \mu M$ (Liu et al. 2005). Para el caso de *Phytomonas* spp., existen escasos estudios acerca del transporte de nutrientes. Recientemente, en *Phytomonas serpens* (aislado del tomate) se identificaron 2 transportadores de alta afinidad de fosfato inorgánico con valores de K_m de 2,79 y 7,15 μM (Vieira-Bernardo et al. 2017).

Respecto de las posibles fuentes de flavinas, los tripanosomátidos ensayados en este trabajo se corresponden con el estadio replicativo en insectos, con excepción de *Phytomonas* Jma, que fue aislado del látex de *Jatropha macrantha* (Euphorbiaceae). Sin embargo, como se explicó anteriormente, *Phytomonas* spp. también infectan insectos (H. Lopes 2010). En los hospedadores invertebrados, la riboflavina es un nutriente escaso debido a varios factores:

- Carecen de una ruta biosintética canónica por lo que serían incapaces de sintetizarla *de novo*, tal como sucede en *Rhodnius prolixus* (vector de *T. cruzi*) (Mesquita et al. 2015).

- Tienen una dieta muy limitada. En este sentido, los invertebrados *Triatominae* (vectores de *T. cruzi*), moscas Tsé-Tsé del género *Glossina* (vector de *T. brucei*) y mosquitos del género *Phlebotomus*, *Psychodopygus* o *Lutzomyia* (vectores de *Leishmania* spp.) son insectos hematófagos (Atwood et al. 2005; Langousis & Hill 2014; Podinovskaia & Descoteaux 2015), mientras que la alimentación del mosquito *Culex* spp. (vector de *C. fasciculata*) alterna entre columnas de agua y néctar (Alcolea et al. 2014); y finalmente, *Phytomonas* spp. son transmitidos por insectos fitófagos que se alimentan de los fluidos de plantas enriquecidos en carbohidratos (Jaskowska et al. 2015).

- La flora de cada hospedador aportaría las cantidades necesarias de riboflavina para satisfacer sus requerimientos. Varios ensayos sustentan esta idea. Algunos autores mostraron que insectos aposimbióticos (tratados con antibióticos para eliminar la flora) de *Triatoma infestans* tuvieron un pobre desarrollo, y se revirtió con la administración de vitaminas del complejo B en su alimentación (Eichler & Schaub 1998). Además, en el genoma de una bacteria simbiote (*Rhodococcus rhodnii*) de *R. prolixus* se encontraron los genes responsables de la síntesis de riboflavina (Pachebat et al. 2013).

- Al mismo tiempo, en el vector *Glossina* existen 2 γ -proteobacterias necesarias para su supervivencia: *Wigglesworthia glossinidia* y *Sodalis glossinidius*. La primera de ellas sintetiza vitamina B1 (tiamina) *de novo*, mientras que *S. glossinidius* y el hospedador invertebrado carecen de esta ruta, y la obtienen a través de los aportes provenientes de *W. glossinidia* (Snyder et al. 2010).

Estas evidencias ponen de manifiesto los escasos niveles de vitaminas del complejo B, particularmente de riboflavina, en el hospedador insecto, por lo que en parásitos auxótrofos se hace imprescindible la expresión de transportadores de alta afinidad.

Más aún, el hospedador vertebrado tampoco sintetiza riboflavina *de novo*, y la obtiene de la dieta y de su microbiota. Por lo tanto, la disponibilidad de flavinas en este hospedador también sería limitante. En plasma se estimó una concentración de 7,6 nM, 15,5 nM y 51,4 nM de riboflavina, FMN y FAD, respectivamente (Hamilton et al. 2009). En cambio, la concentración de flavinas en diferentes líneas celulares fue de 2,5 nM de FMN y 1,7 nM para FAD, mientras que no se

detectaron cantidades apreciables de riboflavina (Pedrolli et al. 2013). Entonces, las formas sanguíneas de *T. cruzi* y *T. brucei*, y los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y *Leishmania* spp. (habitando en citoplasma o en vacuolas parasitóforas, respectivamente) tendrían que expresar transportadores de riboflavina de alta afinidad para explotar la baja disponibilidad de este hospedador.

En el otro extremo se encuentra el fitoparásito *Phytomonas* spp. Las plantas sintetizan riboflavina *de novo*, por lo que los parásitos residen en un ambiente con altos niveles de flavinas. Por ejemplo, el tomate (susceptible a ser infectado por *Phytomonas serpens*) tiene una concentración de riboflavina estimada de 774,6 nM (Hanif et al. 2006). De hecho, el parásito *Phytomonas* Jma utilizado en este trabajo deriva de la planta *J. macrantha*, y tuvo la menor velocidad máxima (**Figura R-14E**). Probablemente, debido al estar en un ambiente rico en flavinas, no requiera de un transporte de gran capacidad.

Por lo tanto, la expresión de transportadores de riboflavina de alta afinidad genera una gran eficiencia en la competencia por los metabolitos contra el hospedador y de varios de sus simbiontes, obteniendo una gran ventaja en la incorporación de los mismos para sobrevivir en este ambiente (Landfear 2011).

Comparación con transportadores de riboflavina previamente identificados

Entre las características clásicas consideradas para validar un potencial blanco terapéutico, se encuentran la esencialidad y la especificidad.

Puesto que el transporte de riboflavina, y las moléculas involucradas, parecen ser esenciales para los tripanosomátidos, resulta interesante comparar el transporte de riboflavina en tripanosomátidos (y sus propiedades) con los otros transportadores de riboflavina identificados hasta la fecha, particularmente con los transportadores RFVT/SLC52A de mamíferos, para encontrar diferencias a distintos niveles, contribuyendo a la condición de especificidad para postularlo como potencial blanco terapéutico contra las tripanosomiasis.

Afinidad de los transportadores de riboflavina

Como se explicó anteriormente, el parámetro K_m se refiere a la concentración de sustrato en la que la enzima/transportador actúa a la mitad de la velocidad máxima. El valor de K_m da indicios acerca de la afinidad de una enzima o transportador por un sustrato.

En nuestro caso, el transporte de riboflavina en tripanosomátidos mostró K_m s aparentes entre 0,07 – 0,39 μM (**Figura R-14**). Analizando la bibliografía, existe un amplio rango de afinidades asociadas al transporte de la vitamina. El transportador RibU/YpaA de *Bacillus subtilis* mostró un valor de $K_{m \text{ RibU}} = 0,005 - 0,02 \mu\text{M}$, siendo la de mayor afinidad (Cecchini et al. 1979); mientras que en el otro extremo, se encuentran los transportadores de hongos y levaduras como el transportador Mch5p de *Saccharomyces cerevisiae* (con $K_{m \text{ Mch5p}} = 17 \mu\text{M}$) (Reihl & Stolz 2005), y el transportador aún no identificado a nivel molecular de *Ashbya gossypii* (con K_m aparente = $40 \pm 12 \mu\text{M}$) (Forster et al. 2001). Los valores de K_m s aparentes registrados en tripanosomátidos estuvieron dentro del rango de K_m s correspondientes a transportadores de riboflavina de otros organismos. Más aún, dado que la K_m aparente de tripanosomátidos está en el orden sub-micromolar, serían de los más afines por dicha vitamina.

Por otra parte, los transportadores de riboflavina de humanos de la familia RFVT/SLC52A mostraron $K_{m \text{ RFVT/SLC52A}} = 0,33 - 1,38 \mu\text{M}$, valores determinados gracias a su sobre-expresión en células embrionarias de riñón humana (línea HEK293) (Yao et al. 2010). Estos valores coinciden con aquellos correspondientes a varios tipos celulares humanos no-transfectados. Entre estos tipos celulares se destacan a las células mononucleares de sangre periférica, las células del carcinoma hepático (línea HepG), células epiteliales de la mucosa del colon (línea NCM460), células de túbulo proximal derivada del riñón normal (línea HK-2) que todas ellas mostraron valores de K_m aparente entre 0,14 μM y 0,95 μM (Chandira & Yanagawa 1998; Said et al. 1998; Said et al. 2000; Zempleni & Mock 2000).

Sin embargo, en varias células derivadas de humanos se registraron valores mucho más bajos que los anteriores. Entre ellos, se encontraron las células de coriocarcinoma humano (línea BeWo, modelo de placenta), células de retinoblastoma humano (línea Y-79, modelo de retina neural) y células epiteliales de la retina humana (línea ARPE-19), células de cáncer colorrectal (línea T84) con valores de K_m aparentes entre 0,0013 μM y 0,08 μM (Huang & Swaan 2001;

Kansara et al. 2005; Said et al. 2005; Yoshimatsu et al. 2014). En todos estos tipos celulares se detectaron los ARNm de los transportadores de la familia RFVT/SLC52A, confirmando su expresión y su posterior participación en la incorporación de riboflavina en estos modelos (Yao et al. 2010; Kubo et al. 2016). Por lo tanto las K_m s aparentes de las células de humano varían según el tipo celular, dependiendo de la contribución de cada uno de ellos a la incorporación de riboflavina, los mecanismos regulatorios, la distribución en la célula, o la existencia de otro mecanismo de transporte, etc.

Por lo tanto, no existirían diferencias a nivel de afinidad entre el transporte de riboflavina en tripanosomátidos y el de la familia RFVT/SLC52A de humanos, aunque algunos tipos celulares humanos mostraron una mayor afinidad que los anteriores.

Especificidad de los transportadores de riboflavina

Varios transportadores de riboflavina identificados han mostrado la capacidad de incorporar a las 3 flavinas (riboflavina, FMN y FAD), aunque con distintas afinidades. Entre ellos, se destacan RibU/YpaA de *B. subtilis*, RibM/PnuX de *Streptomyces davawensis*, RibN de *Rhizobium leguminosarum* y en el/los transportadores no identificado/s de *A. gossypii* (Vogl et al. 2007; Hemberger et al. 2011; García Angulo et al. 2013; Forster et al. 2001). En cambio otros transportadores son específicos de riboflavina, como RibM de *Corynebacterium glutamicum*, Mch5p de *Saccharomyces cerevisiae*, RfuA de *Treponema pallidum* y RFVT3/SLC52A3 de mamíferos (Vogl et al. 2007; Reihl & Stolz 2005; Deka et al. 2013; Yoshimatsu et al. 2014). Esto indica que la especificidad del transporte de riboflavina varía a nivel interespecie, aún cuando estos transportadores pertenecen a la misma familia (como RibM/PnuX).

En el caso de epimastigotes de *T. cruzi*, las flavinas FMN o FAD inhibieron la incorporación de ^3H -riboflavina (**Figura R-15A**), indicando que este parásito también puede transportar a las tres flavinas, aunque con distinta afinidad, tal como se describió para otros transportadores de flavinas (Vogl et al. 2007; Hemberger et al. 2011; García Angulo et al. 2013; Forster et al. 2001). Analizando el porcentaje de inhibición del transporte de ^3H -riboflavina, se observó que FMN tuvo un mayor efecto que FAD. Estos resultados sugieren que la afinidad del transportador podría estar relacionada al aumento del número de grupos sobre el esqueleto de la riboflavina (grupo fosfato en FMN y grupo adenosina monofosfato para FAD) (**Figura I-12**). Varios trabajos apoyan

a estos resultados, por ejemplo aquellos que mostraron que RibU/YpaA de *B. subtilis* transporta eficazmente aquellos compuestos más parecidos a la riboflavina (como FMN) que aquellos más disímiles (Vogl et al. 2007).

A su vez, nuestros ensayos muestran que el transportador de flavinas en epimastigotes de *T. cruzi* es altamente específico, pues la acriflavina (compuesto altamente similar al anillo de las flavinas) no logró inhibir la incorporación de la vitamina marcada radioactivamente (**Figura R-15C**). Esto también se observó con el transportador RibU/YpaA de *B. subtilis* (Vogl et al. 2007); pero la acriflavina inhibió la actividad del transportador Mch5p de *S. cerevisiae* (Reihl & Stolz 2005). Nuestros ensayos preliminares, además, mostraron que la acriflavina resultó tóxica para *T. cruzi*, coincidiendo con lo reportado en la literatura (Manchester et al. 2013); sin embargo, estos resultados sugieren la existencia de otros mecanismos, independientemente del transporte de riboflavina, que facilitan el ingreso de la acriflavina.

Toda esta evidencia indica que los transportadores de riboflavina tienen distintos perfiles de especificidades a compuestos no relacionados con las flavinas, siendo el de *T. cruzi* uno de los más específicos para flavinas.

Inhibición de transportadores de riboflavina

Actualmente existen muy pocos estudios acerca del efecto de análogos de riboflavina sobre los transportadores de flavinas. Uno de los trabajos publicados mostró que los transportadores RibU/YpaA de *B. subtilis* y RibM/PnuX de *C. glutamicum* son sensibles únicamente a roseoflavina (en una relación competidor/³H-riboflavina de 10:1), resultando insensibles a lumiflavina o lumicromo (Vogl et al. 2007). En cambio, el transportador Mch5p de *S. cerevisiae* fue altamente sensible a lumicromo (único análogo ensayado como inhibidor), en una relación 6:1 (Reihl & Stolz 2005).

Los primeros estudios del transporte de riboflavina en células de mamíferos, en la década del 80, demostraron que los análogos lumiflavina y lumicromo fueron incorporados a través de transportadores de riboflavina (Spector 1981). Los estudios posteriores de los transportadores RFVT/SLC52A en estas células fueron realizados en una alta relación competidor/³H-riboflavina y, en todos estos casos, lumiflavina y lumicromo inhibieron el transporte de riboflavina (Said et al.

1998; Chandira & Yanagawa 1998; Zemleni & Mock 2000; Said et al. 2000; Huang & Swaan 2001; Kansara et al. 2005; Said et al. 2005; Yao et al. 2010). Más aún, el porcentaje de inhibición del transporte de riboflavina fue diferente en cada tipo celular, siendo algunas células más sensibles que otras. Solamente en un trabajo se utilizaron relaciones similares a las de esta tesis, donde se registró que el transporte de riboflavina en células ARPE-19 se inhibió en un 46 % y 76 % con 12,5 y 125 veces de lumiflavina; mientras que con lumicromo, el efecto solo se observó a 125 veces, disminuyendo el transporte en un 30 % (Said et al. 2005).

Si bien no se realizaron estudios acerca del efecto de roseoflavina sobre el transporte de riboflavina en células humanas, existen evidencias indirectas que avalan la incorporación del análogo en hepatocitos y en células derivadas de adenocarcinoma pulmonar, probablemente, a través de transportadores de riboflavina (Pedrolli et al. 2013). Nuestros resultados obtenidos en miocardiocitos de rata también concuerdan con esta idea (**Figura R-40E**).

Estos reportes evidencian que la incorporación de riboflavina en células derivadas de humanos, y sus transportadores RFVT/SLC52A, son sensibles a los análogos lumiflavina, lumicromo y, probablemente, a roseoflavina.

Toda esta evidencia sugiere que la sensibilidad a los análogos de riboflavina varía entre las diferentes familias de transportadores de vitamina (desde *B. subtilis*, levaduras hasta eucariotas superiores) y, particularmente en humanos, también entre los distintos tipos celulares. En el caso de epimastigotes de *T. cruzi*, el transporte de riboflavina disminuyó en presencia de cualquiera de estos análogos (**Figura R-15C**). De hecho, roseoflavina fue el inhibidor más efectivo en *T. cruzi*, tal como sucede en *B. subtilis*, y en concordancia con la gran similitud del análogo con la riboflavina; mientras que con lumiflavina o lumicromo, el efecto fue similar al observado en la línea celular humana ARPE-19.

Esencialidad del transporte de riboflavina en el ciclo de vida de *T. cruzi*

Nuestros resultados muestran que el transporte de riboflavina cumple un rol importante en el ciclo de vida de los tripanosomátidos, principalmente en *T. cruzi*.

Rol del transporte de riboflavina en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y parásitos relacionados

Respecto de la riboflavina en el medio, nuestros resultados mostraron que la disponibilidad afecta el crecimiento de los tripanosomátidos (**Figura R-2, Figura R-4A - Figura R-6A**). Esta estimulación en la proliferación estuvo asociada con la capacidad de incorporar riboflavina de cada tripanosomátido. La alta actividad de transporte registrada en *C. fasciculata*, y las intermedias de *T. cruzi* y *T. brucei* coinciden con el gran efecto estimulante de la riboflavina sobre la proliferación de estos parásitos (**Figura R-2, Figura R-4A y Figura R-6A**). En el otro extremo, el crecimiento de *Phytomonas* Jma fue levemente estimulado por riboflavina (**Figura R-7A**), concordante con su baja actividad de transporte.

Sin embargo, una excepción a esta idea es el caso de *L. mexicana*, ya que si bien se vio una actividad intermedia del transporte, tuvo un leve aumento en su proliferación (**Figura R-5A**). Probablemente, esta baja estimulación esté relacionada con la alta afinidad del transporte de riboflavina (K_m aparente = $0,07 \pm 0,03 \mu M$), por lo que alcanzó la saturación a concentraciones bajas de la vitamina (**Figura R-14C**).

A su vez, se observó que cada tripanosomátido tuvo preferencias por algunas de las flavinas, de manera tal que algunos parásitos (como *T. cruzi*, *T. brucei* y *C. fasciculata*) crecen más con riboflavina, mientras que *L. mexicana* y *Phytomonas* Jma, tuvieron una mayor proliferación con FMN (**Figura R-2 - Figura R-7**).

Sin embargo, las flavinas tuvieron un efecto dual sobre la proliferación de estos parásitos, ya que en algún rango de concentraciones fueron estimulantes, mientras que en otras fueron inhibitorias. La estimulación puede ser debida a la incorporación directa de estas flavinas (**Figura R-15A**); también podría ser debida a la degradación de estas flavinas a riboflavina mediante las enzimas FAD pirofosfatasa (E.C. 3.1.6.18) y FMN fosfatasa extracelulares (E.C. 3.1.3.2). Actividades extracelulares de estas enzimas han sido observadas en otros organismos (Higa et al. 2012; Deka et al. 2015), pero en tripanosomátidos aún se desconoce su existencia. Este efecto deletéreo a partir de ciertas concentraciones fue inesperado, ya que en la mayoría de los estudios acerca de los transportadores de riboflavina en otros organismos, no se observó una disminución del crecimiento (Reihl & Stolz 2005; Burgess et al. 2006; Vogl et al. 2007; Hemberger et al. 2011;

García Angulo et al. 2013). Sin embargo, en tripanosomátidos es muy común que la proliferación dependa de las concentraciones disponibles de nutrientes, provocando la disminución de la proliferación tanto por defecto como por exceso. De hecho, este comportamiento fue postulado como posible terapia tripanocida, ya que el exceso de nutrientes puede inhibir la función de enzimas esenciales de *T. cruzi* y *T. brucei* (Unciti-Broceta et al. 2013; Soares et al. 2012).

Finalmente, en algunos parásitos (como *T. brucei*, *C. fasciculata* y *L. mexicana*) sólo con FMN y FAD se registró una re-estimulación en su proliferación. Una posible explicación es la existencia de exportadores que se activen ante el exceso de estas flavinas y las eliminen. En este sentido, varias bacterias expresan exportadores específicos de flavinas (McAnulty & Wood 2014; Kotloski & Gralnick 2013). También en humanos se identificó un exportador de riboflavina llamado Bcrp1, perteneciente a la familia de transportadores de drogas de tipo ABC (*ATP binding cassette –ABC-family of transmembrane drug transporters*) (van Herwaarden et al. 2007), el cual media la exportación de riboflavina o xenobióticos con consumo de ATP. Inclusive, en bacterias sobreproductores de riboflavina eliminan el exceso de vitamina a través de transportadores de riboflavina catalizando la reacción inversa (Hemberger et al. 2011). Según la base de datos de Tritryps, en el genoma de los tripanosomátidos se encontraron varios posibles transportadores de tipo ABC. La mayoría de ellos tienen asignadas funciones potenciales – no relativas a la exportación de riboflavina-, sin embargo se desconoce aún la función de algunos, que podrían llegar a cumplir dicha función. Entonces estos exportadores de tipo ABC o el transportador de riboflavina (dependiendo de sus características) podrían eliminar el excedente de flavinas biológicamente activas (FMN y FAD), de manera tal que los parásitos recuperarían su crecimiento. Esta hipótesis aún queda por estudiarse para profundizar los mecanismos que mantienen la homeostasis de flavinas en los tripanosomátidos.

Respecto del efecto de los análogos de riboflavina, las primeras evidencias mostraron que la proliferación de la mayoría de los tripanosomátidos ensayados disminuyó en su presencia (**Figura R-8 - Figura R-12**). Este efecto parece ser consecuencia de la inhibición directa sobre el transporte de riboflavina de los parásitos, tal como se registró en epimastigotes de *T. cruzi* (**Figura R-15B**). Además, en varios organismos se observó que la roseoflavina también fue sustrato de estos transportadores (Hemberger et al. 2011) y, una vez en el citoplasma, fue convertida a los análogos

roseoflavina mononucleótido (RoFMN) y roseoflavina adenin dinucleótido (RoFAD) (Langer et al. 2013). Estos derivados de análogos pueden asociarse a las flavoproteínas y, al tener propiedades físico-química diferentes al de las flavinas naturales, perjudican su funcionalidad (Langer et al. 2013). Algo parecido puede suceder en los tripanosomátidos ensayados, ya que la roseoflavina fue altamente tóxica para todos estos parásitos (**Figura R-8 - Figura R-12**). De hecho, la flavoproteína prolina deshidrogenasa cumple un rol importante en los epimastigotes de *T. cruzi*, ya que permite la utilización de la prolina como fuente de energía y carbono. Por lo tanto, la inhibición de esta enzima por los derivados de análogos de riboflavina llevaría a un importante defecto en el crecimiento de los parásitos (Paes et al. 2013).

Paralelamente, en la literatura se reportó que los análogos lumiflavina y lumicromo también ingresan en *T. cruzi* y, una vez en el núcleo, se asocian al ADN del parásito afectando su integridad (Wainwright & Baptista 2011). Como nuestros ensayos mostraron que ambos análogos fueron capaces de inhibir el transporte de riboflavina de *T. cruzi* (**Figura R-15B**), probablemente, estos compuestos ingresaron a través de este transporte, afectando la viabilidad de *T. cruzi*.

Por otra parte, el efecto de los análogos lumiflavina y lumicromo fue diferente en cada tripanosomátido (**Figura R-8 - Figura R-12**), ya que algunos mostraron defectos en su crecimiento en la primer semana de incubación (*C. fasciculata*), otros en la segunda (*T. brucei* y *L. mexicana*), otros en la tercera (*T. cruzi*), mientras *Phytomonas* Jma no fue sensible a estos análogos. Estos resultados coinciden con las actividades de transporte de riboflavina de cada uno de ellos. *C. fasciculata* tuvo la mayor actividad de incorporación de riboflavina (**Figura R-14D**), por lo que tendría más capacidad de incorporar estos análogos. En cambio, *T. brucei* y *L. mexicana* tuvieron actividades intermedias (**Figura R-14B y C**), retardando el efecto de los análogos respecto al parásito anterior. Los epimastigotes de *T. cruzi* también tuvieron una actividad intermedia (**Figura R-14A**), y si bien el efecto se hizo notorio en la primera semana para lumiflavina, recién en la tercera semana se registraron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de lumicromo. Finalmente, *Phytomonas* Jma tuvo la actividad de transporte más baja (**Figura R-14E**), y no se registró efecto alguno de los análogos sobre su crecimiento.

Entonces las propiedades de los transportadores de riboflavina de estos parásitos determinaría la sensibilidad a los análogos tóxicos de flavinas.

Rol del transporte de riboflavina en la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*

Tal como se mencionó anteriormente, la metaciclogénesis es un proceso esencial en el ciclo de vida de *T. cruzi*, durante el cual se producen importantes cambios a nivel bioquímico, molecular, celular y morfológico.

Nuestros ensayos mostraron, por un lado, que las flavinas pueden estimular la metaciclogénesis; y por otro lado, que los análogos – ya sea por la interferencia con el transporte de riboflavina o por la intoxicación causada *per sé*- disminuyeron la diferenciación (**Figura R-36B y Figura R-38B**). Uno de los principales eventos moleculares que ocurren durante la diferenciación es el aumento en la expresión de algunos componentes del sistema anti-oxidante (Parodi-Talice et al. 2007; Piacenza et al. 2009), como las triparedoxinas peroxidasas, cuya regeneración depende de la flavoenzima tripanotiona reductasa NADPH-dependiente (TR) y de la tripanotiona sintasa (Machado-Silva et al. 2016; Piacenza et al. 2009). Si bien se ha visto que los niveles proteicos de TR no cambian durante la metaciclización de *T. cruzi* (Piacenza et al. 2009), en otro trabajo realizado en *Leishmania amazonensis* se observó que la LaTR es más activa en estadios infectivos (Castro-Pinto et al. 2004). Reuniendo estas evidencias, es posible que una mayor disponibilidad de flavinas durante la diferenciación de *T. cruzi* contribuya a una mayor actividad enzimática – aunque no de proteína - de TcTR; y esto favorecería la regeneración de triparedoxinas peroxidasas, redundando en el aumento de tripomastigotes metacíclicos observado (**Figura R-36B**). Por otra parte, los análogos de riboflavina podrían inhibir la incorporación de flavinas, inhibir las flavoproteínas asociadas al sistema antioxidante o afectar la integridad de las biomoléculas, tal como se discutió para los epimastigotes (**Figura R-38B**).

Otra ruta que podría estar involucrada en el efecto observado, es la flavoenzima lipoamida deshidrogenasa, cuya expresión también aumenta durante la metaciclogénesis y cuya función múltiple incluye la participación en la defensa antioxidante mitocondrial (Jortzik et al. 2014). Entonces, el aumento en los niveles de lipoamida deshidrogenasa en *T. cruzi* acompañada de una mayor disponibilidad de flavinas durante la diferenciación, podría ser un motivo para el aumento en el número de parásitos diferenciados (**Figura R-36B**).

Por otra parte, el hambreado de los parásitos es considerado como un importante estimulador de la metaciclologénesis (Figueiredo et al. 2000). En nuestros ensayos observamos que los niveles de diferenciación dependieron de la disponibilidad de flavinas en el medio de cultivo de los epimastigotes antes de la inducción (**Figura R-36B** y **Figura R-37B**), evidenciando que el ayuno de flavinas aumentó la capacidad de diferenciación.

Más aún, la estimulación de la metaciclologénesis por flavinas solamente se observó cuando los epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron en medios con baja disponibilidad de riboflavina (SDM20 vs. SDM300). Esto indica que bajo las condiciones de ayuno, los parásitos fueron más sensibles a las flavinas extracelulares al momento de estimular la diferenciación. Este efecto podría estar asociado a un mayor transporte de riboflavina, ya sea por el número o por la actividad de los transportadores activos durante la metaciclización. Actualmente, se han descrito varios ejemplos de aumentos en los niveles de expresión de diferentes transportadores de *T. cruzi* al inicio de la diferenciación; entre ellos, el transportador de arginina y el putativo transportador de folato (de Godoy et al. 2012; Henriques et al. 2015).

Por lo tanto, la presencia de flavinas antes y durante la diferenciación es un importante modulador de la capacidad metaciclologénica.

Rol del transporte de riboflavina en la viabilidad de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*

A diferencia de lo que se observó en epimastigotes de *T. cruzi*, los tripomastigotes sanguíneos tuvieron sensibilidades diferentes a los análogos de riboflavina (**Figura R-39**), cuya sobrevivencia se vio altamente comprometida únicamente en presencia de lumiflavina.

Existen varios reportes en los que se mostró que la actividad de transporte en TCTs de *T. cruzi* es, generalmente, inferior a la de epimastigotes (Dick et al. 2013; Cupello et al. 2011; Henriques et al. 2015; Merli et al. 2016; Silber et al. 2006; Barisón et al. 2016). Estudios recientes indicaron que las formas sanguíneas tienen una disminución en los niveles de expresión de varios transportadores (Li et al. 2016). Sin embargo, existen actividades que se mantienen entre los distintos estadios, como la incorporación de glucosa y aspartato (Silber et al. 2009; Canepa et al. 2005). Por otro lado, en el parásito *T. brucei* también se observó que la capacidad de incorporar uracilo o hipoxantina fue mayor en la forma procíclicos que en las sanguíneas, pero ambas formas

tuvieron sensibilidades diferentes a varios inhibidores (Ali et al. 2013; de Koning & Jarvis 1997b; de Koning & Jarvis 1997a). Entonces, probablemente en *T. cruzi* existan diferentes transportadores de riboflavina -o mecanismos alternativos de regulación-, estado dependientes, con distintas propiedades bioquímicas y, en consecuencia, sensibilidades diferentes a los análogos.

Otra posibilidad respecto del efecto de lumiflavina sobre la supervivencia de los TCTs es que sea por afectar otros mecanismos no relacionados con el transporte de riboflavina, pues no se registró efecto con el análogo roseoflavina (compuesto más similar a la riboflavina que lumiflavina) (**Figura R-39**). El ingreso de drogas tripanocidas por distintas rutas también fue reportada en *T. brucei*, como el caso de la pentamidina que ingresa a través de transportadores de nucleósidos, de acuaporinas y por otra vía aún desconocida (Munday et al. 2015).

Sin embargo, independientemente de los mecanismos de acción por los que desarrolla su toxicidad, la lumiflavina fue capaz de perjudicar la sobrevivencia de los TCTs de *T. cruzi*.

Rol del transporte de riboflavina en la infectividad de tripomastigotes TCTs de *T. cruzi*

Tal como se explicó anteriormente, la infectividad es un complejo proceso en el que intervienen varios factores dependiendo de la cepa de *T. cruzi* y del tipo de célula hospedadora (Maeda et al. 2012; Romano et al. 2012). Al momento de la infección, los tripomastigotes sanguíneos se enfrentan a las defensas oxidativas de la célula hospedadora (Machado-Silva et al. 2016; Goes et al. 2016; Gupta et al. 2009), por lo que la capacidad antioxidante – particularmente aquella dependiente de flavina- ha mostrado ser un factor importante en el éxito de la infección de las formas sanguíneas de *T. cruzi* (Zago et al. 2016). En ese mismo trabajo se observó que la infectividad de estas formas también estuvo asociada a una incrementada motilidad, donde varias proteínas asociadas al remodelamiento del citoesqueleto estaban aumentadas (Zago et al. 2016). Interesantemente, en el análisis del flavoproteoma de *T. cruzi* encontramos una flavoproteína cuya función putativa es la unión a actina (**Figura R-1A**).

Resumiendo las evidencias bibliográficas, las flavinas podrían cumplir un papel importante durante la infección, participando en el sistema antioxidante y/o en las modificaciones sobre el citoesqueleto y la motilidad; esto no descarta que otros procesos pudieran estar involucrados.

Sin embargo, contrariamente a lo esperado, en nuestros resultados no observamos cambios significativos en el porcentaje de cardiomiocitos infectados en presencia de análogos de riboflavina (**Figura R-40C**). La ausencia de significancia estadística podría deberse al número de repeticiones del ensayo (dos). Otro motivo que podría justificar la ausencia de inhibición de los análogos es que los tripomastigotes ingresan rápidamente a las células H9C2, sin que los análogos presentes en el medio de incubación – a las concentraciones del ensayo - lleguen a ejercer un efecto inhibitorio sobre los parásitos (**Figura R-39**). Esta hipótesis se sustenta en las observaciones de Li et al., que observaron que *T. cruzi* ingresaba a fibroblastos ya a partir de las 4 h de incubación (Li et al. 2016).

Entonces, estos eventos indicarían que los factores de virulencia asociados a flavinas no se vieron modificados, explicando la ausencia de inhibición sobre la capacidad infectiva. Sin embargo, aún faltan ensayos para confirmar la relevancia de las flavinas en la infección, y también de los transportadores de riboflavina.

Rol del transporte de riboflavina en la replicación intracelular de amastigotes de *T. cruzi*

Se ha visto que los amastigotes obtienen la mayoría de sus nutrientes desde la célula hospedadora (Li et al. 2016; Caradonna et al. 2013; Hasne et al. 2016) y que su metabolismo energético está basado en el consumo de ácido grasos a través de la β -oxidación (Li et al. 2016), en donde podría participar la flavoproteína transportadora de electrones deshidrogenasa, detectada en el potencial flavoproteoma de *T. cruzi* (**Figura R-1A**).

Tal como se explicó anteriormente, los análogos utilizados en esta tesis son capaces de ingresar al citoplasma de la célula hospedadora a través de los transportadores de riboflavina RFVT/SLC52A. Por lo tanto, las formas amastigotes también podrían incorporarlos, de manera similar a lo se observó en epimastigotes, siendo tóxicos para ambas formas (**Figura R-15B y Figura R-40D**).

Varias evidencias muestran que las flavinas son esenciales para el desarrollo de varios otros parásitos de humanos (como *Plasmodium falciparum* (Dutta 1991)) y de insectos (como *Wolbachia* sp. (Fallon et al. 2014)). Entonces, una vez que los análogos de riboflavina ingresan a la célula hospedadora y desplazan a la flavina que está accesible a los transportadores parasitarios, se interrumpiría el transporte / metabolismo asociado a flavinas en los patógenos

intracelulares. De esta manera, las vías relacionadas con flavinas resultarían una interesante estrategia para el desarrollo de terapias contra agentes infecciosos intracelulares.

Sin embargo, no se puede descartar que los análogos de riboflavina hayan afectado el crecimiento de los amastigotes mediante un efecto indirecto, a causa de cambios sobre la homeostasis de la célula hospedadora. Es sabido que los amastigotes de *T. cruzi* inducen cambios sobre la actividad de diversas rutas metabólicas en la célula hospedadora (Caradonna et al. 2013; Li et al. 2016). De hecho, estos cambios son esenciales para la proliferación de los amastigotes (Caradonna et al. 2013). Entonces, los análogos de riboflavina (principalmente roseoflavina y sus derivados RoFMN y RoFAD) (Pedrolli et al. 2013)) podrían inhibir alguna vía de la célula hospedadora necesaria para el parásito, llevando a un descenso en la viabilidad de la célula y, en última instancia, en la proliferación de los amastigotes (**Figura R-40D** y **Figura R-40E**).

Por otra parte, nuestros ensayos muestran un resultado inesperado acerca de la viabilidad de la célula hospedadora frente a lumiflavina (**Figura R-40E**). Se ha visto en células de mamífero que la lumiflavina, al inhibir el transporte de riboflavina, aumenta los niveles intracelulares de ROS y, en consecuencia, estimula la respuesta antioxidante para prevenir el daño celular (Lee et al. 2013). Como el ensayo basado en Alamar Blue® mide el ambiente reductor de la célula, es posible que en presencia de lumiflavina, aumente la cantidad de Alamar Blue reducido respecto del control (**Figura R-40E**). En cambio, si bien roseoflavina inhibe el transporte de riboflavina, sus derivados pueden asociarse a varias flavoenzimas celulares (Pedrolli et al. 2013), como las del sistema antioxidante, disminuyendo la producción del Alamar blue reducido. Finalmente, lumicromo tiene una baja actividad inhibitoria sobre el transporte de riboflavina en mamíferos (Said et al. 1998; Chandira & Yanagawa 1998; Said et al. 2000; Huang & Swaan 2001; Said et al. 2005; Kansara et al. 2005), por lo que con los niveles de riboflavina obtenidos no se producirían altos niveles de ROS y no afectarían la viabilidad de la célula hospedadora.

En resumen, estos análogos tienen una potencial actividad tripanocida pero nuestros resultados también indican efectos citotóxicos sobre el hospedador, por lo que se necesitan más estudios para la búsqueda de inhibidores específicos contra los parásitos.

Identificación de la familia RibJ como transportadores de riboflavina en tripanosomátidos

Actualmente, en bibliografía se describieron 12 transportadores de riboflavina distintos (**Figura R-20**). En este trabajo se sugirió la existencia de una sub-familia de transportadores RFVT/SLC52A específica de algas y oomycotas; pero más trascendentemente, se identificó a la familia RibJ exclusiva de tripanosomátidos (**Figura R-20**), gracias a la leve similitud e identidad con Mch5p de *S. cerevisiae* (**Figura R-16**). En un principio, el gen *TcRibJ* y Mch5p fueron anotados como transportadores de monocarboxilatos por la similitud con la familia MCT/SLC16 de mamíferos (Reihl & Stolz 2005), pero en este trabajo se mostró que la familia RibJ carece de los aminoácidos y motivos necesarios para el transporte de monocarboxilatos (**Figura R-22**). Por otra parte, recientemente se han identificado transportadores de monocarboxilatos en tripanosomátidos, los cuales pertenecen a una familia diferente al de humanos (Sanchez 2013), y al de la familia RibJ (**Figura R-21**).

La funcionalidad de 2 miembros representativos de la familia RibJ (*TcRibJ* de *T. cruzi* y *TbRibJ* de *T. brucei*) se corroboró por expresión heteróloga en bacterias *E. coli* mutantes $\Delta ribB$ (**Figura R-23 - Figura R-25**); y, en el caso de *TcRibJ*, por sobre-expresión homóloga en epimastigotes de *T. cruzi* (**Figura R-27 - Figura R-30**).

Efectos de la expresión de RibJ en *E. coli* $\Delta ribB$

Al analizar la complementación del crecimiento en *E. coli* expresando RibJ, se observó que estos transportadores tuvieron distintas preferencias hacia las flavinas, ya que con riboflavina las bacterias crecieron en concentraciones menores que con FMN y FAD (**Figura R-33A-B**). Estos resultados coincidieron con los observados en los ensayos de transporte de ^3H -riboflavina en epimastigotes de *T. cruzi* (**Figura R-33A**), y con lo reportado para RibN (García Angulo et al. 2013). Por otra parte, con el transportador *LmiRibJ* de *L. mexicana* no se obtuvo una complementación. La proteína *LmiRibJ* presentó una baja similitud (49 %) en comparación con *TbRibJ* de *T. brucei* (**Tabla R-2**) y, además, un dominio citosólico extenso (**Figura R-16**). Por lo tanto, es posible que el sistema de bacterias utilizado no sea adecuado para el estudio de funcionalidad de *LmiRibJ*. La expresión de *TcRibJ* y *TbRibJ* otorgó una nueva función a las bacterias *E. coli* $\Delta ribB$ transformantes, ya que naturalmente no incorporan riboflavina (**Figura R-34**). Esta ganancia de

función también se observó en la expresión de RibN de *R. leguminosarum* en bacterias de *Brucellas abortus* sin transportadores de riboflavina endógenos (García Angulo et al. 2013).

Efectos de la sobre-expresión de TcRibJ en epimastigotes de *T. cruzi*

Para confirmar la función de TcRibJ en *T. cruzi*, se decidió analizar el efecto de la sobre-expresión de esta proteína en los epimastigotes. Como se mostró en la **Figura R-27**, luego de transfectar y seleccionar, los parásitos efectivamente sobre-expresaron este gen, con un nivel de ARNm de TcRibJ 2,5 veces mayor al registrado en el control. Sin embargo, la puesta a punto de los ensayos de transporte en la población sobre-expresando TcRibJ fue dificultosa. Reihl y colaboradores también tuvieron complicaciones al medir el transporte de riboflavina en levaduras sobre-expresando Mch5p; y para sortearlos utilizaron levaduras auxótrofas para riboflavina y las cultivaron en medio libre de riboflavina, reduciendo así los niveles intracelulares de flavinas, condición que resulta suficiente para satisfacer las demandas celulares y la viabilidad mientras que realza el transporte de riboflavina (Reihl & Stolz 2005).

Similarmente a lo observado por Reihl y colaboradores, nuestros resultados preliminares sugieren la existencia de mecanismos regulatorios dependientes de la disponibilidad de nutrientes que actuarían sobre el transporte de riboflavina de *T. cruzi*. Por ejemplo, parásitos creciendo en medio rico o incubados con altas concentraciones de riboflavina tuvieron una actividad reducida a tiempos largos (**Figura R-30**). Estos mecanismos regulatorios también fueron observados para varios transportadores de tripanosomátidos (Ortiz et al. 2010; González et al. 1992).

Más aún, se ha visto que las flavinas, directa o indirectamente, regulan negativamente la expresión génica en diferentes organismos (Pedrolli et al. 2013; Hino et al. 2012). Por lo tanto, resultó importante disminuir los niveles intracelulares de flavina en las poblaciones de *T. cruzi* *wild type* y TcRibJ, para evitar efectos regulatorios sobre la capacidad de transporte de estos parásitos.

Si bien *T. cruzi* es auxótrofo para riboflavina (Klein et al. 2013), los medios de cultivos utilizados en esta tesis (como el SDM20) tuvieron concentraciones basales de flavinas; los parásitos fueron hambreados por un período corto y los ensayos fueron realizados con baja riboflavina (100 nM). A pesar de ello, y de los altos niveles de ARNm, solo se registró un leve aumento en la velocidad de incorporación de ³H-riboflavina de la población TcRibJ (**Figura R-27** y **Figura 30**). Esto indica

que el hambreado, probablemente, no haya sido suficiente para disminuir los niveles intracelulares de flavinas en la población *TcRibJ*, ya que con la alta afinidad del transporte de riboflavina en estos parásitos (**Figura R-14** y **Figura R-30**) y con la sobre-expresión de *TcRibJ*, probablemente se haya favorecido la incorporación de las trazas de la vitamina.

Es por estas dificultades en el transporte de vitaminas del complejo B, que los trabajos de Reihl y colaboradores se basan mayormente en los ensayos de complementación de crecimiento. Estos ensayos permiten alcanzar conclusiones más claras que los experimentos de transporte, ya que facilita la detección de leves actividades de transporte sostenidas en el tiempo (Stolz & Vielreicher 2003). De hecho, el crecimiento de los parásitos sobre-expresando *TcRibJ* fue mucho más sensible a bajas concentraciones de flavina y de análogos que la población *wild type* (**Figura R-28** y **Figura R-29**).

Finalmente, si bien *TcRibJ* tuvo un efecto determinante en los epimastigotes, aún falta determinar la participación de este transportador en los otros procesos biológicos de *T. cruzi*, y en el resto de los tripanosomátidos. Por otra parte, y paralelamente, no se puede descartar la existencia de otros transportadores de riboflavina en tripanosomátidos. La existencia de varios transportadores para un mismo metabolito es característico de estos parásitos, que asegura la obtención de nutrientes en los distintos hospedadores y condiciones ambientales por los que atraviesa (Dean et al. 2014; Landfear 2011). La redundancia en el transporte de riboflavina se observó en la bacteria Gram -, *Ochrobactrum anthropi*, que expresa los transportadores RibN y RfnT (Gutiérrez-Preciado et al. 2015) (**Figura R-20**). Se ha postulado que estos transportadores tendrían una expresión diferencial en tanto no están regulados por los mismos elementos, por lo que la participación de cada uno de ellos para conquistar diversos nichos no sería redundante (Gutiérrez-Preciado et al. 2015).

Potencial mecanismo de transporte de *TcRibJ*

De los diversos transportadores de riboflavina, solo se postularon los mecanismos de acción de alguno de ellos. Entre ellos, los transportadores RibU/YpaA y RfuABCD están formados por 4 subunidades y utilizan ATP para la incorporación de la vitamina (Zhang et al. 2010; Burgess et al.

2006; Vogl et al. 2007; Karpowich et al. 2015; Deka et al. 2013). Un mecanismo similar se propuso para el transportador RibXY (Gutiérrez-Preciado et al. 2015).

Por otra parte, también se postuló que la funcionalidad de algunos transportadores de riboflavina no depende del consumo directo de energía. La evidencia experimental destacó al transportador Mch5p como facilitador, formando dominios MFS (**Figura R-17** y **Figura R-18**), característico de transportadores de tipo *uniporter* o co-transportadores sin gasto de ATP directo (Reihl & Stolz 2005). En este sentido, el transportador RibZ también tiene dominios MFS, por lo que también actuaría como facilitador de tipo *uniporter* o co-transportador (Gutiérrez-Preciado et al. 2015).

El transportador TcRibJ, y relacionados, también formarían dominios MFS, por lo que probablemente también funcionarían de la misma manera (**Figura R-18** y **Tabla R-2 - Tabla R-3**). La funcionalidad de co-transportadores de nutrientes es común en los tripanosomátidos, destacándose los transportadores de glucosa y de piruvato, ambos pertenecientes a la superfamilia MFS (Sanchez 2013; Tetaud et al. 1997). El co-transporte también es característico de otros transportadores como los de nucleósidos/nucleobases y de aminoácidos, aunque pertenecen a familias muy distantes (familia ENT y AAAP/auxina, respectivamente) de la familia MFS (Inbar et al. 2013; Landfear 2011).

Por otra parte, existen transportadores de riboflavina con dominios proteicos sin ninguna función asociada. Es el caso del transportador RibN formaría un dominio de tipo EamA, cuya funcionalidad aún se desconoce (García Angulo et al. 2013). Por otra parte, los transportadores de humanos son independientes de Na⁺ y, salvo RFVT3, también de H⁺ (Chandira & Yanagawa 1998; Said et al. 1998; Said et al. 2000; Zemleni & Mock 2000; Huang & Swaan 2001; Said et al. 2005; Kansara et al. 2005; Yao et al. 2010), y no pertenecen a la familia MFS, ni tendrían dominios proteicos conocidos (Yan 2015). De esta manera, el transportador TcRibJ y los de mamíferos tendrían diferencias a nivel estructural.

Los transportadores llevando dominios MFS suelen tener una estructura altamente semejante, denominada plegamiento de tipo MFS (*MFS fold*), y que está conservada en bacterias, plantas, hongos y mamíferos, aún a pesar de la baja identidad entre estas secuencias (Yan 2015). Es por

este motivo que intentamos obtener un modelo estructural de *TcRibJ*, con el objetivo posterior de determinar los aminoácidos esenciales para el transporte de riboflavina.

Tal como se explicó anteriormente, se encontraron varios aminoácidos hidrofóbicos interactuando con la región apolar (anillo de isoaloxazina) de la riboflavina (Leu 65, Pro 69, Leu 119, Cys 126, Leu 285, Val 288, Leu 317, Met 379, Phe 383, Phe 407), mientras los hidrofílicos (Gln 26, Ser 29, Tyr 30, Ser 68, Tyr 292) y un aminoácido cargado negativamente (Asp 33), participarían en la interacción con la parte polar (cadena de ribitol) (**Figura R-26B**). En la actualidad solo hay 4 transportadores de riboflavina cristalizados, en los cuales también se encontró una molécula de riboflavina unida (Zhang et al. 2010; Karpowich et al. 2016; Deka et al. 2013; Karpowich et al. 2015). En 3 de estas estructuras se determinaron los aminoácidos que interactúan con la riboflavina:

- RibU de *Staphylococcus aureus*: el anillo de la riboflavina se asocia a una cavidad altamente hidrofóbica formada por los aminoácidos: Tyr 41, Leu 42, Val 83, Gly 84, Ala 87, Asn 88, Ala 91, Leu 127, Val 134, Leu 135, Leu 138, Ile 160, Phe 163; aunque también interactúa con Asn 131, Asn 164 y Lys 167; mientras que la cadena polar de la riboflavina interactúa con Thr 43, Asp 81 y Gly 84 (Zhang et al. 2010).

- *TmRibU* de la bacteria *Thermotoga marítima*: el anillo de isoaloxazina interactúa con aminoácidos hidrofóbicos como Phe 33, Val 75, Gly 76, Met 76, Ile 126, Tyr 130, Asn 123, Asn 149, Lys 152; mientras la cadena polar, con Glu 24, Lys 35, Gly 76 y Asn 80 (Karpowich et al. 2016).

- RfuA de *T. pallidum*: la isoaloxazina interactúa con partes hidrofóbicas de la proteína (principalmente con los aminoácidos Tyr 27, Tyr 157, Trp 189, y con Ser 24 y Asn 82), mientras la cadena de ribitol, con regiones polares y cargadas (Ser 81, Asp 105, Gln 121, Tyr 157, Asp 236), (Deka et al. 2013).

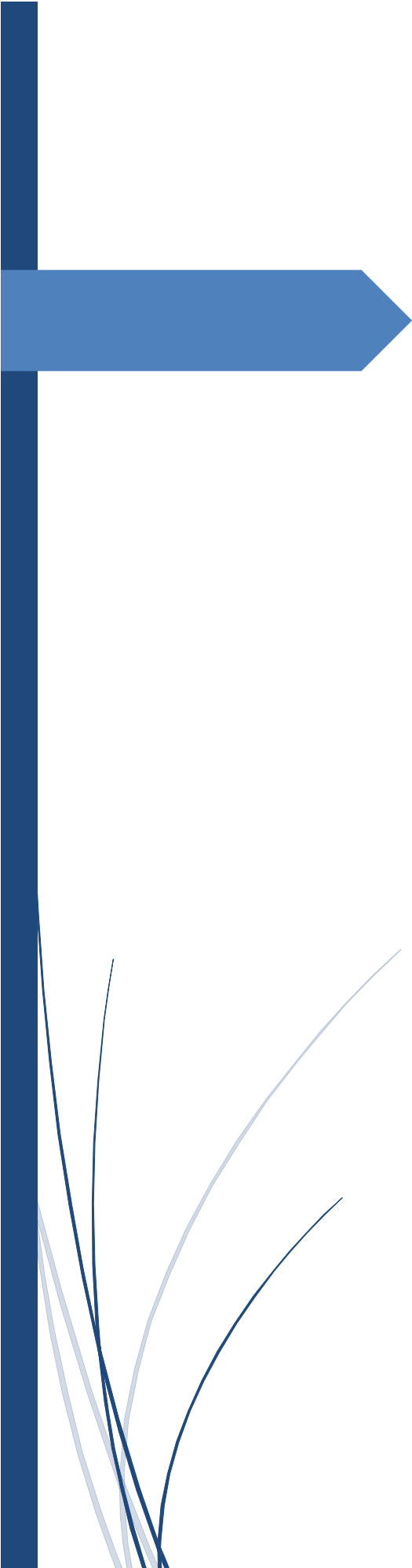
Por lo tanto, al analizar estas 3 estructuras, se observó que existe un patrón donde los aminoácidos hidrofóbicos se asocian con la parte apolar y los hidrofílicos con la región polar de la riboflavina. Este patrón coincide con el obtenido en nuestro modelado, por lo que estos aminoácidos resultaron buenos candidatos para estudiar; además, varias de ellos están conservados en la familia RibJ (**Figura R-17** y **Figura R-23**). Durante el desarrollo de este trabajo se realizaron técnicas de mutagénesis dirigida sobre algunos de los aminoácidos de *TcRibJ* (Asn

34 y Tyr 36, Val 406 y Phe 407) (resultados no mostrados); y, si bien las mutantes fueron no-funcionales, aún no se pudo descartar si este defecto ocurrió por cambios en los niveles de expresión de las proteínas mutantes. Sin embargo, estos aminoácidos son buenos candidatos para la búsqueda de drogas inhibitorias y específicas para *TcRibJ*.

Participación de transportadores de riboflavina en infección

Existen varios reportes en los que se mostró que la participación de diversos transportadores de riboflavina es esencial para la infección de diversos hospedadores. Se ha reportado que el transportador RfuABCD de *Borrelia burgdorferi* favorece la respuesta antioxidante, siendo un importante factor de virulencia (Showman et al. 2016). Al mismo tiempo, se observó que transportadores de flavinas FlcA-C del retículo endoplasmático de *Aspergillus fumigatus* son esenciales para la infección de ratones (de Castro et al. 2016). Interesantemente, en mamíferos se observó una asociación positiva entre la expresión de transportadores de riboflavina y la tumorigenicidad (Jiang et al. 2014). Finalmente, también se mostró que el transportador RibN de *R. leguminosarum* cumple un papel importante en la persistencia de la infección en plantas (García Angulo et al. 2013)

De esta manera, resulta interesante evaluar la participación de RibJ en la metaciclización de epimastigotes de *T. cruzi*, en sus mecanismos de infección y sobrevivencia de tripomastigotes y en la replicación intracelular de amastigotes. Durante este último tiempo, se hicieron esfuerzos para la obtención de parásitos Y-GFP sobre-expresando TcRibJ y mutantes nulas de TcRibJ para analizar estos parámetros.



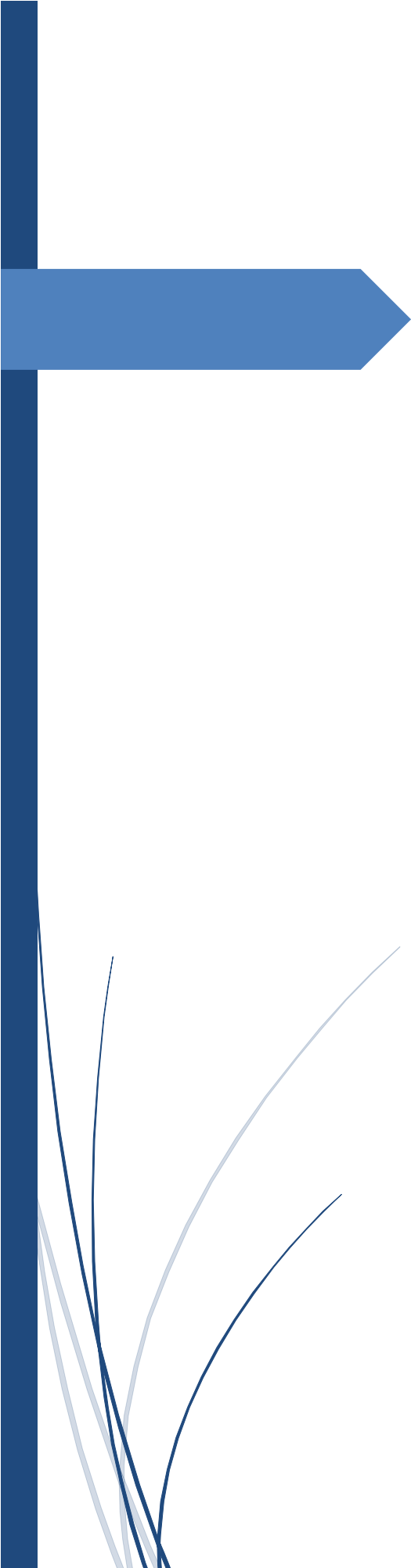
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo, se pudieron obtener las siguientes conclusiones:

- 1) A nivel bioquímico se encontraron leves diferencias entre los mecanismos de incorporación de riboflavina en *T. cruzi* respecto del transporte en humanos. Si bien ambos tuvieron afinidades similares a la riboflavina y son sensibles a los mismos análogos, el transporte en *T. cruzi* permite la incorporación de flavinas, mientras que los de humanos solo utilizan riboflavina.
- 2) Las flavinas son metabolitos importantes para sostener el crecimiento de las formas replicativas de los tripanosomátidos. La inhibición de su transporte tiene efectos negativos sobre su proliferación. De hecho, forman parte de varios factores de virulencia.
- 3) El transporte de riboflavina es esencial para la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos.
- 4) Si bien los mecanismos de infección parecen ser dependientes de flavinas, nuestros ensayos no pudieron demostrarlo. Sin embargo, la larga exposición a los análogos perjudicó la sobrevivencia de los tripomastigotes, por lo que tendrían una actividad de transporte de riboflavina remanente.
- 5) Identificamos funcionalmente al primer transportador de riboflavina exclusivo de tripanosomátidos, nombrado RibJ. Estos transportadores forman una nueva familia de transportadores de riboflavina, distante a la de mamíferos. A nivel de estructura, también serían diferentes, por lo que resulta un interesante blanco terapéutico.

Si bien en este trabajo se encontró un nuevo blanco terapéutico, aún faltan más estudios para encontrar herramientas que logren la inhibición específica del transporte de riboflavina en *T. cruzi*, y consecuentemente su metabolismo dependiente de flavinas, sin afectar la homeostasis del hospedador.

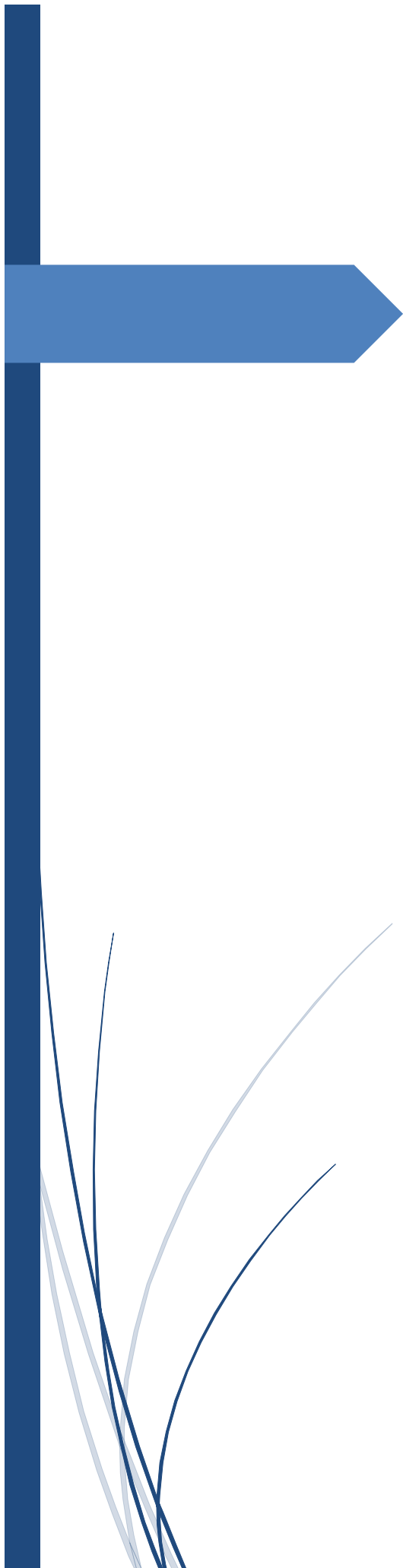


COAUTORÍA y FINANCIAMIENTO

COAUTORÍA y FINANCIAMIENTO

En este trabajo, además de los autores/as que figuran en el encabezado, han colaborado económica y científicamente el Dr. Claudio Pereira (Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari) y el Dr. Fernando Goldbaum (Fundación Instituto Leloir). Además, cabe destacar la gran colaboración de la Dra. Cristina Vanrell y Dra. Patricia Romano y todo su grupo de trabajo (Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Histología y Embriología (IHEM); Universidad Nacional de Cuyo CONICET Mendoza).

Este trabajo se ha realizado con fondos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Goldbaum, Romano y Carrillo), del CONICET (Pereira y Carrillo) y de la InterAmerican Network of Academies of Sciences – IANAS (Carrillo).



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, C.A. & Sibirny, A.A., 2011. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), pp.321–360. Available at: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00030-10>.
- Adijanto, J. & Philp, N.J., 2012. *The SLC16A family of monocarboxylate transporters (MCTs)-physiology and function in cellular metabolism, pH homeostasis, and fluid transport*.
- Alberca, L.N. et al., 2016. Discovery of novel polyamine analogs with anti-protozoal activity by computer guided drug repositioning. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 30(4), pp.305–321.
- Alcolea, P.J. et al., 2014. An insight into the proteome of Crithidia fasciculata choanomastigotes as a comparative approach to axenic growth, peanut lectin agglutination and differentiation of Leishmania spp. promastigotes. *PLoS ONE*, 9(12), pp.1–26.
- Alcolea, P.J. et al., 2016. Serum Removal from Culture Induces Growth Arrest, Ploidy Alteration, Decrease in Infectivity and Differential Expression of Crucial Genes in Leishmania infantum Promastigotes. *PloS one*, 11(3), p.e0150172. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150172>.
- Ali, J.A.M. et al., 2013. Pyrimidine salvage in Trypanosoma brucei bloodstream forms and the trypanocidal action of halogenated pyrimidines. *Molecular pharmacology*, 83(2), pp.439–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23188714>.
- Alvarez, V.E. et al., 2008. Autophagy Is Involved in Nutritional Stress Response and Differentiation in Trypanosoma cruzi. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), pp.3454–3464. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M708474200>.
- Alves, J.M.P. et al., 2013. Endosymbiosis in trypanosomatids: the genomic cooperation between bacterium and host in the synthesis of essential amino acids is heavily influenced by multiple horizontal gene transfers. *BMC evolutionary biology*, 13, p.190. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3846528&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Alves, J.M.P. et al., 2011. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *PloS one*, 6(8), p.e23518. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3154472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Andrade Rajão, M. et al., 2014. Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in Trypanosoma cruzi. *Environmental and molecular mutagenesis*, 55, pp.309–321.
- Andreev, E. et al., 2016. The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin. *Scientific reports*, 6(20508), pp.1–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4748219&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Arastu-Kapur, S. et al., 2005. Second-site suppression of a nonfunctional mutation within the Leishmania donovani inosine-guanosine transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), pp.2213–2219.
- Atwood, J.A. et al., 2005. The Trypanosoma cruzi Proteome. *Science*, 309(5733), pp.473–476. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1110289>.
- Avila-levy, C.M. et al., 2015. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(8), pp.956–965.
- Babokhov, P. et al., 2013. A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathogens and global health*, 107(5), pp.242–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4001453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bähler, J. et al., 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in Schizosaccharomyces pombe. *Yeast*, 14(10), pp.943–951. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717240>.
- Barclay, J.J. et al., 2011. Trypanosoma cruzi Coexpressing Ornithine Decarboxylase and Green Fluorescence Proteins as a Tool to Study the Role of Polyamines in Chagas Disease Pathology. *Enzyme research*, 2011, p.657460. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3112526&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Barisón, M.J. et al., 2016. The active transport of histidine and its role in ATP production in Trypanosoma cruzi. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48(4), pp.437–449. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-016-9665-9>.
- Barros-Alvarez, X. et al., 2014. Glycosomal Targets for Anti-Trypanosomatid Drug Discovery. *Current Medicinal Chemistry*, 21(15), pp.1679–1706. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=21&issue=15&page=1679>.
- Batista, C.M. et al., 2015. Trypanosoma cruzi Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reserosomes. *PloS one*, 10(6), p.e0130165. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130165>.

- Bern, C. et al., 2011. Trypanosoma cruzi and chagas' disease in the united states. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), pp.655–681.
- Biswas, A. et al., 2013. Identification and functional characterization of the Caenorhabditis elegans riboflavin transporters rft-1 and rft-2. *PLoS one*, 8(3), p.e58190. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3590142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bonney, K.M., 2014. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite (Paris, France)*, 21, p.11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3952655&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bouvier, L.A. et al., 2013. Plasmid Vectors and Molecular Building Blocks for the Development of Genetic Manipulation Tools for Trypanosoma cruzi. *PLoS ONE*, 8(10), p.e80217. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0080217>.
- Brun, R. & Schönenberger, 1979. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of Trypanosoma brucei in a semi-defined medium. Short communication. *Acta tropica*, 36, pp.289–292.
- Burgess, C.M. et al., 2006. The riboflavin transporter RibU in *Lactococcus lactis* : molecular characterization of gene expression and the transport mechanism. *Journal of Bacteriology*, 188(8), pp.2752–2760.
- Camargo, E.P. & Wallace, F.G., 1994. Vectors of plant parasites of the genus Phytomonas (Protozoa, Zoomastigophorea, Kinetoplastida). In *Advances in Disease Vector Research*. pp. 333–359.
- Canepa, G.E. et al., 2011. Arginine kinase in Phytomonas, a trypanosomatid parasite of plants. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 160(1), pp.40–43. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.05.006>.
- Canepa, G.E. et al., 2005. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite Trypanosoma cruzi. *FEMS Microbiology Letters*, 247(1), pp.65–71.
- Capo-Chichi, C.D. et al., 2000. Analysis of riboflavin and riboflavin cofactor levels in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 739(1), pp.219–224.
- Caradonna, K.L. et al., 2013. Host metabolism regulates intracellular growth of trypanosoma cruzi. *Cell Host and Microbe*, 13(1), pp.108–117. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.11.011>.
- Cardoso, J. et al., 2011. Analysis of proteasomal proteolysis during the in vitro metacyclogenesis of Trypanosoma cruzi. *PLoS ONE*, 6(6), p.e21027.
- Carrillo, C. et al., 2006. Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from Trypanosoma cruzi. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), pp.936–940.
- Carrillo, C. et al., 1999. Trypanosoma cruzi epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Letters*, 454(3), pp.192–196.
- Carrillo, C., González, N.S. & Algranati, I.D., 2007. Trypanosoma cruzi as a model system to study the expression of exogenous genes coding for polyamine biosynthetic enzymes. Induction of DFMO resistance in transgenic parasites. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(12), pp.1605–1611.
- Carter, N.S. & Fairlamb, A.H., 1993. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature*, 361, pp.173–176.
- Castro-Pinto, D.B. et al., 2004. Trypanothione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of Leishmania amazonensis. Evaluation of its potential as a therapeutic target. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 19(February), pp.57–63.
- de Castro, P.A. et al., 2016. The putative flavin carrier family FlcA-C is important for Aspergillus fumigatus virulence. *Virulence*, 21, pp.1–13.
- Cecchini, G. et al., 1979. Transport and binding of riboflavin by Bacillus subtilis. *The Journal of biological chemistry*, 254(15), pp.7295–301. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/110806>.
- Chandira, K. & Yanagawa, N., 1998. Mechanism and regulation of riboflavin uptake by human renal proximal tubule epithelial cell line HK-2. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 274(1), pp.104–110.
- Chang, J.-M. et al., 2012. Accurate multiple sequence alignment of transmembrane proteins with PSI-Coffee. *BMC Bioinformatics*, 13(Suppl 4), p.S1. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/S4/S1>.
- Corteggiani Carpinelli, E. et al., 2014. Chromosome Scale Genome Assembly and Transcriptome Profiling of Nannochloropsis gaditana in Nitrogen Depletion. *Molecular Plant*, 7(2), pp.323–335. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674205214602914>.
- Cupello, M.P. et al., 2011. The heme uptake process in Trypanosoma cruzi epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta Tropica*, 120(3), pp.211–218. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.08.011>.

- Das, A. et al., 2004. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends in Parasitology*, 20(8), pp.381–387.
- David, V. et al., 2015. Gene loss and error-prone RNA editing in the mitochondrion of perkinsella, an endosymbiotic kinetoplastid. *mBio*, 6(6), pp.1–12.
- Dean, P. et al., 2014. Transport proteins of parasitic protists and their role in nutrient salvage. *Frontiers in plant science*, 5(April), p.153. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4010794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Deka, R.K. et al., 2013. Evidence for an ABC-Type Riboflavin Transporter System in Pathogenic Spirochetes. *mBio*, 4(1), pp.e00615-12-e00615-12. Available at: <http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.00615-12>.
- Deka, R.K. et al., 2015. Evidence for posttranslational protein flavinylation in the syphilis spirochete treponema pallidum: Structural and biochemical insights from the catalytic core of a periplasmic flavin-trafficking protein. *mBio*, 6(3), pp.1–9.
- Dewar, S. et al., 2016. The role of folate transport in antifolate drug action in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(47), p.jbc.M116.750422. Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M116.750422>.
- Díaz, M.L., Solari, A. & González, C.I., 2011. Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: Overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. *Journal of Proteomics*, 74(9), pp.1673–1682. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.001>.
- Dick, C.F. et al., 2013. Inorganic phosphate uptake in *Trypanosoma cruzi* is coupled to K⁺ cycling and to active Na⁺ extrusion. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(8), pp.4265–4273. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.034>.
- Docampo, R. & Moreno, S.N.J., 2008. The Acidocalcisome as a Target for Chemotherapeutic Agents in Protozoan Parasites. *Current Pharmaceutical Design*, 14(9), pp.882–888.
- Dumonteil, E. et al., 2012. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert review of vaccines*, 11(9), pp.1043–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3819810&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dutta, P., 1991. Enhanced Uptake and Metabolism of Riboflavin in Erythrocytes Infected with *Plasmodium falciparum*. *The Journal of protozoology*, 38(5), pp.479–483.
- Eichler, S. & Schaub, G. a., 1998. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology*, 44(2), pp.131–140.
- Fallon, A.M. et al., 2014. Depletion of host cell riboflavin reduces *Wolbachia* levels in cultured mosquito cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 50(8), pp.707–713. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789726>.
- Fang, J. & Beattie, D.S., 2002. Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: Isolation and characterization. *Biochemistry*, 41(9), pp.3065–3072.
- Fernandes Rodrigues, J., Prado Godinho, J.L. & de Souza, W., 2014. Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure Juliany. In *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*. pp. 1–42. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7305-9>.
- Ferreira, V. et al., 2004. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(5), pp.3042–3050.
- Figueiredo, R.C., Rosa, D.S. & Soares, M.J., 2000. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *The Journal of parasitology*, 86(6), pp.1213–1218.
- Fischer, M. & Bacher, A., 2006. Biosynthesis of vitamin B2 in plants. *Physiologia Plantarum*, 126(3), pp.304–318.
- Flannery, A.R., Renberg, R.L. & Andrews, N.W., 2013. Pathways of iron acquisition and utilization in *Leishmania*. *Current Opinion in Microbiology*, 16(6), pp.716–721. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.018>.
- Flegontov, P. et al., 2013. Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. *Current Biology*, 23(18), pp.1787–1793.
- Forsburg, S.L. & Rhind, N., 2006. Basic methods for fission yeast. *Yeast*, 23, pp.173–183.
- Forster, C., Revuelta, J.L. & Kramer, R., 2001. Carrier-mediated transport of riboflavin in *Ashbya gossypii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55(1), p.85–9.
- García-Bournissen, F. et al., 2015. Neglected Diseases: Drug Development for Chagas Disease as an Example. In *Optimizing Treatment for Children in the Developing World*. pp. 203–211.
- García Angulo, V.A. et al., 2013. Identification and characterization of ribN, a novel family of riboflavin transporters from rhizobium leguminosarum and other proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 195(20), pp.4611–4619.
- García Liñares, G. et al., 2012. Chemoenzymatic synthesis and biological evaluation of 2- and 3-hydroxypyridine derivatives

- against *Leishmania mexicana*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(15), pp.4614–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22781310>.
- Gerhardt, S. et al., 2002. Studies on the reaction mechanism of riboflavin synthase: X-ray crystal structure of a complex with 6-carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine. *Structure*, 10, pp.1371–1381.
- de Godoy, L.M.F. et al., 2012. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics*, 12, pp.2694–2703.
- Goes, G.R. et al., 2016. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), pp.1–25.
- González, N.S., Ceriani, C. & Algranati, I.D., 1992. Differential regulation of putrescine uptake in *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 188(1), pp.120–128.
- Green, M.R. & Sambrook, J., 2012. Chapter 2: Analysis of DNA; Protocol 11: Southern Blotting. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*. New York, pp. 133–149. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720821>.
- Gudipati, V. et al., 2014. The flavoproteome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1844, pp.535–544.
- Guerra, D.G. et al., 2006. The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania* spp. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(2), pp.155–169.
- Gupta, S. et al., 2009. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radical Biology and ...*, 47(10), pp.1414–1421. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158490900478X%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686837>.
- Gutiérrez-Preciado, A. et al., 2015. Extensive Identification of Bacterial Riboflavin Transporters and Their Distribution across Bacterial Species. *Plos One*, 10(5), p.e0126124. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0126124>.
- H. Lopes, A., 2010. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal*, 4(1), pp.30–59.
- Hailu, A., Dagne, D.A. & Boelaert, M., 2016. Leishmaniasis. In *Neglected Tropical Diseases - Sub-Saharan Africa*. pp. 87–112. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25471-5>.
- Halestrap, A.P. & Meredith, D., 2004. The SLC16 gene family - From monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), pp.619–628.
- Hall, B.S., Bot, C. & Wilkinson, S.R., 2011. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), pp.13088–13095.
- Hamilton, J.S. et al., 2009. Comparison of a Direct and Indirect Method for Measuring Flavins-Assessing Flavin Status in Patients Receiving Total Parenteral Nutrition. *The Open Clinical Chemistry Journal*, 2(1), pp.42–48.
- Hanif, R., Iqbal, Z. & Iqbal, M., 2006. Use of vegetables as nutritional food: role in human health. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1(1), pp.18–22.
- Hasne, M.-P. et al., 2010. A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Microbiology*, 76(1), pp.78–91. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2010.07081.x>.
- Hasne, M.P. & Barrett, M.P., 2000. Transport of methionine in *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 111(2), pp.299–307. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11163438.
- Hasne, M.P., Soysa, R. & Ullman, B., 2016. The trypanosoma cruzi diamine transporter is essential for robust infection of mammalian cells. *PLoS ONE*, 11(4), pp.1–17.
- Hemberger, S. et al., 2011. RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. *BMC Biotechnology*, 11(1), p.119. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/11/119>.
- Henriques, C. et al., 2015. Identification and functional characterization of a novel arginine/ornithine transporter, a member of a cationic amino acid transporter subfamily in the *Trypanosoma cruzi* genome. *Parasites & Vectors*, 8(1), p.346. Available at: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/346>.
- van Herwaarden, A.E. et al., 2007. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Molecular and cellular biology*, 27(4), pp.1247–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1800714&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Higa, A. et al., 2012. Increased de novo riboflavin synthesis and hydrolysis of FMN are involved in riboflavin secretion from *Hyoscyamus albus* hairy roots under iron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, pp.166–173. Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.001>.
- Hino, S. et al., 2012. FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure. *Nature Communications*, 3, p.758. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1755>.
- Hotez, P.J. et al., 2007. Control of Neglected Tropical Diseases. *The New England Journal of Medicine*, 10(6), pp.1018–1027.
- Huang, S.N. & Swaan, P.W., 2001. Riboflavin uptake in human trophoblast-derived BeWo cell monolayers: cellular translocation and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(1), pp.264–271. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11408551.
- Huang, Y. et al., 2003. Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from Escherichia coli. *Science*, 301, pp.616–620. Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1087619> <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1087619>.
- Hühner, J. et al., 2015. Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in mammalian model cells by CE with LED-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 36, pp.518–525. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201400451>.
- Inbar, E. et al., 2013. A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen Leishmania donovani regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses. *The Biochemical journal*, 449(2), pp.555–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22994895>.
- Inbar, E. et al., 2012. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. *Amino acids*, 42(1), pp.347–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21170560>.
- Jackson, A.P., Quail, M. a & Berriman, M., 2008. Insights into the genome sequence of a free-living Kinetoplastid: Bodo saltans (Kinetoplastida: Euglenozoa). *BMC genomics*, 9(1), p.594. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/594> <http://www.biomedcentral.com/publication/doi/10.1186/1471-2164-9-594>.
- Jaehme, M. & Slotboom, D.J., 2015. Diversity of membrane transport proteins for vitamins in bacteria and archaea. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(3), pp.565–576. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.006>.
- Jaskowska, E. et al., 2015. Phytoomonas: Trypanosomatids Adapted to Plant Environments. *PLoS Pathogens*, 11(1), pp.1–17.
- Jiang, X.R. et al., 2014. RFT2 is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenesis by sustaining cell proliferation and protecting against cell death. *Cancer Letters*, 353(1), pp.78–86. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.013>.
- Jortzik, E. et al., 2014. Flavins and Flavoproteins: Applications in Medicine. In *Flavins and Flavoproteins*. pp. 113–157. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0452-5>.
- Kansara, V. et al., 2005. Identification and Functional Characterization of Riboflavin Transporter in Human-Derived Retinoblastoma Cell Line (Y-79): Mechanisms of Cellular Uptake and Translocation. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 21(4), pp.275–287.
- Karpowich, N.K. et al., 2015. ATP binding drives substrate capture in an ECF transporter by a release-and-catch mechanism. *Nature structural & molecular biology*, 22(7), pp.565–573. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26052893>.
- Karpowich, N.K., Song, J. & Wang, D.-N., 2016. An Aromatic Cap Seals the Substrate Binding Site in an ECF-Type S Subunit for Riboflavin. *Journal of Molecular Biology*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228361630211X>.
- Kelly, L.A. et al., 2015. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), pp.845–858. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>.
- Kennedy, P.G.E., 2013. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *The Lancet Neurology*, 12(2), pp.186–194. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70296-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70296-X).
- Kim, D.E., Chivian, D. & Baker, D., 2004. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, 32, pp.526–531.
- Klein, C.C. et al., 2013. Biosynthesis of vitamins and cofactors in bacterium-harboring trypanosomatids depends on the symbiotic association as revealed by genomic analyses. *PLoS one*, 8(11), p.e79786. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3833962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kollien, A.H. & Schaub, G. a., 2000. The development of Trypanosoma cruzi in triatominae. *Parasitology Today*, 16(9), pp.381–387.
- de Koning, H.P. & Jarvis, S.M., 1997a. Hypoxanthine uptake through a purine-selective nucleobase transporter in Trypanosoma brucei brucei procyclic cells is driven by protonmotive force. *European journal of biochemistry / FEBS*, 247, pp.1102–1110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288936>.
- de Koning, H.P. & Jarvis, S.M., 1997b. Purine nucleobase transport in bloodstream forms of Trypanosoma brucei brucei is

- mediated by two novel transporters. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 89, pp.245–258.
- Koreny, L. et al., 2012. Aerobic kinetoplastid flagellate *Phytomonas* does not require heme for viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), pp.3808–3813.
- Kotloski, N.J. & Gralnick, J.A., 2013. Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *mBio*, 4(1), pp.10–13.
- Kubo, Y. et al., 2016. Blood-to-retina transport of riboflavin via RFVTs at the inner blood-retinal barrier, Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1347436716301069>.
- Labedan, B., 1988. Increase in permeability of *Escherichia coli* outer membrane by local anesthetics and penetration of antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(1), pp.153–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=172120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Landfear, S.M., 2010. Glucose Transporters in Parasitic Protozoa. In *Membrane Transporters in Drug Discovery and Development*. pp. 245–262. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-700-6>.
- Landfear, S.M., 2011. Nutrient Transport and Pathogenesis in Selected Parasitic Protozoa. *Eukaryotic Cell*, 10(4), pp.483–493. Available at: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.00287-10>.
- Landfear, S.M. & Ignatushchenko, M., 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(1), pp.1–17.
- Langer, S. et al., 2013. Flavoproteins Are Potential Targets for the Antibiotic Roseoflavin in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(18), pp.4037–4045. Available at: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00646-13>.
- Langousis, G. & Hill, K.L., 2014. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nature reviews. Microbiology*, 12(7), pp.505–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931043>.
- Le, S.Q. & Gascuel, O., 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), pp.1307–1320.
- Lee, E.S., Corfe, B.M. & Powers, H.J., 2013. Riboflavin depletion of intestinal cells in vitro leads to impaired energy generation and enhanced oxidative stress. *European Journal of Nutrition*, 52, pp.1513–1521.
- Li, Y. et al., 2016. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. *PLoS Pathogens*, 12(4), pp.1–30.
- Liu, W. et al., 2005. Identification and characterization of purine nucleoside transporters from *Crithidia fasciculata*. *Molecular and biochemical parasitology*, 140, pp.1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15694482>.
- Lutumba, P., Matovu, E. & Boelaert, M., 2016. Human African Trypanosomiasis (HAT). In *Neglected Tropical Diseases - Sub-Saharan Africa*. pp. 63–85. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25471-5>.
- Mach, J., Tachezy, J. & Šuták, R., 2013. Efficient iron uptake via a reductive mechanism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *The Journal of parasitology*, 99(2), pp.363–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22924933>.
- Machado-Silva, A. et al., 2016. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 767, pp.8–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003>.
- Maeda, F.Y., Cortez, C. & Yoshida, N., 2012. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunology*, 3(NOV), pp.1–7.
- Magnúsdóttir, S. et al., 2015. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests cooperation among gut microbes. *Frontiers in Genetics*, 6, pp.1–18.
- Makuc, J. et al., 2001. The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast*, 18(12), pp.1131–1143.
- Manchester, T. et al., 2013. Acriflavine treatment promotes dyskinetoplasty in *Trypanosoma cruzi* as revealed by ultrastructural analysis. *Parasitology*, 140(11), pp.1422–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23965822>.
- Martinez-Calvillo, S., Lopez, I. & Hernandez, R., 1997. pRIBOTEX expression vector: A pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene*, 199, pp.71–76.
- Mathieu, C. et al., 2014. *Trypanosoma brucei* eflornithine transporter AAT6 is a low affinity, low selective transporter for neutral amino acids. *Biochem J*, 18, pp.9–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24988048>.
- Maundrell, K., 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, 123(1), pp.127–130. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6182130>.
- McAnulty, M.J. & Wood, T.K., 2014. YeeO from *Escherichia coli* exports flavins. *Bioengineered Bugs*, 5(6), pp.386–392.
- McGwire, B.S. & Satoskar, A.R., 2014. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *Qjm*, 107(1), pp.7–14.

- Medina-Acosta, E. & Cross, G.A.M., 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple "mini-prep" procedure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 59, pp.327–329.
- Merli, M.L. et al., 2016. The Trypanosoma cruzi Protein TcHTE Is Critical for Heme Uptake. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), pp.1–18.
- Mesquita, R.D. et al., 2015. Genome of Rhodnius prolixus, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(48), pp.14936–14941. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1600205113>.
- Miranda, M.R. et al., 2012. Cationic amino acid uptake constitutes a metabolic regulation mechanism and occurs in the flagellar pocket of trypanosoma cruzi. *PLoS ONE*, 7(2), pp.3–9.
- Molina, I. et al., 2015. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), pp.6125–6131.
- Moyersoen, J. et al., 2004. Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: Trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, pp.603–643.
- Munday, J.C., Settimo, L. & de Koning, H.P., 2015. Transport proteins determine drug sensitivity and resistance in a protozoan parasite, Trypanosoma brucei. *Frontiers in Pharmacology*, 6(MAR), pp.1–10.
- Naquira, C. & Cabrera, R., 2009. Breve resena historica de la enfermedad de Chagas, a cien anos de su descubrimiento y situacion actual en el Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 26(4), pp.494–504.
- Narui, K. et al., 2002. Cloning and characterization of a novel chromosomal drug efflux gene in Staphylococcus aureus. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(12), pp.1533–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499635>.
- Oppenheimer, M. et al., 2012. Chemical mechanism of UDP-galactopyranose mutase from trypanosoma cruzi: A potential drug target against chagas' disease. *PLoS ONE*, 7(3), pp.1–11.
- Ortiz, D. et al., 2010. Purine restriction induces pronounced translational upregulation of the NT1 adenosine/pyrimidine nucleoside transporter in Leishmania major. *Mol.Microbiol.*, 78(1), pp.108–118.
- Osorio, L. et al., 2012. Virulence factors of Trypanosoma cruzi: Who is who? *Microbes and Infection*, 14, pp.1390–1402.
- Pachebat, J.A. et al., 2013. Draft Genome Sequence of Rhodococcus rhodnii Strain LMG5362, a Symbiont of Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), the Principal Vector of Trypanosoma cruzi. *Genome Announcements*, 1(3), pp.3–4.
- Paes, L.S. et al., 2013. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in Trypanosoma cruzi. *PLoS one*, 8(7), p.e69419. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84880663565&partnerID=tZOtx3y1>.
- Pan American Health Organization & World Health Organization, 2010. *Strategy and Plan of Action for Chagas Disease Prevention, Control and Care*, Available at: <http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2011/CD50-16-e.pdf>.
- Papageorgiou, I. et al., 2008. Kinetic and mutational analysis of the Trypanosoma brucei NBT1 nucleobase transporter expressed in Saccharomyces cerevisiae reveals structural similarities between ENT and MFS transporters. *International Journal for Parasitology*, 38(6), pp.641–653.
- Parodi-Talice, A. et al., 2007. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing Trypanosoma cruzi metacyclogenesis. *Journal of mass spectrometry*, 42, pp.1422–1432.
- Pedrolli, D.B. et al., 2013. Riboflavin Analogs as Antiinfectives: Occurrence, Mode of Action, Metabolism and Resistance. *Current Pharmaceutical Design*, 19, pp.0–0.
- Pereira, C.A. et al., 2014. Metabolite transporters in trypanosomatid parasites: promising therapeutic targets but... how to deal with them? *Current Medicinal Chemistry*, 21(15), pp.1707–1712. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992329>.
- Pereira, C. a et al., 2002. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 49(1), pp.82–85.
- Piacenza, L. et al., 2009. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of Trypanosoma cruzi virulence<i>. International Journal for Parasitology, 39(13), pp.1455–1464. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.010>.
- Podinovskaia, M. & Descoteaux, A., 2015. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*, 10(1), pp.111–29. Available at: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.14.103>.
- Porcel, B.M. et al., 2014. The Streamlined Genome of Phytomonas spp. Relative to Human Pathogenic Kinetoplastids Reveals a Parasite Tailored for Plants. *PLoS Genet*, 10(2), p.e1004007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004007>5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916237/pdf/pgen.1004007.pdf>.

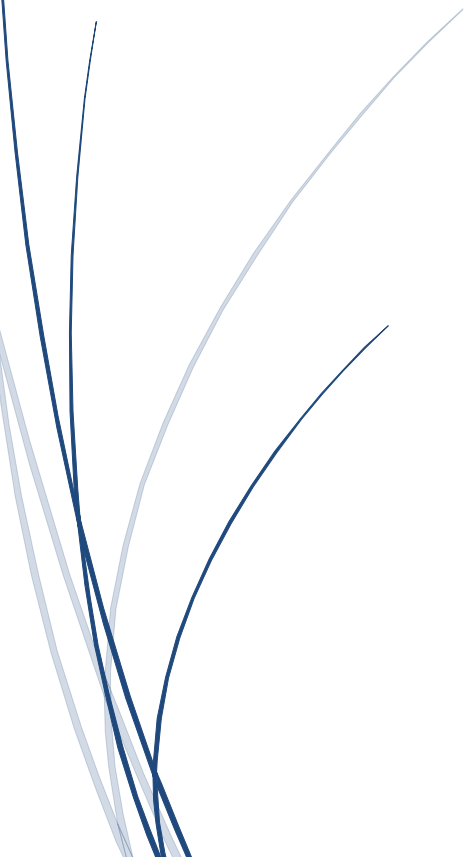
- Rassi, A., Rassi, A. & Marcondes de Rezende, J., 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), pp.275–291. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552012000116>.
- Reigada, C. et al., 2016. Trypanosoma cruzi Polyamine Transporter: Its Role on Parasite Growth and Survival Under Stress Conditions. *The Journal of Membrane Biology*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00232-016-9888-z>.
- Reihl, P. & Stolz, J., 2005. The monocarboxylate transporter homolog Mch5p catalyzes riboflavin (vitamin B2) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), pp.39809–39817.
- Richard, D., Kündig, C. & Ouellette, M., 2002. A new type of high affinity folic acid transporter in the protozoan parasite *Leishmania* and deletion of its gene in methotrexate-resistant cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(33), pp.29460–29467. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023977>.
- Rodriguez, H.O. et al., 2014. Trypanosoma cruzi strains cause different myocarditis patterns in infected mice. *Acta tropica*, 139, pp.57–66. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X14002277> [Accessed August 19, 2014].
- Romano, P.S. et al., 2012. Molecular and cellular mechanisms involved in the Trypanosoma cruzi/host cell interplay. *IUBMB Life*, 64(5), pp.387–396.
- Runckel, C., DeRisi, J. & Flenniken, M.L., 2014. A Draft Genome of the Honey Bee Trypanosomatid Parasite *Crithidia mellificae*. *PLoS ONE*, 9(4), p.e95057. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095057>.
- Sa, N. et al., 2016. Identification and characterization of the missing phosphatase on the riboflavin biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.13291>.
- Said, H.M. et al., 2000. Riboflavin uptake by human-derived colonic epithelial NCM460 cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 278(2), pp.C270–C276.
- Said, H.M. et al., 1998. Riboflavin uptake by the human-derived liver cells Hep G2: Mechanism and regulation. *Journal of Cellular Physiology*, 176(3), pp.588–594.
- Said, H.M., Wang, S. & Ma, T.Y., 2005. Mechanism of riboflavin uptake by cultured human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells: possible regulation by an intracellular Ca²⁺-calmodulin-mediated pathway. *J Physiol*, 566(Pt 2), pp.369–377. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878949>.
- Salavati, R. et al., 2012. Inhibitors of RNA editing as potential chemotherapeutics against trypanosomatid pathogens. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, pp.36–46.
- Sanchez, M.A., 2013. Molecular Identification and Characterization of an Essential Pyruvate Transporter from Trypanosoma brucei. *Journal of Biological Chemistry*, 288(20), pp.14428–14437. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M113.473157>.
- Sant'Anna, C. et al., 2008. All Trypanosoma cruzi developmental forms present lysosome-related organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(6), pp.1187–1198.
- dos Santos, P.F. et al., 2012. Molecular characterization of the hexose transporter gene in benznidazole resistant and susceptible populations of Trypanosoma cruzi. *Parasites & Vectors*, 5(161). Available at: ???
- Sayé, M. et al., 2014. Proline Modulates the Trypanosoma cruzi Resistance to Reactive Oxygen Species and Drugs through a Novel D, L-Proline Transporter. *PLoS ONE*, 9(3), p.e92028. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092028>.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L. & Goodwin, A., 2007. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*,
- Showman, A.C. et al., 2016. Gene bb0318 is critical for the oxidative stress response and infectivity of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, (August), p.IAI.00430-16. Available at: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00430-16>.
- Silber, A.M. et al., 2006. Biochemical characterization of the glutamate transport in Trypanosoma cruzi. *International Journal for Parasitology*, 36(2), pp.157–163.
- Silber, A.M. et al., 2009. Glucose uptake in the mammalian stages of Trypanosoma cruzi. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 168, pp.102–108.
- da Silva Augusto, L. et al., 2015. A Membrane-bound eIF2 Alpha Kinase Located in Endosomes Is Regulated by Heme and Controls Differentiation and ROS Levels in Trypanosoma cruzi. *PLOS Pathogens*, 11, p.e1004618. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004618>.
- Snyder, A.K. et al., 2010. Nutrient provisioning facilitates homeostasis between tsetse fly (Diptera: Glossinidae) symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1692), pp.2389–2397. Available at: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2010.0364>.
- Soares, M.B.P. et al., 2012. Anti-Trypanosoma cruzi activity of nicotinamide. *Acta Tropica*, 122(2), pp.224–229.
- Song, J. et al., 2014. Parasite aquaporins: Current developments in drug facilitation and resistance. *Biochimica et Biophysica*

- Acta - General Subjects*, 1840(5), pp.1566–1573.
- Soysa, R. et al., 2013. Structural model of a putrescine-cadaverine permease from *Trypanosoma cruzi* predicts residues vital for transport and ligand binding. *The Biochemical journal*, 452(3), pp.423–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3952013&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Spector, R., 1981. Lumiflavin and Lumichrome Transport in the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*, 36(3), pp.1186–1191.
- Steverding, D., 2008. The history of African trypanosomiasis. *Parasites & vectors*, 1(1), p.3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2270819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275594> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2270819>.
- Stich, A., Abel, P.M. & Krishna, S., 2015. Human African Trypanosomiasis: The Smoldering Scourge of Africa. In *Zoonoses–Infections Affecting Humans and Animals*. pp. 785–799.
- Stoffel, S. a. et al., 2006. Biosynthesis and uptake of thiamine (vitamin B1) in bloodstream form *Trypanosoma brucei brucei* and interference of the vitamin with melarsen oxide activity. *International Journal for Parasitology*, 36(2), pp.229–236.
- Stolz, J. & Vielreicher, M., 2003. Tpn1p, the Plasma Membrane Vitamin B6 Transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), pp.18990–18996. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M300949200>.
- Sundar, S. & Chakravarty, J., 2013. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 14(1), pp.53–63.
- Tetaud, E. et al., 1997. Kinetoplastid glucose transporters. *The Biochemical journal*, 325((Pt 3)), pp.569–580.
- Tomas, A.M., Miles, M.A. & Kelly, J.M., 1997. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *European journal of biochemistry / FEBS*, 244(2), pp.596–603.
- Tusnády, G.E. & Kozma, D., 2014. Structure Prediction of Transmembrane Proteins. In *Protein Modelling*. pp. 199–221.
- Ul Bari, A., 2006. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, 16(1), pp.24–27.
- Unciti-Broceta, J.D. et al., 2013. Nicotinamide inhibits the lysosomal cathepsin b-like protease and kills African trypanosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), pp.10548–10557.
- Valdes, R. et al., 2009. An ab initio structural model of a nucleoside permease predicts functionally important residues. *Journal of Biological Chemistry*, 284(28), pp.19067–19076.
- Valdes, R. et al., 2014. Identification of the intracellular gate for a member of the equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), pp.8799–8809.
- Valdivia, H.O. et al., 2015. Comparative genomic analysis of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *BMC Genomics*, 16(1), p.715. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/16/715>.
- De Vas, M.G. et al., 2011. The NADPH-cytochrome P450 reductase family in *Trypanosoma cruzi* is involved in the sterol biosynthesis pathway. *International Journal for Parasitology*, 41(1), pp.99–108.
- Velez, N. & Phillips, M.A., 2015. Targeting the Polyamine Biosynthetic Pathway in Parasitic Protozoa. In *Polyamines*. pp. 315–329. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-55212-3>.
- Vercesi, A.E., Docampo, R. & Moreno, S.N.J., 1992. Energization-dependent Ca²⁺ accumulation in *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic trypomastigotes mitochondria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 56(2), pp.251–257.
- Vickers, T.J. et al., 2006. Biochemical and genetic analysis of methylenetetrahydrofolate reductase in *Leishmania* metabolism and virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), pp.38150–38158.
- Vieira-Bernardo, R. et al., 2017. The biochemical characterization of two phosphate transport systems in *Phytomonas serpens*. *Experimental Parasitology*, 173, pp.1–8. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489416303691>.
- Vitreschak, A.G. et al., 2002. Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic acids research*, 30(14), pp.3141–3151.
- Vogl, C.C.C. et al., 2007. Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, 189(20), pp.7367–7375.
- Votýpka, J. et al., 2015. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology*, 31(10), pp.460–469. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147149221500152X>.
- Wainwright, M. & Baptista, M.S., 2011. The application of photosensitisers to tropical pathogens in the blood supply. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8(3), pp.240–248.
- Wallace, F.G., 1966. The trypanosomatid parasites of insects and arthropods. *Exp Parasitol*, 18, pp.124–193.

- Ward, N. & Moreno-Hagelsieb, G., 2014. Quickly finding orthologs as reciprocal best hits with BLAT, LAST, and UBLAST: How much do we miss? *PLoS ONE*, 9(7), pp.1–6.
- Wheeler, R.J., Gluenz, E. & Gull, K., 2013. The limits on trypanosomatid morphological diversity. *PLoS ONE*, 8(11).
- WHO, 2015. *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015.*, Available at: http://www.who.int/neglected_diseases.
- World Health Organization, 2013. *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases*,
- Yamamoto, S. et al., 2009. Identification and functional characterization of rat riboflavin transporter 2. *Journal of biochemistry*, 145(4), pp.437–443.
- Yan, N., 2013. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(3), pp.151–159. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.003>.
- Yan, N., 2015. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), pp.257–283. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biophys-060414-033901>.
- Yang, F. et al., 2014. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1845(1), pp.84–89. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>.
- Yao, Y. et al., 2010. Identification and comparative functional characterization of a new human riboflavin transporter hRFT3 expressed in the brain. *The Journal of nutrition*, 140(7), pp.1220–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463145>.
- Yonezawa, A. & Inui, K.I., 2013. Novel riboflavin transporter family RFVT/SLC52: Identification, nomenclature, functional characterization and genetic diseases of RFVT/SLC52. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), pp.693–701. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.014>.
- Yoshimatsu, H. et al., 2014. Functional involvement of RFVT3/SLC52A3 in intestinal riboflavin absorption. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 306(2), pp.G102–G110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24264046>.
- Zago, M.P. et al., 2016. TcI isolates of *Trypanosoma cruzi* exploit the antioxidant network for enhanced intracellular survival in macrophages and virulence in mice. *Infection and Immunity*, 84(6), pp.1842–1856.
- Zempleni, J. & Mock, D.M., 2000. Proliferation of peripheral blood mononuclear cells increases riboflavin influx. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 225(1), pp.72–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998201>.
- Zhang, P., Wang, J. & Shi, Y., 2010. Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter. *Nature*, 468(7324), pp.717–720. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09488>.



APENDICES



APÉNDICE

Apéndice 1. Flavoproteínas de *T. cruzi* obtenidas de la base de datos TriTrypDB, utilizando las palabras claves FMN y FAD.

Número de acceso	Función anotada	Función biológica
TcCLB.478671.9	proteína hipotética	Hipotéticas
TcCLB.503897.50	proteína hipotética	
TcCLB.503959.10	proteína hipotética	
TcCLB.504077.50	proteína hipotética	
TcCLB.506265.180	proteína hipotética	
TcCLB.506579.110	proteína hipotética	
TcCLB.506739.60	proteína hipotética	
TcCLB.508089.50	proteína hipotética	
TcCLB.508209.130	proteína hipotética	
TcCLB.510053.70	proteína hipotética	
TcCLB.510609.90	proteína hipotética	
TcCLB.503525.40	oxidoreductasa dependiente de FAD	transferencia de electrones
TcCLB.511589.170	oxidoreductasa dependiente de FAD	
TcCLB.503893.70	oxidoreductasa dependiente de FAD	
TcCLB.408799.19	isopentenil-difosfato delta-isomerasa	síntesis de ergosterol
TcCLB.510431.10	isopentenil-difosfato delta-isomerasa	
TcCLB.506715.59	escualeno monooxigenasa	
TcCLB.510341.4	escualeno monooxigenasa	
TcCLB.509589.20	escualeno monooxigenasa	
TcCLB.510747.60	citocromo P450 reductasa	
TcCLB.503753.29	citocromo P450 reductasa	
TcCLB.510877.120	citocromo P450 reductasa	
TcCLB.506931.80	citocromo P450 reductasa	
-	-	
TcCLB.507993.160	UDP-galactopiranososa mutasa	síntesis de aminoácidos
TcCLB.507047.150	L-galactonolactona oxidasa	síntesis de azúcares
TcCLB.508375.50	dihidroorotato deshidrogenasa	síntesis de vitaminas
TcCLB.507091.40	dihidroorotato deshidrogenasa	síntesis de pirimidinas
TcCLB.511141.20	colina deshidrogenasa	síntesis de betaína
TcCLB.506399.89	succinato deshidrogenasa	cadena respiratoria
TcCLB.511423.70	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	mantenimiento NAD ⁺ /NADH
TcCLB.506779.200	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	
TcCLB.508717.20	NADH dehidrogenasa	
TcCLB.507869.10	NADH dehidrogenasa	
TcCLB.506401.220	flavoproteína transportadora de electrones deshidrogenasa	
TcCLB.511693.90	flavoproteína transportadora de electrones deshidrogenasa	b-oxidación

APÉNDICE

TcCLB.506179.10	férrico reductasa	incorporación de hierro
TcCLB.511037.20	L-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa	reparación de metabolitos
TcCLB.507757.60	dihidrolipoamida deshidrogenasa	
TcCLB.507757.70	dihidrolipoamida deshidrogenasa	decarboxilación oxidativa
TcCLB.509379.10	dihidrolipoamida deshidrogenasa	
TcCLB.507089.270	dihidrolipoamida deshidrogenasa	
TcCLB.506775.170	citocromo b5 reductasa	
TcCLB.511047.40	citocromo b5 reductasa	desaturación de ácido grasos
TcCLB.503873.10	citocromo-b5 reductasa	
TcCLB.505807.110	alquil-dihidroxiacetona fosfato sintasa	formación de enlace éter-lípido
TcCLB.506411.30	prolina deshidrogenasa	catabolismo de aminoácidos
TcCLB.511127.260	ADN fotoliasa	reparación del ADN
TcCLB.506107.20	dihidrouridina sintasa	
TcCLB.507689.10	dihidrouridina sintasa	modificación de tARNs
TcCLB.504203.29	dihidrouridina sintasa	
TcCLB.430605.40	proteína conteniendo dominios EVR/ALR de sulfidril oxidasa	plegamiento de proteínas
TcCLB.505843.49	proteína conteniendo dominios EVR/ALR de sulfidril oxidasa	
TcCLB.484299.10	tripanotiona reductase	
TcCLB.504507.5	tripanotiona reductase	sistema antioxidante
TcCLB.510611.60	Nitroreductasa	
TcCLB.507617.9	prostaglandina F2alfa sintasa	nitrorreducción
TcCLB.504151.60	prostaglandina F2alfa sintasa	
TcCLB.506147.9	proteína asociada a citoesqueleto	citoesqueleto

Apéndice 2. Secuencias de transportadores de riboflavina de diferentes organismos utilizadas para la construcción del árbol filogenético de la **Figura R-20**.

Número de acceso	Transportador	Organismo	Referencia
EAA24951.1	ImpX	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
WP_005919096.1		<i>Fusobacterium hwasookii</i>	
WP_008794708.1		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	
ERT69840.1		<i>Cetobacterium somerae</i>	
WP_013387680.1		<i>Ilyobacter polytropus</i>	
WP_003500187.1	RfnT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
WP_034485091.1		<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	
WP_010660541.1		<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
WP_024896953.1		<i>Ochrobactrum rhizosphaerae</i>	
WP_047635943.1		<i>Rhizobium tropici</i>	
4IIL	RfuA	<i>Treponema pallidum</i>	(Deka et al. 2013)
WP_041610030.1		<i>Treponema paraluis-cuniculi</i>	
WP_013757732.1		<i>Treponema brennaborensis</i>	
AAS11442.1		<i>Treponema denticola</i>	
WP_013253165.1		<i>Spirochaeta maragdiniae</i>	
WP_059288399.1	RibM	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	(Hemberger et al. 2011; Vogl et al. 2007)
WP_007628796.1		<i>Dietzia cinnamomea</i>	
WP_005514725.1		<i>Rhodococcus equi</i>	
WP_030642810.1		<i>Streptomyces rimosus</i>	
WP_030610528.1		<i>Streptomyces sclerotialis</i>	
WP_011651362.1	RibN	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	(García Angulo et al. 2013)
WP_041683604.1		<i>Rhizobium etli</i>	
WP_060606660.1		<i>Sinorhizobium</i> sp. GW3	
WP_025426573.1		<i>Ensifer adhaerens</i>	
WP_011982272.1		<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
WP_036564936.1		<i>Ochrobactrum intermedium</i>	
WP_003130203.1	RibU	<i>Lactococcus lactis</i>	(Vogl et al. 2007)
WP_042217850.1		<i>Lactococcus garvieae</i>	
WP_047915536.1		<i>Lactococcus piscium</i>	
WP_061774251.1		<i>Lactococcus raffinolactis</i>	
WP_027698553.1		<i>Weissella oryzae</i>	
WP_024404171.1		<i>Streptococcus suis</i>	
WP_018369931.1		<i>Streptococcus marimammali</i>	
WP_002827364.1		<i>Weissella paramesenteroides</i>	
WP_010867355.1		<i>Pyrococcus abyssi</i>	
Q180E3	RibZ	<i>Peptoclostridium difficile</i>	(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
WP_011183474.1	RibV	<i>Mesoplasma florum</i>	(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
WP_015941456.1	RibXY	<i>Chloroflexus aggregans</i>	

APÉNDICE

WP_044199301.1		<i>Oscillochloris trichoides</i>	(Gutiérrez-Preciado et al. 2015)
WP_054533237.1		<i>Herpetosiphon geysericola</i>	
WP_012120895.1		<i>Roseiflexus castenholzii</i>	
EWM26594.1	simil a RFVT3	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	(Corteggiani Carpinelli et al. 2014)
XP_008607893.1		<i>Saprolegnia diclina</i>	
XP_008880401.1		<i>Aphanomyces invadans</i>	
XP_008910765.1		<i>Phytophthora parasitica</i>	
CCD69385.2	rft-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	(Biswas et al. 2013)
XP_001896372.1		<i>Brugia malayi</i>	
XP_003145255.1		<i>Loa loa</i>	
XP_013300104.1		<i>Necator americanus</i>	
XP_003380128.1		<i>Trichinella spiralis</i>	
XP_007849628.1	Mch5p	<i>Moniliophthora roreri</i>	(Reihl & Stolz 2005)
XP_013933620.1		<i>Ogataea parapolymorpha</i>	
XP_002797527.1		<i>Paracoccidioides lutzii</i>	
NP_014951.4		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
XP_003000372.1		<i>Verticillium alfalfae</i>	
XP_009648470.1		<i>Verticillium dahliae</i>	
XP_011271917.1		<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	
NP_001098047.1	RFVT	<i>Homo sapiens</i>	(Yao et al. 2010)
Q9D8F3.1		<i>Mus musculus</i>	
XP_002833179.2		<i>Pongo abelii</i>	
XP_005564405.1		<i>Macaca fascicularis</i>	
NP_001181490.1		<i>Macaca mulatta</i>	
NP_001008671.1		<i>Xenopus tropicalis</i>	
NP_001088340.1		<i>Xenopus laevis</i>	
XP_004947202.1		<i>Gallus gallus</i>	
XP_011576704.1		<i>Aquila chrysaetos canadensis</i>	
XP_015737434.1		<i>Coturnix japonica</i>	
XP_005422246.1		<i>Geospiza fortis</i>	
XP_010213876.1		<i>Tinamus guttatus</i>	
KKF33784.1		<i>Larimichthys crocea</i>	
XP_016521084.1		<i>Poecilia Formosa</i>	
XP_016407190.1		<i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	
JAR83069.1		<i>Fundulus heteroclitus</i>	
XP_015829578.1		<i>Nothobranchius furzeri</i>	
ETE59300.1		<i>Ophiophagus Hannah</i>	
XP_016854571.1		<i>Anolis carolinensis</i>	
KYO31596.1		<i>Alligator mississippiensis</i>	
XP_007444698.1		<i>Python bivittatus</i>	
		<i>Protobothrops</i>	
XP_015682961.1		<i>mucrosquamatus</i>	
LpyrH10_07_0560	RibJ	<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	Este trabajo
AIHY01002387		<i>Phytomonas serpens</i>	
LdBPK_050480.1		<i>Leishmania donovani</i>	
AUXI01000737		<i>Crithidia acanthocephali</i>	

EMOLV88_050009300	<i>Endotrypanum monterogeii</i>
TcCLB.509885.70	<i>Trypanosoma cruzi</i>
CFAC1_020011500	<i>Crithidia fasciculata</i>
AUXN01003492	<i>Strigomonas galatti</i>
LmxM.05.0480	<i>Leishmania mexicana</i>
LmjF.05.0480	<i>Leishmania major</i>
AUXM01000876	<i>Angomonas deanei</i>
Tb927.5.470	<i>Trypanosoma brucei</i>
AUXJ01001726	<i>Herpetomonas muscarum</i>
AHIJ01002325	<i>Lotmaria passim</i>
BS47350	<i>Bodo saltans</i>
(19978338:19979612)	
NODE_24555_length_1382_ cov_9.405933	<i>Trypanoplasma borreli</i>

Apéndice 3. Secuencias de transportadores de distintas solutos en diferentes organismos utilizadas para la construcción del árbol filogenético de la Figura R-21.

Número de acceso	Transportador	Célula	Organismo	Especies
D8J2S3	MFS transportador	procariota	Archaea	<i>Halalkalicoccus jeotgali</i>
A0A0W1RBT9	MFS transportador	procariota	Archaea	<i>Halobacteriaceae archaeon</i>
F4BZZ0	MFS transportador	procariota	Archaea	<i>Methanosaeta concilii</i>
A0B6I2	MFS transportador	procariota	Archaea	<i>Methanosaeta thermophila</i>
D3T1H3	MFS transportador	procariota	Archaea	<i>Natrialba magadii</i>
O29880	Oxalato/formato antiporter	procariota	Archaea	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
A0A0N8I088	Oxalato/formato antiporter	procariota	Archaea	<i>Halolamina pelagica</i>
A0A0F7IEW9	Transportador de Nitrato/ Nitrito	procariota	Archaea	<i>Geoglobus ahangari</i>
C1F0T5	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Acidobacterium capsulatum</i>
K0CER8	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Alcanivorax dieselolei</i>
A6TUX0	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>
A0A0D1USN7	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>
D4ZWF6	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Arthrosira platensis</i>
Q5WKB7	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Bacillus clausii</i>
A0A0M3RAP8	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Bacillus gobiensis</i>
Q65NG3	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Bacillus licheniformis</i>
H6RJY0	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Blastococcus saxobsidens</i>
A0A0Q3KMOV8	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Bosea thiooxidans</i>
F7QKT2	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Bradyrhizobiaceae bacterium</i>
A0A0D1NU82	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
B4E6V6	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
A0A105UAN9	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Burkholderia multivorans</i>
K8E2L7	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
K9U3V3	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>
C5EQI7	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Clostridiales bacterium</i>
Q4C6K6	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Crocospaera watsonii</i>
H1RXW2	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Cupriavidus basilensis</i>
S7TUS1	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Desulfococcus multivorans</i>
C9A8Z8	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
C5NXS8	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Gemella haemolysans</i>
M5A174	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Ilumatobacter coccineus</i>
A0A0C1YGL7	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Lynghya confervoides</i>
B0JNH4	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i>
A0A0B2BEM5	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Mumia flava</i>
K2LSF1	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Nitratireductor pacificus</i>
U2KM32	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Streptococcus sobrinus</i>
D2BFD6	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Streptosporangium roseum</i>
I3TL60	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Tistrella mobilis</i>
A0A0H2M8U3	MFS transportador	procariota	Bacteria	<i>Variovorax paradoxus</i>
A0A069RQT3	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>[Clostridium] litorale</i>
A0A0F5I4U3	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Bacillaceae bacterium</i>

APÉNDICE

W4Q3M2	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Bacillus wakoensis</i>
Q89G02	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
A0A0C4Y1E6	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Cupriavidus basilensis</i>
A0A081KBC7	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Endozoicomonas elysicola</i>
A0A0E9LWU3	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Geofilum rubicundum</i>
X2H161	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Gilliamella apicola</i>
D8IVK5	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>
A0A0K8P5F9	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Ideonella sakaiensis</i>
I7L5F3	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
Q8Y598	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Listeria monocytogenes</i>
C5AW93	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Methylobacterium extorquens</i>
B6JF06	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Oligotrophia carboxidovorans</i>
G4RGC2	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Pelagibacterium halotolerans</i>
A0A0J1JL85	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Photobacterium aphoticum</i>
D0YY84	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Photobacterium damsela</i>
A0A066RR46	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Photobacterium galathea</i>
A0A0J1K2X2	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Photobacterium ganghwense</i>
A0A0F5VDA0	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Photobacterium halotolerans</i>
Q98K12	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Rhizobium loti</i>
A0A017HP99	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Rubellimicrobium mesophilum</i>
Q8E0G4	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Q8CWQ2	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Q5M3H0	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Streptococcus thermophilus</i>
A0A117LDH5	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Synergistales bacterium</i>
Q2LR63	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Syntrophus aciditrophicus</i>
R7RUU4	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Thermobrachium celere</i>
B5YGW2	Oxalato/formato antiporter	procariota	Bacteria	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>
K9UCB7	Permeasa de Arabinosa (eflujo)	procariota	Bacteria	<i>Chamaesiphon minutus</i>
A5CZG9	Permeasa de Arabinosa (eflujo)	procariota	Bacteria	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>
I4CET9	Permeasa de Cianato	procariota	Bacteria	<i>Desulfomonile tiedjei</i>
K9ZXP1	Transportador de Azúcares	procariota	Bacteria	<i>Deinococcus peraridilitoris</i>
L0F5A1	Transportador de Azúcares	procariota	Bacteria	<i>Desulfotobacterium dichloroeliminans</i>
I4CE05	Transportador de Azúcares	procariota	Bacteria	<i>Desulfomonile tiedjei</i>
D6E9J5	Transportador de Azúcares	procariota	Bacteria	<i>Gordonibacter pamela</i>
L0K9R9	Transportador de Azúcares	procariota	Bacteria	<i>Halobacteroides halobius</i>
A0A090ZG91	Transportador de Azúcares	procariota	Bacteria	<i>Paenibacillus macerans</i>
H2IZS4	Transportador de Azúcares	procariota	Bacteria	<i>Rahnella aquatilis</i>
A0A0D0QJ16	Transportador de Azúcares	procariota	Bacteria	<i>Wenxinia marina</i>
A0A0N1JS46	Transportador de Glucuronato/Galacturonato	procariota	Bacteria	<i>Amantichitinum ursilacus</i>
A0A014MAZ3	Transportador de Glucuronato/Galacturonato	procariota	Bacteria	<i>Erwinia mallotivora</i>
W7YKA4	Transportador de Glucuronato/Galacturonato	procariota	Bacteria	<i>Saccharicrinis fermentans</i>
A0A098LVE7	Transportador de marunorato	procariota	Bacteria	<i>Jejuia pallidilutea</i>
K9P3C2	Transportador de Nitrato/Nitrito	procariota	Bacteria	<i>Cyanobium gracile</i>

APÉNDICE

L0F531	Transportador de Nitrato/Nitrito	procariota	Bacteria	<i>Desulfitobacterium dichloroeliminans</i>
W8TIR4	Transportador de Nitrato/Nitrito	procariota	Bacteria	<i>Eubacterium acidaminophilum</i>
D4MA81	Transportador de Nitrato/Nitrito	procariota	Bacteria	<i>Fretibacterium fastidiosum</i>
A0A081Y0Y7	Transportador de Nitrato/Nitrito	procariota	Bacteria	<i>Gilliamella apicola</i>
I2F6F3	Transportador de Nitrato/Nitrito	procariota	Bacteria	<i>Mesotoga prima</i>
K9TBU0	Transportador de Nitrato/Nitrito	procariota	Bacteria	<i>Oscillatoria acuminata</i>
A5D1Y8	Transportador de Nitrato/Nitrito	procariota	Bacteria	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>
A0A0P8BIG3	Transportador de Nitrato/Nitrito	procariota	Bacteria	<i>Phormidesmis priestleyi</i>
A0A0P8Y9Z6	Transportador de Sulfoacetato	procariota	Bacteria	<i>Oxobacter pfennigii</i>
S7PUM1	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Gloeophyllum trabeum</i>
A0A137POS9	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Conidiobolus coronatus</i>
A0A0C9MYT7	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Mucor ambiguus</i>
A0A139ADT1	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Gonapodya prolifera</i>
A0A0B4GQ74	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Metarhizium guizhouense</i>
A0A0F0IMS2	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Aspergillus parasiticus</i>
A0A014NCK6	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Metarhizium robertsii</i>
A0A084FW47	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Scedosporium apiospermum</i>
J5K2Q0	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Beauveria bassiana</i>
B8N0F1	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Aspergillus flavus</i>
T0KWW1	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
T4ZXS2	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>
A0A0H2RHQ9	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A010QX38	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Colletotrichum fioriniae</i>
A0A068SG06	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
R4X946	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Taphrina deformans</i>
E3Q9B0	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Colletotrichum graminicola</i>
A0A136J0H7	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Microdochium bolleyi</i>
A0A0B2WZA2	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Metarhizium album</i>
A0A0A2J989	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Penicillium expansum</i>
A0A0A2KCF6	MFS transportador	eucariota	hongo	<i>Penicillium italicum</i>
B4I9R7	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Drosophila sechellia</i>
B4JVS4	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Drosophila grimshawi</i>
B4H5A3	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Drosophila persimilis</i>
Q9W0L6	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Drosophila melanogaster</i>
Q8T043	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Drosophila melanogaster</i>
Q7QGT1	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Anopheles gambiae</i>
Q16ZX4	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Aedes aegypti</i>
Q9W509	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Drosophila melanogaster</i>
A0A084WPC6	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Anopheles sinensis</i>
Q4V4X4	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Drosophila melanogaster</i>
B4MPQ6	MFS transportador	eucariota	insecto	<i>Drosophila willistoni</i>
Q6BIY0	MFS transportador	eucariota	levadura	<i>Debaryomyces hansenii</i>
A0A081CKG3	MFS transportador	eucariota	levadura	<i>Pseudozyma antarctica</i>
C4R9D2	MFS transportador	eucariota	levadura	<i>Komagataella pastoris</i>
A0A0J9XUK9	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Brugia malayi</i>

APÉNDICE

J9FEN1	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Wuchereria bancrofti</i>
A0A090KWU7	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Strongyloides ratti</i>
A0A077Z4T0	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Trichuris trichiura</i>
W2TS66	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Necator americanus</i>
E5SLB1	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Trichinella spiralis</i>
A0A0D6L6Z2	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>
A8XK77	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
E3LE98	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Caenorhabditis remanei</i>
G0M8D4	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Caenorhabditis brenneri</i>
A0A0D8XUB3	MFS transportador	eucariota	nematodo	<i>Dictyocaulus viviparus</i>
A0A0L0DUR4	MFS transportador	eucariota	protozoo	<i>Thecamonas trahens</i>
A0A0V0QX16	MFS transportador	eucariota	protozoo	<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>
Q6P2X9	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	anfibio	<i>Xenopus tropicalis</i>
Q28CH7	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	anfibio	<i>Xenopus tropicalis</i>
F1NNQ2	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Gallus gallus</i>
A0A091LEF4	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Cathartes aura</i>
A0A091TMR4	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Phaethon lepturus</i>
A0A094N441	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Podiceps cristatus</i>
A0A091FFW6	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Cuculus canorus</i>
A0A091RLJ6	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Mesitornis unicolor</i>
A0A093CL55	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Tauraco erythrolophus</i>
A0A093FS68	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Tyto alba</i>
A0A091NGS3	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Acanthisitta chloris</i>
A0A0A0AVI2	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Charadrius vociferus</i>
A0A087VS16	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Balearica regulorum gibbericeps</i>
A0A093ISB1	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Fulmarus glacialis</i>
A0A091H2V9	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Buceros rhinoceros silvestris</i>
A0A091V4D5	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Nipponia nippon</i>
A0A093QRG6	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Phalacrocorax carbo</i>
A0A091J692	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Calypte anna</i>
A0A091SKP2	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Pelecanus crispus</i>
A0A091XCN3	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Opisthocomus hoazin</i>
A0A091NPV7	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Apaloderma vittatum</i>
A0A091PG05	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Haliaeetus albicilla</i>
A0A093HHP6	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	ave	<i>Struthio camelus australis</i>
V2WTQ3	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Moniliophthora roreri</i>
S0DZL4	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Gibberella fujikuroi</i>
G5EH73	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Magnaporthe oryzae</i>
N4VSR9	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Colletotrichum orbiculare</i>
B6QWA7	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Talaromyces marneffe</i>
M1W1E3	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Claviceps purpurea</i>
A0A0L1JBI3	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Aspergillus nomius</i>
E9DT67	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Metarhizium acridum</i>
B8MGS6	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Talaromyces stipitatus</i>
A0A117E1U2	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Aspergillus niger</i>
A0A0L0N1R9	ransportador de Monocarboxilato	eucariota	hongo	<i>Tolypocladium ophioglossoides</i>

APÉNDICE

G7XW86	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Aspergillus kawachii</i>
C0NDE7	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Ajellomyces capsulatus</i>
G3JBL7	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Cordyceps militaris</i>
A0A0M9EZV9	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Fusarium langsethiae</i>
N1RU90	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Fusarium oxysporum</i>
A0A017SSI8	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Aspergillus ruber</i>
Q6CDG0	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Yarrowia lipolytica</i>
H6BPB5	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Exophiala dermatitidis</i>
A0A0P1BP05	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Ceraceosorus bombacis</i>
A0A0B1NWW3	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	hongo	<i>Uncinula necator</i>
A0A026WL45	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Cerapachys biroi</i>
E0VL16	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Pediculus humanus</i>
A0A0M8ZZS4	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Melipona quadrifasciata</i>
E2AH90	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Camponotus floridanus</i>
A0A067QTW1	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Zootermopsis nevadensis</i>
A0A131ZT51	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Sarcoptes scabiei</i>
A0A087TVX6	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Stegodyphus mimosarum</i>
Q5U154	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Drosophila melanogaster</i>
B3MYS4	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Drosophila ananassae</i>
G6DGN8	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Danaus plexippus</i>
E2B3J9	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Harpegnathos saltator</i>
A0A139WH66	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Tribolium castaneum</i>
B7QJS3	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Ixodes scapularis</i>
B0W6P2	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Culex quinquefasciatus</i>
W5JIK8	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Anopheles darlingi</i>
A0A0J7KMG8	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Lasius niger</i>
A0A0L7L218	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Operophtera brumata</i>
F4WHW2	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	insecto	<i>Acromyrmex echinatio</i>
K0KT96	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	levadura	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>
A3LPQ4	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	levadura	<i>Scheffersomyces stipitis</i>
I2JXU6	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	levadura	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> AWRI1499
G3AMB0	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	levadura	<i>Spathaspora passalidarum</i>
Q08268	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M7X6L7	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	levadura	<i>Rhodospiridium toruloides</i>
J8PZI1	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	levadura	<i>Saccharomyces arboricola</i>
R9P8W7	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	levadura	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
A0A0H5C1G7	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	levadura	<i>Cyberlindnera jadinii</i>
D4A734	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Rattus norvegicus</i>
Q8BGC3	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Mus musculus</i>
L9L1E5	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Tupaia chinensis</i>
L5KGI3	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Pteropus alecto</i>
S7PG89	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Myotis brandtii</i>
G3H3U7	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Cricetulus griseus</i>
G5B0Z4	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Heterocephalus glaber</i>
H2NAU3	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Pongo abelii</i>

APÉNDICE

F6SCZ2	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Callithrix jacchus</i>
A0A091DCS0	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Fukomys damarensis</i>
L5MG21	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Myotis davidii</i>
H2QC20	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Pan troglodytes</i>
G7PTF2	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Macaca fascicularis</i>
F7H6H5	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Macaca mulatta</i>
S9XPE2	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Camelus ferus</i>
Q6SJP3	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Equus caballus</i>
Q17QR6	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Bos taurus</i>
F1SBQ5	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Sus scrofa</i>
Q3U9N9-2	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Mus musculus</i>
A7E343	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	mamifero	<i>Bos taurus</i>
K1QVW2	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	molusco	<i>Crassostrea gigas</i>
A0A0V0RTG6	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Trichinella nelsoni</i>
A0A0V0YF21	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Trichinella pseudospiralis</i>
A0A0V1D113	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Trichinella britovi</i>
A0A0V1LFU3	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Trichinella nativa</i>
A0A0V1HJZ2	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Trichinella zimbabwensis</i>
A0A0V1M7B4	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Trichinella papuae</i>
F1KZ58	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Ascaris suum</i>
A0A0V0TAK2	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Trichinella murrelli</i>
A0A0V0ZDF3	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Trichinella patagoniensis</i>
O17328	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Caenorhabditis elegans</i>
A0A0B2W001	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	nematodo	<i>Toxocara canis</i>
A0A0F8CV08	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	pez	<i>Larimichthys crocea</i>
F1Q846	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	pez	<i>Danio rerio</i>
A0A0P7UDX4	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	pez	<i>Scleropages formosus</i>
E7FKY6	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	pez	<i>Takifugu rubripes</i>
W6UCH4	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	platelminto	<i>Echinococcus granulosus</i>
A0A068X6W0	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	platelminto	<i>Hymenolepis microstoma</i>
A0A094ZVZ3	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	platelminto	<i>Schistosoma haematobium</i>
G7Y2K7	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	platelminto	<i>Clonorchis sinensis</i>
A0A068Y1D5	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	platelminto	<i>Echinococcus multilocularis</i>
G4VQ07	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	platelminto	<i>Schistosoma mansoni</i>
A0A151MP00	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	reptil	<i>Alligator mississippiensis</i>
M7AXV0	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	reptil	<i>Chelonia mydas</i>
V8PG23	ransportador de Monocarboxilatc	eucariota	reptil	<i>Ophiophagus hannah</i>
P53985	ransportador de Monocarboxilatc 1	eucariota	mamifero	<i>Homo sapiens</i>
Q6ZSM3	ransportador de Monocarboxilatc 12	eucariota	mamifero	<i>Homo sapiens</i>
Q7RTY0	ransportador de Monocarboxilatc 13	eucariota	mamifero	<i>Homo sapiens</i>
Q7RTX9	ransportador de Monocarboxilatc 14	eucariota	mamifero	<i>Homo sapiens</i>
O60669	ransportador de Monocarboxilatc 2	eucariota	mamifero	<i>Homo sapiens</i>

APÉNDICE

O15374	Transportador de Monocarboxilato 5	eucariota	mamífero	<i>Homo sapiens</i>
P36021	Transportador de Monocarboxilato 8	eucariota	mamífero	<i>Homo sapiens</i>
Q7RTY1	Transportador de Monocarboxilato 9	eucariota	mamífero	<i>Homo sapiens</i>
A0A0U1LVR9	Transportador de Potasio de alta afinidad	eucariota	hongo	<i>Talaromyces islandicus</i>
W1Q9L9	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Ogataea parapolyomorpha</i>
L2FZ89	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
N4UJC5	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Fusarium oxysporum</i>
C9SWR6	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Verticillium alfalfae</i>
M7T367	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Eutypa lata</i>
A0A0A2VW22	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Beauveria bassiana</i>
R8BMK0	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Togninia minima</i>
A0A0K8LPF7	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Aspergillus udagawae</i>
A0A0G2FPM9	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Diaporthe ampelina</i>
A0A086T1R1	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Acremonium chrysogenum</i>
N1SA60	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Fusarium oxysporum</i>
S3DBD8	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Ophiostoma piceae</i>
H1VHW5	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Colletotrichum higginsianum</i>
N4VIK4	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Colletotrichum orbiculare</i>
A0A0U1LKH8	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Talaromyces islandicus</i>
A0A084GDQ1	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Scedosporium apiospermum</i>
K0KSV6	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>
A0A010R7T5	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Colletotrichum fioriniae</i>
A0A0L0NA98	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Tolypocladium ophioglossoides</i>
A0A0N7Z3D7	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Rosellinia necatrix</i>
C1GNH1	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
A0A0N1HTE6	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Phialophora attae</i>
U4L077	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Pyronema omphalodes</i>
A0A0M9EXJ6	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Fusarium langsethiae</i>
E4V6T3	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Arthroderma gypseum</i>
M5BXY9	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
A0A066XLA8	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Colletotrichum sublineola</i>
A0A0U5GLN1	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Aspergillus calidoustus</i>
E7KUQ4	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A0S7DSF9	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Aspergillus lentulus</i>
A0A0M8MUL6	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Escovopsis weberi</i>
C5FTJ1	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Arthroderma otae</i>
K1W7Y2	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Marssonina brunnea</i>
M7TGC4	Mch5p	eucariota	hongo	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
A0A061J6U7	RibJ	eucariota	kinetoplástico	<i>Trypanosoma rangeli</i> SC58
A0A061J6U7	RibJ	eucariota	kinetoplástico	<i>Trypanosoma rangeli</i> SC58
V5ARW7	RibJ	eucariota	kinetoplástico	<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c
V5ARW7	RibJ	eucariota	kinetoplástico	<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c
Q57VW6	RibJ	eucariota	kinetoplástico	<i>Trypanosoma brucei</i> brucei

APÉNDICE

K4E800	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Trypanosoma cruzi</i>
K4E800	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Q4D3E8	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Trypanosoma cruzi</i> (strain CL Brener)
Q4D3E8	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Trypanosoma cruzi</i> (strain CL Brener)
Q4D3D9	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Trypanosoma cruzi</i> (strain CL Brener)
Q4D3D9	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Trypanosoma cruzi</i> (strain CL Brener)
K2NV95	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>
K2NV95	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>
W6KK89	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Phytomonas</i> sp. isolate EM1
W6LFP4	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Phytomonas</i> sp. isolate Hart1
F9WH69	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Trypanosoma congolense</i>
S9WQL2	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Angomonas deanei</i>
S9WQL2	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Angomonas deanei</i>
S9U1A5	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Strigomonas culicis</i>
S9VLA7	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Strigomonas culicis</i>
A0A0S4JIF3	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Bodo saltans</i>
A0A0S4JIF3	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Bodo saltans</i>
A4HSH0	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Leishmania infantum</i>
Q4QJF4	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Leishmania major</i>
A4H494	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Leishmania braziliensis</i>
A0A0N0DVU1	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>
A0A0N0P2L5	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Leptomonas seymouri</i>
A0A0S4JVK3	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Bodo saltans</i>
A0A0S4JVK3	RibJ	eucariota	kinetoplástido	<i>Bodo saltans</i>